



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK KAPANG *Aspergillus sp.*
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**

SKRIPSI

**EKO WINARNO
0606069703**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI SARJANA BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK KAPANG *Apergillus sp.*
TERHADAP SEL KANKER PAYUDARA T47D**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**EKO WINARNO
0606069703**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI SARJANA BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**

© Hak Cipta milik Balai Besar Pengolahan Produk dan Bioteknologi
Kelautan dan Perikanan, Tahun 2011

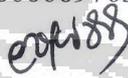
Balai Besar Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan
Badan Litbang kementerian Kelautan dan Perikanan
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip dan / atau memperbanyak isi skripsi ini sebagian atau seluruhnya
dalam bentuk apapun, baik cetak, fotokopi, microfilm atau lainnya tanpa izin tertulis
dari pemegang hak cipta.

Universitas Indonesia

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Eko Winarno
NPM : 0606069703
Tanda tangan : 
Tanggal : 12 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Eko Winarno
NPM : 0606069703
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Uji Sitotoksik Ekstrak Kapang *Aspergillus sp.*
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 Sarjana 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 : Drs. Iman Santoso, M. Phil (.....)

Penguji II : Dr. rer. nat. Yasman (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 12 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas berkat rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul Uji Sitotoksik Ekstrak Isolat Kapang MFB 07 Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. Dalam Kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah banyak membantu penulis selama masa perkuliahan hingga skripsi ini selesai, diantaranya:

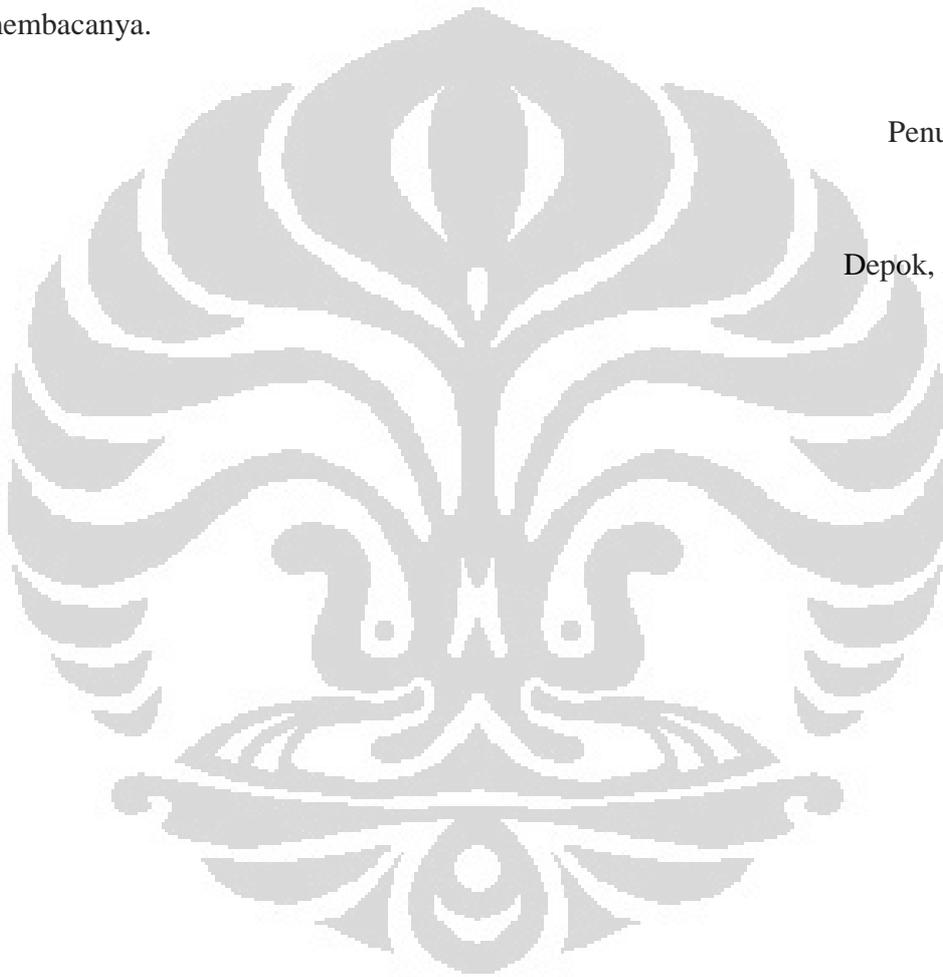
- a) Mama tercinta yang tak pernah lelah dalam mengurus dan mendidik, Embah tercinta di surga yang menjadi motivasi terbesar bagi penulis dalam melaksanakan seluruh kewajiban penulis. Terima kasih untuk kasih sayang, doa, dukungan, kebersamaan dan semangat yang begitu berharga bagi penulis.
- b) Bapak Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc sebagai pembimbing I dan Ibu Dr. Ekowati Chasanah, M.Sc sebagai pembimbing II yang telah memberikan perhatian, masukan, saran dan memotivasi penulis dalam penyusunan skripsi.
- c) Bapak Drs. Iman Santoso, M. Phil selaku penguji I dan Bapak Dr. rer.nat. Yasman selaku penguji II yang telah memberikan banyak masukan dan saran dalam penyusunan skripsi.
- d) Segenap karyawan dan staf dosen Departemen Biologi dan DKP yang sudah banyak memberikan ilmu, bantuan dan dorongan kepada penulis dari masa perkuliahan hingga penyusunan skripsi.
- e) Kepala Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi kelautan dan Perikanan yang telah mengizinkan penulis untuk mengerjakan sebagian kegiatan BBRP2B di Kelti Bioteknologi dan mendanai penelitian ini.
- f) Rahmat, Iqbal, Betty, Heny, Eva, Rika, Vinda, Solia, Fido, Pepep, Budi, Latief, Gery, Ruri, sahabat-sahabat terbaik yang sangat berharga bagi penulis, terima kasih atas keceriaan, dukungan, doa dan kebersamaannya selama ini. Sukses untuk kita semua.

g) Kepada pihak-pihak yang belum disebutkan namanya, penulis mengucapkan terima kasih, semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang kalian berikan.

Seperti kata pepatah “Tiada gading yang tak retak”, penulis menyadari skripsi ini jauh dari kesempurnaan. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi pihak-pihak yang membacanya.

Penulis

Depok, Juli 2011



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

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

Nama : Eko Winarno
NPM : 0606069703
Program Studi : Sarjana Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

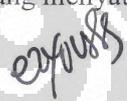
Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah skripsi yang berjudul :

Uji Sitotoksik Ekstrak Kapang *Aspergillus sp.* Terhadap Sel Kanker Payudara T47D

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir penulis selama tetap mencantumkan nama penulis sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini penulis buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 12 Juli 2011
Yang menyatakan

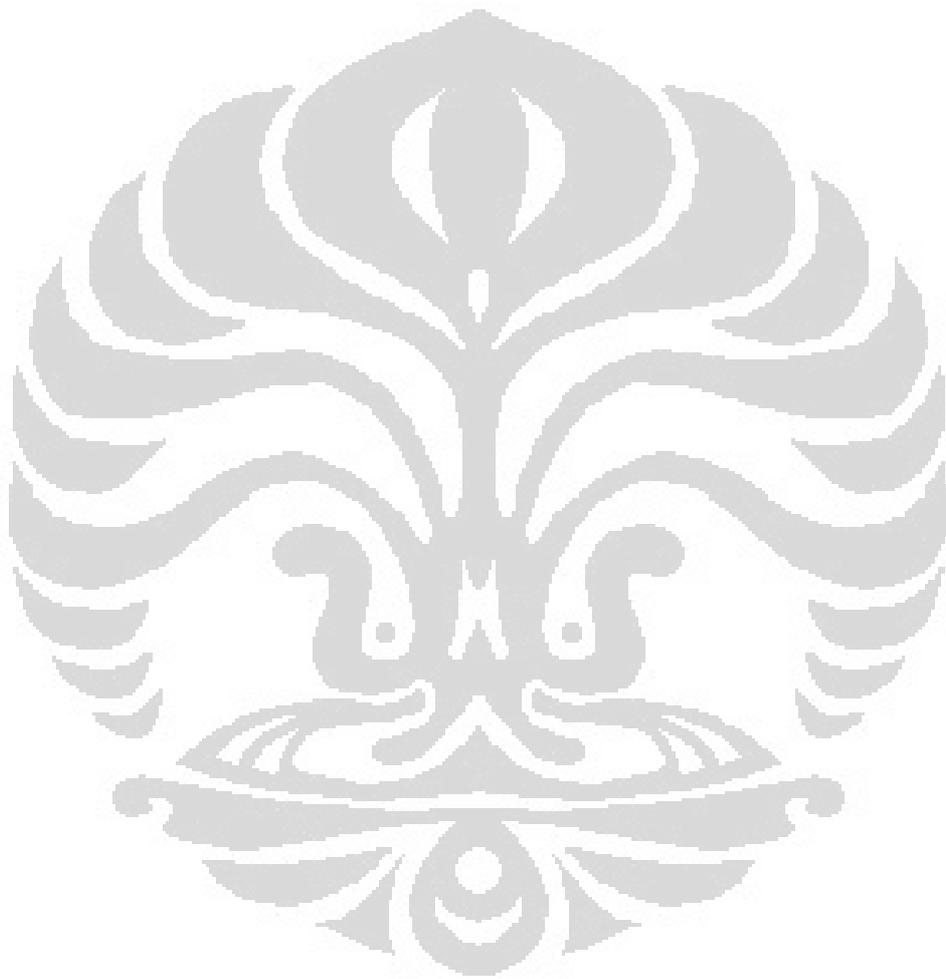

(Eko Winarno)

ABSTRAK

Nama : Eko Winarno
Program Studi : Biologi
Title : Uji Sitotoksik Ekstrak Kapang *Aspergillus sp.* Terhadap Sel Kanker Payudara T47D

Aspergillus sp. dapat digunakan sebagai sumber senyawa bioaktif untuk menemukan obat-obatan baru antikanker. Penelitian bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak *Aspergillus sp.*. *Aspergillus sp.* diisolasi dari *Halymenia durvillaei* yang diambil dari Pantai Binuangeun, Banten Selatan. *Aspergillus sp.* dikultivasi selama empat minggu pada suhu 27--29°C dalam medium *Malt Extract* (ME) pada kondisi statis. Senyawa metabolit sekunder dari medium kultur (*broth*) diekstraksi dengan etil asetat (2:1) sedangkan dari miselium diekstraksi dengan campuran metanol dan n-heksan (1:1). Uji sitotoksik dilakukan menggunakan sel kanker payudara T47D dengan metode uji 3-[4,5-dimetilthiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT). Hasil ekstraksi diperoleh ekstrak *broth* dan miselium sebesar 18,30 g dan 0,93 g. Uji sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan metode MTT menghasilkan nilai IC₅₀ untuk ekstrak *broth* dan miselium sebesar 153,266 ppm dan 208,305 ppm.

Kata kunci : *Aspergillus sp.*, ekstraksi, sel kanker payudara T47D, uji MTT
xii + 54 hlm; 13 gambar; 6 tabel
Daftar referensi: 55 (1984--2011)



ABSTRACT

Name : Eko Winarno
Program Study: Biology
Title : Cytotoxic Assay of Extract *Aspergillus sp.* Mould Againsts Mammae Cancer Cell T47D.

Many *Aspergillus sp.* were used as bioactive compound resources for obtaining a new anticancer. The aims of the research were to study cytotoxic activity of extract *Aspergillus sp.* againsts Mammae Cancer Cell T47D. *Aspergillus sp.* was isolated from *Halymenia durvillaei* collected from Binuangeun Beach, South Banten. *Aspergillus sp.* was cultivated in medium ME (broth) for four weeks at room temperature at 27--29°C. Secondary metabolite produced from broth culture was extracted using ethyl acetate (2:1) and from the mycelium was sonicated followed by extraction using methanol and n-hexan (1:1). Cytotoxic assay of Mammae Cancer Cell T47D was carried out by 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT) method. The yield of extract from broth and mycelium were 18,30 g and 0,93 g, respectively. Cytotoxic assay of Mammae Cancer Cell T47D resulted of IC₅₀ 153,266 ppm and 208,305 ppm for broth and mycelium extract.

Key words : *Aspergillus sp.*, extraction, Mammae Cancer Cell T47D, MTT assay
xii + 54 pages; 13 pictures; 6 tables
Bibliography : 55 (1984--2011)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMBUNG	i
HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1 <i>Aspergillus sp.</i>	3
2.2 Metabolit Primer dan Sekunder	4
2.3 Uji Sitotoksik	4
2.4 Kanker	5
2.4.1 Pengertian	5
2.4.2 Kanker payudara T47D	6
2.5 Kultivasi	8
2.6 Ekstraksi	8
2.7 Uji 3-[4,5-dimetilthiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT)	10
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN	12
3.1 Lokasi dan waktu penelitian	12
3.2 Alat	12
3.3 Bahan	12
3.3.1 <i>Aspergillus sp.</i>	12
3.3.2 Medium	14
3.3.3 Bahan kimia	14

3.4 Cara Kerja	13
3.4.1 Pembuatan Medium	14
3.4.1.1 <i>Artificial Seawater</i> (ASW)	14
3.4.1.2 Medium <i>Malt Extract Agar</i> (MEA)	14
3.4.4.3 Medium <i>Roswell Park memorial Institute</i> (RPMI)	15
3.4.2 Kultivasi Kapang Dalam Media Produksi	16
3.4.3 Ekstraksi Senyawa Bioaktif Hasil Kultivasi	17
3.4.4 Persiapan Uji Sitotoksitas	19
3.4.4.1 Pencairan Sel (<i>Cell thawing</i>)	19
3.4.4.2 Pembiakan Sel T47D	19
3.4.5 Pengujian Antikanker (Uji MTT)	19
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1 Kultivasi	24
4.2 Ekstraksi	26
4.3 Uji Sitotoksik Ekstrak Kapang dengan Metode MTT	29
4.4.1 Ekstrak <i>Broth</i>	31
4.4.2 Ekstrak Miselium	36
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1 Kesimpulan	43
5.2 Saran	43
BAB 6 DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.4.1	Bagan cara kerja	13
Gambar 3.4.2	Skema pembuatan medium MEA	15
Gambar 3.4.3	Skema kultivasi kapang <i>Aspergillus sp.</i>	16
Gambar 3.4.4	Skema ekstraksi kapang <i>Aspergillus sp.</i>	18
Gambar 3.4.5	Skema uji MTT	21
Gambar 4.1.1	Isolat kapang <i>Aspergillus sp.</i> dalam media cair ME	24
Gambar 4.3.1	Prinsip uji sitotoksik menggunakan metode MTT	29
Gambar 4.3.1.1	Hubungan antara nilai log konsentrasi dengan nilai probit dari hasil uji MTT ekstrak <i>broth</i> terhadap sel T47D.....	32
Gambar 4.3.1.2	Efek paparan ekstrak <i>broth</i> terhadap morfologi sel T47D.	33
Gambar 4.3.1.3	Kristal formazan yang terbentuk setelah perlakuan dengan MTT (perbesaran 400 x).....	34
Gambar 4.3.2.1	Hubungan antara nilai log konsentrasi dengan nilai probit hasil uji MTT ekstrak miselium terhadap sel T47D.....	36
Gambar 4.3.2.2	Efek paparan ekstrak miselium terhadap morfologi sel T47D	37
Gambar 4.3.2.3	Kristal formazan yang terbentuk setelah perlakuan dengan MTT (perbesaran 400 x)	38

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.4.2.1 Pola penyakit kanker	7
Table 2.6.1 Tingkat toksisitas beberapa pelarut organik	9
Tabel 4.3.1.1 Hasil uji MTT dari ekstrak <i>broth</i> kapang <i>Aspergillus sp.</i> ...	32
Table 4.3.1.2 Analisis probit uji MTT dari ekstrak <i>broth</i> kapang <i>Aspergillus sp.</i>	33
Tabel 4.3.2.1 Hasil uji MTT dari ekstrak miselium kapang <i>Aspergillus</i> <i>sp.</i>	38
Table 4.3.2.2 Analisis probit uji MTT dari ekstrak miselium kapang <i>Aspergillus sp.</i>	39

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Tabel analisis probit	51
Lampiran 2. Perhitungan hasil uji sitotoksitas dengan metode MTT ekstrak <i>broth</i> terhadap sel T47D dan perhitungan persamaan regresi antara log dosis dengan probit.....	52
Lampiran 3. Perhitungan hasil uji sitotoksitas dengan metode MTT ekstrak miselium terhadap sel T47D dan perhitungan persamaan regresi antara log dosis dengan probit.....	53
Lampiran 4. Perhitungan jumlah sel kanker payudara T47D	54

BAB 1

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan penyebab kematian tertinggi pada wanita di berbagai belahan dunia. Penderita kanker payudara di Indonesia menempati posisi kedua sebesar 12,10 % setelah kanker serviks (19,18%) (Meiyanto *dkk.* 2006: 7). Angka kejadian kanker payudara jauh lebih besar pada wanita dibanding laki-laki. Kemungkinan laki-laki terkena kanker payudara adalah 1 : 100 dari wanita (Heti 2008: 2). Dua pertiga dari penderita kanker payudara di dunia berada di negara-negara yang sedang berkembang termasuk Indonesia (Amalina 2008: 1).

Penelitian untuk mendapatkan obat antikanker dari alam semakin meningkat. Hal tersebut disebabkan semakin meningkatnya angka kejadian kanker dan adanya beberapa kelemahan obat kanker yang sudah ada. Obat kanker pada umumnya bekerja tidak selektif karena memiliki mekanisme kerja merusak DNA baik pada sel normal maupun sel kanker (Da'i 2004: 2). Banyak obat kanker dengan indikasi *therapeutic* rendah. Selain itu, obat-obat kanker tersebut menimbulkan efek samping dan efek resisten (Fajarningsih *dkk.* 2006: 38). Obat antikanker yang ideal seharusnya cepat membunuh sel kanker tanpa membahayakan jaringan normal. Sampai sekarang belum ditemukan obat-obatan yang memenuhi kriteria tersebut sehingga perlu dikembangkan obat baru dengan efek terapi yang baik (Heti 2008:2). Salah satu cara yang dilakukan adalah dengan pencarian senyawa-senyawa alam yang berasal dari mikroorganisme laut, salah satunya yaitu kapang laut.

Aspergillus merupakan organisme multiselular yang berbentuk benang (hifa) dan hifa bercabang-cabang membentuk miselium (Klich 2002: 3). *Aspergillus* pada umumnya hidup di lingkungan terestrial, tetapi ada yang hidup di lingkungan air laut (Jarotrustono 2009:1). *Aspergillus* yang hidup di lingkungan air laut memiliki kemampuan untuk mensintesis senyawa bioaktif sebagai bentuk adaptasi terhadap kondisi lingkungan laut yang ekstrim. Kondisi ekstrim seperti salinitas tinggi, tekanan tinggi, variasi suhu, kompetisi dengan bakteri, virus dan kapang lain, diduga

menyebabkan *Aspergillus sp.* mampu mengembangkan senyawa metabolit spesifik yang berbeda dengan *Aspergillus sp.* yang hidup di lingkungan terestial (Nursid *dkk.* 2010: 105). Hal tersebut mendorong eksplorasi lebih lanjut terhadap *Aspergillus sp.* yang hidup di lingkungan laut untuk mengetahui dan mendapatkan metabolit sekunder lainnya yang bermanfaat dalam produksi obat-obatan (Nursid *dkk.* 2010: 105).

Aspergillus sp. diperoleh dari koleksi biakan Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan yang merupakan hasil penapisan awal kapang yang berasal dari *Halymenia durvillaei*. *Halymenia durvillaei* merupakan sampel rumput laut dengan kode B-10-09 yang diambil dari Pantai Binuangeun, Banten Selatan. Tahap penapisan dilanjutkan dengan pemurnian menghasilkan 13 isolat isolat kapang. Sebanyak 13 isolat kapang tersebut dikultur dalam media *Malt Extract* (ME). Ekstrak kasar etil asetat kapang-kapang tersebut diuji terhadap sel kanker payudara T47D. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian 30 ppm ekstrak kasar kapang *Aspergillus sp.* selama 48 jam mampu menyebabkan kematian populasi sel T47D.

Hasil penelitian Nursid (2009) menunjukkan bahwa ekstrak kapang *Aspergillus sp.* memiliki potensi sebagai bahan dasar obat antikanker. Oleh karena itu, perlu penelitian lebih lanjut terhadap ekstrak tersebut. Dalam penelitian ini, uji sitotoksik ekstrak kapang *Aspergillus sp.* dilakukan terhadap sel kanker payudara T47D dengan metode 3-[4,5-dimetilthiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT). Uji MTT ekstrak kapang *Aspergillus sp.* dilakukan pada seri dosis 16, 32, 64, 128 dan 256 ppm. Parameter yang diukur adalah persen (%) kematian sel dan pembentukan kristal formazan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak kapang *Aspergillus sp.* terhadap sel kanker payudara T47D.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Aspergillus sp.*

Aspergillus merupakan organisme multiselular yang berbentuk benang (hifa) dan hifa bercabang-cabang membentuk miselium. *Aspergillus* dicirikan oleh konidiospor yang khas. Dasar konidiofor biasanya berbentuk “T” atau bentuk “L” yang disebut *foot cell*. Vesikel memiliki bentuk yang bervariasi. Fialid dapat tumbuh langsung dari vesikel. Bentuk tersebut disebut dengan *uniseriate*. Pada beberapa spesies, terdapat sel yang tumbuh di antara fialid dengan vesikel. Lapisan tersebut disebut metula dan *Aspergillus* yang memiliki metula disebut *biseriate* (Klich 2002: 3).

Aspergillus hidup sebagai saprofit di dalam tanah, di kotoran hewan dan sebagai parasit pada tumbuhan. *Aspergillus* pada umumnya hidup di lingkungan terestrial, tetapi ada yang hidup di lingkungan air laut (Jarotrusiono 2009:1). *Aspergillus* yang hidup di lingkungan air laut termasuk ke dalam golongan kapang laut. Kapang laut merupakan kapang yang berasal dari lingkungan darat atau air tawar yang dapat tumbuh dan bersporulasi di lingkungan laut. Kapang laut memiliki kemampuan untuk mensintesis senyawa bioaktif sebagai bentuk adaptasi terhadap kondisi lingkungan laut yang ekstrim. Kondisi ekstrim seperti salinitas tinggi, tekanan tinggi, variasi suhu, kompetisi dengan bakteri, virus dan kapang lain, diduga menyebabkan kapang laut mampu mengembangkan senyawa metabolit spesifik yang berbeda dengan kapang terestrial. *Aspergillus* merupakan fungi laut fakultatif (*fakultative marine fungi*) yaitu fungi yang berasal dari lingkungan darat atau air tawar yang dapat tumbuh dan bersporulasi di lingkungan laut (Nursid dkk. 2010: 105).

Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh genus *Aspergillus* antara lain *terphenyllin*, *chlorflavonin*, *dechloroflavonin*, *xanthoascin*, asam kojic, asam 3-nitro-propionat, asam 6-sulfoaminopenicillanic dan citrinin (Varga *dkk.*2007: 75).

Terphennylin merupakan senyawa yang berasal dari golongan polifenol.

Clorflavonin dan dechloroflavonin merupakan senyawa yang berasal dari golongan flavonoid. Polifenol dan flavonoid diketahui mampu menghambat pertumbuhan sel kanker (Meiyanto *dkk.* 2008: 17).

2.2 Metabolit Primer dan Sekunder

Metabolit primer adalah senyawa yang berperan dalam penyediaan nutrisi dan terlibat dalam proses metabolisme penting di dalam tubuh sebagai *fundamental building block* kehidupan, misalnya: polisakarida, lemak, asam nukleat dan protein.

Sedangkan metabolit sekunder adalah bahan kimia yang dihasilkan melalui reaksi metabolisme sekunder dari bahan organik primer (karbohidrat, lemak, protein).

Umumnya metabolit sekunder tidak esensial untuk pertumbuhan dan perkembangan, tetapi berfungsi sebagai perlindungan diri; penarik serangga atau hewan penyerbuk dan penyebar biji, dan agen alelopati yang berperan dalam kompetisi antar spesies tumbuhan. Golongan senyawa metabolit sekunder terdiri atas golongan terpenoid, steroid, flavonoid, fenolik, poliketida, dan alkaloid (Rahardjo 2011: 1).

2.3 Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik merupakan uji invitro dengan menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi tingkat ketoksikan suatu senyawa. Sistem tersebut merupakan uji kualitatif dengan menetapkan kematian sel. Dasar dari percobaan tersebut antara lain bahwa sistem penetapan aktivitas biologis seharusnya memberikan kurva dosis respon yang menunjukkan hubungan lurus dengan jumlah sel (Anggriati 2008: 22).

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50 % dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai IC_{50} yang menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Senyawa sitotoksik adalah senyawa yang bersifat toksik pada sel. Uji sitotoksik dapat memberikan informasi konsentrasi obat yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Akhir dari uji sitotoksik adalah memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Amalina 2008:16)

2.4 Kanker

2.4.1 Pengertian

Kanker adalah suatu penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan sebelahnya (*invasi*) atau dengan migrasi sel lainnya (*metastasis*) (Amalina 2008: 1). Pertumbuhan tidak terkendali tersebut disebabkan karena adanya kerusakan DNA yang menyebabkan mutasi di gen pengatur pembelahan sel. Beberapa mutasi tersebut akan menyebabkan perubahan sel normal menjadi sel kanker. Mutasi-mutasi tersebut sering diakibatkan oleh agen kimia maupun fisik yang disebut karsinogen. Mutasi dapat terjadi secara spontan ataupun diwariskan (mutasi *germline*) (Heti 2008: 4).

Kanker merupakan suatu neoplasma yang terdiri dari tumor jinak (*benign*) dan tumor ganas (*malignant*) (Kennia 2008: 1). Tumor ganas bermetastasis dan tumor jinak tidak bermetastasis. Perbandingan antara inti sel dengan sitoplasma tumor ganas 1:1, sedangkan tumor jinak 1:4 (sama dengan sel normal). Pada tumor ganas terdapat pleomorfi yaitu bentuk dan ukuran inti sel yang berbeda-beda, terdapat pula sel etia yaitu sel yang mempunyai inti lebih dari satu. Pada tumor ganas tidak

terdapat anaplasia (dediferensiasi) yang berarti kehilangan kemampuan untuk berdiferensiasi sel (Amalina 2008: 7 & Rostika 2010: 1).

2.4.2 Kanker payudara (Sel T47D)

Sel T47D merupakan *continous cell lines* yang dikultur dari jaringan epitel duktus payudara seorang wanita. *Cell line* adalah sel yang disubkultur dari *primary cultures*, yaitu sel dari organ atau jaringan yang dikultur dalam kondisi hormonal yang sesuai. Media yang digunakan pada sel T47D adalah *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 serum. Media RPMI mengandung nutrisi yang dibutuhkan sel seperti asam amino, vitamin, garam-garam anorganik, dan glukosa. Serum mengandung hormon pertumbuhan sel, albumin merupakan protein transport, lipid diperlukan untuk pertumbuhan sel, dan mineral merupakan kofaktor enzim. Seluruh komponen dalam media RPMI tersebut berguna untuk memberikan nutrisi yang cukup pada sel untuk tetap bertahan hidup dan memperbanyak diri (Amalina 2008: 14).

Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang menyebabkan kematian tertinggi kedua di Indonesia. Hal tersebut disebabkan karena hampir sebagian besar penyakit kanker payudara ditemukan pada stadium lanjut. Diagnosis kanker payudara dapat diketahui melalui pemeriksaan seperti mamografi, ultrasonografi dan lainnya (Supit 2000: 52).

Tabel 2.4.2.1 Pola penyakit kanker

[Sumber: Supit 2000: 53].

No.	Kanker	Jumlah kasus	Frekuensi relatif
1	Leher rahim	3.110	25,57 %
2	Payudara wanita	1.925	15,83 %
3	Limfoid sekunder	1.523	12,52 %
4	Kulit	1.394	11,46 %
5	Nesofaring	950	7,80 %
6	Ovarium	803	6,60 %
7	Rektum	735	6,04 %
8	Jaringan ikat	708	5,82 %

Di negara-negara maju pemeriksaan mamografi merupakan pemeriksaan rutin dalam kegiatan skrining kanker payudara terutama pada wanita dewasa diatas usia empat puluh tahun. Pada usia tersebut potensi seorang wanita untuk terkena kanker payudara semakin meningkat. Mamografi dianggap sebagai satu-satunya sarana pemeriksaan dengan akurasi tinggi untuk deteksi dini kanker payudara (Supit 2000: 53--59).

Kelainan yang ditemukan pada mamografi berupa tanda-tanda primer dan tanda-tanda sekunder. Tanda-tanda primer yaitu bayangan kontras relatif meningkat karena adanya pertumbuhan dari sel-sel tumor. Bayangan kanker payudara semakin jelas dan terang yang disebabkan karena sel-sel karsinoma berisi lebih banyak mineral daripada jaringan sekitarnya, dan terjadi pendarahan yang menyebabkan adanya endapan hemosiderin. Tanda-tanda sekunder meliputi retraksi kulit, penebalan kulit, perubahan posisi papilla atau aerola, dan infiltrasi dalam jaringan lemak dibelakang payudara (Supit 2000: 53--59).

2.5 Kultivasi

Pertumbuhan mikroorganisme pada umumnya sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Perubahan faktor lingkungan dapat mengakibatkan perubahan sifat morfologi dan fisiologi. Hal tersebut dikarenakan mikroorganisme selain membutuhkan nutrisi yang sesuai juga memerlukan faktor lingkungan yang memungkinkan pertumbuhan secara optimum. Faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme meliputi nutrisi, waktu, suhu, air, pH dan ketersediaan oksigen (Niawanti 2011: 1).

Medium memiliki peran penting dalam proses kultivasi. Susunan dan kadar nutrisi dalam suatu medium harus seimbang agar pertumbuhan mikroorganisme optimum. Hal tersebut harus diperhatikan karena banyak senyawa-senyawa yang menjadi penghambat jika kadarnya terlalu tinggi (Mulyati 2009:14). Kelebihan nutrisi, terutama sumber karbon akan menghambat produksi metabolit sekunder (Abraham 2004: 54)

Suhu kultivasi merupakan faktor fisik yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Sintesis dan sekresi metabolit sekunder juga sangat dipengaruhi oleh suhu kultivasi. Semua proses pertumbuhan dipengaruhi oleh reaksi kimia dan suhu mempengaruhi laju reaksi kimia tersebut. Enzim akan mengalami denaturasi pada suhu terlalu tinggi dan menjadi tidak aktif pada suhu yang terlalu rendah (Aryantha *dkk.* 2004: 13).

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen atau zat aktif suatu sampel dengan menggunakan pelarut tertentu. Metode ekstraksi senyawa dipengaruhi oleh faktor sifat kandungan zat aktif atau kelarutan dalam pelarut. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam pelarut non polar (Amalina 2008: 6; Fahri 2010: 1). Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi

adalah pelarut non polar (n-heksan), pelarut semi polar (diklorometan atau etil asetat) dan pelarut polar (metanol atau etanol) (Fahri 2010: 1).

Dalam proses ekstraksi, terjadi peristiwa difusi pelarut ke dalam sel bahan. Pelarut yang masuk ke dalam sel bahan tersebut akan melarutkan senyawa bila kelarutan senyawa yang diekstrak sama dengan pelarut. Dengan cara tersebut akan tercapai kesetimbangan antara zat terlarut dan pelarut. Pengeluaran bahan aktif dari bahan tergantung kepada laju difusi substansi dari serbuk bahan ke dalam pelarut, waktu kontak dan laju pelarut menembus bahan. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi kecepatan ekstraksi, yaitu penanganan pendahuluan, lama ekstraksi, suhu dan tipe pelarut yang digunakan (Nurmillah 2009: 7).

Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah obat dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak. Sifat bahan mentah obat merupakan faktor utama yang dipertimbangkan dalam memilih metode ekstraksi (Heti 2008: 17--18). Pelarut yang digunakan pada saat ekstraksi harus memenuhi syarat tertentu yaitu tidak toksik, tidak meninggalkan residu, harganya murah, tidak korosif, aman, dan tidak mudah meledak (Nurmillah 2009: 8).

Tabel 2.6.1 Tingkat toksisitas beberapa pelarut organik

[Sumber: Nurmillah 2009: 9].

Tingkat toksisitas		
Rendah	Tinggi	Karsinogenik
Aseton Diklorometan Dietil eter Dimetil sulfoksida Etanol Etil asetat Heksan	Asetonitril Karbon disulfida Tetrahidrofur Toluen	Benzen Karbon tetraklorida Kloroform Dimetil formadida

Maserasi berasal dari bahasa Latin *macerare*, yang artinya merendam. Maserasi merupakan proses penyarian dengan cara merendam sampel menggunakan pelarut sampai dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan. Dalam proses maserasi, sampel yang akan diekstraksi ditempatkan pada wadah atau bejana, bejana ditutup rapat dan isinya dikocok berulang-ulang. Maserasi biasanya dilakukan dalam waktu tiga hari sampai bahan-bahan yang larut melarut (Amalina 2008:6).

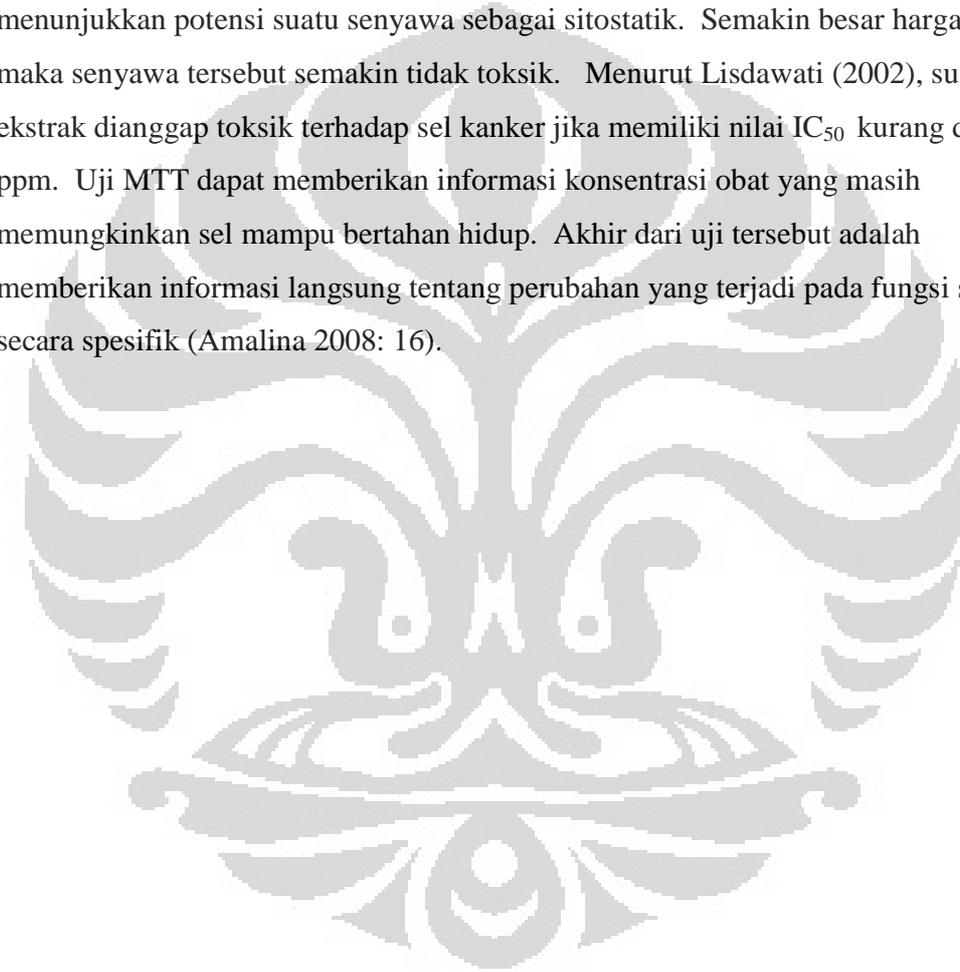
2.7 Uji 3-[4,5-dimetilthiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT)

Uji MTT adalah uji yang sensitif, kuantitatif dan terpercaya. Reaksi MTT merupakan reaksi reduksi selular yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT berwarna kuning menjadi kristal formazan berwarna biru keunguan (Basmal dkk. 2009: 2). Metode perubahan warna tersebut digunakan untuk mendeteksi adanya proliferasi sel. Sel yang mengalami proliferasi, mitokondria akan menyerap MTT sehingga sel-sel tersebut akan berwarna ungu akibat terbentuknya kristal tetrazolium (formazan) (Depamede dkk. 2009: 97).

Prinsip uji MTT adalah mengukur aktivitas selular berdasarkan kemampuan enzim *mitokondria reduktase* pada mitokondria dalam mereduksi garam *Methylthiazol Tetrazolium* (MTT). Ketika bermetabolisme, sel-sel hidup akan menghasilkan enzim *mitokondria reduktase*. Enzim ini bereaksi dengan MTT dan membentuk kristal formazan berwarna ungu. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup, sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka jumlah sel hidup semakin banyak (Junedi 2000: 1). Kristal formazan bersifat impermeabel pada membran sel dan tidak larut dalam air. Perlu suatu zat tambahan sebagai pelarut seperti isopropanol, *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) atau larutan detergen *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) yang diencerkan dalam asam hidroklorida (HCl) untuk melarutkan kristal formazan ungu. *Optical Density* (OD) menunjukkan nilai absorbansi dari suatu kristal formazan yang telah dilarutkan diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 490 sampai 570

nm (Heti 2008: 14). Nilai absorban ini menunjukkan tingkat daya proliferasi sel sebagai manifestasi tingkat kekebalan selular (Berata 2000: 4).

Uji MTT digunakan untuk menentukan parameter nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50 % dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai tersebut merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC_{50} menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitostatik. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Menurut Lisdawati (2002), suatu ekstrak dianggap toksik terhadap sel kanker jika memiliki nilai IC_{50} kurang dari 1000 ppm. Uji MTT dapat memberikan informasi konsentrasi obat yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Akhir dari uji tersebut adalah memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Amalina 2008: 16).



BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jakarta pada bulan Juli sampai November 2010.

3.2 Alat

Peralatan yang digunakan adalah autoklaf [Hirayama], autoklaf [American Model No. 25X], kompor listrik [Maspion], lemari pendingin [Clasio], lemari pendingin [Samsung], laminator [ESCO], Deep Freezer [Snijders Scientific b. v], mikropipet [Socorex], oven [Conterm], timbangan digital [Mettler PE 360], timbangan analitik [Mettler AE 100], timbangan analitik [Mettler Toledo], vortex [Thermolyne tipe Maxi Mix II], mikroskop + kamera [Olympus], kamera foto [Canon], rak tabung reaksi, *96-well plate*, *conical tube* dan *ELISA reader*. Peralatan habis pakai yang digunakan adalah aluminium foil, kapas, tabung sentrifugasi, sarung tangan sekali pakai dan tisu. Peralatan gelas yang dipakai adalah batang pengaduk, *beacker glass*, cawan petri, gelas ukur, labu Erlenmeyer, tabung reaksi, pipet berbagai ukuran, dan spatula.

3.3 Bahan

3.3.1 Kapang *Aspergillus sp.*

Isolat kapang *Aspergillus sp.* diperoleh dari koleksi biakan Laboratorium Bioteknologi Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Isolat diisolasi dari *Halymenia durvillaei* yang diperoleh dari pantai Binuangeun, Banten Selatan.

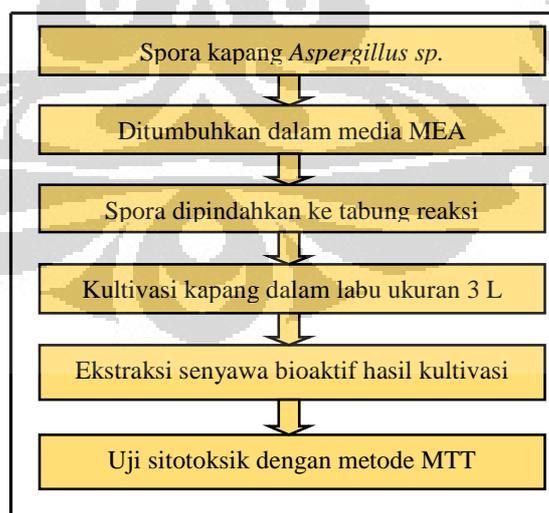
3.3.2 Medium

Medium untuk mengkultur kapang *Aspergillus sp.* adalah *Malt Extract Agar* (MEA). Medium untuk mengkultur sel adalah *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI).

3.3.3 Bahan kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah ekstrak khamir [OXOID], ekstrak *malt* [OXOID], pepton [OXOID], agar [OXOID], *glucose* [Merck], NaCl [Merck], KCl [Merck], Na₂SO₄ [Merck], MgCl₂.6H₂O [Merck], CaCl₂ [Merck], MTT [Sigma Chemical Co USA], sodium dodesil sulfat (SDS), streptomisin, *Artificial Sea Water* (ASW), bubuk RPMI, Fetal Bovine Serum (FBS), etil asetat, metanol, n-heksan, Sodium Dedosil Sulfat (SDS), MTT, Dimetil Sulfoksida (DMSO), alkohol teknis, spiritus teknis, dan aseton teknis.

3.4 Cara Kerja



Gambar 3.4.1 Bagan cara kerja

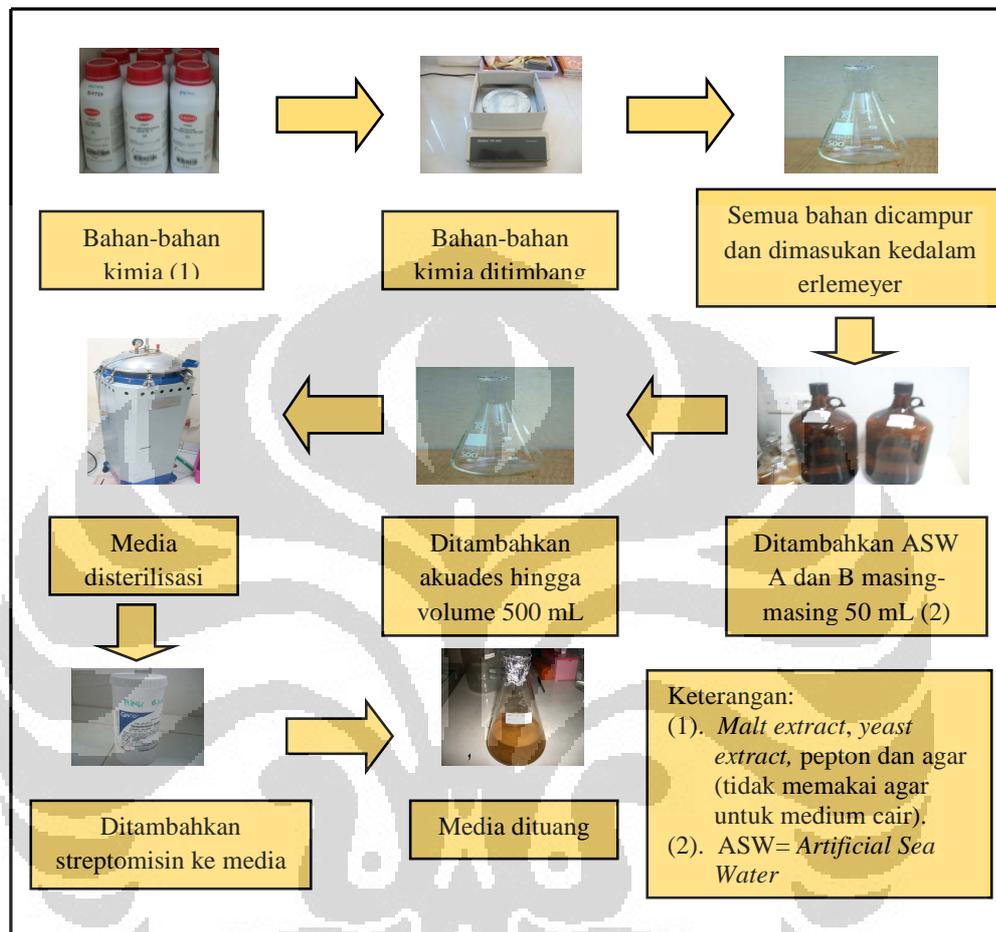
3.4.1 Pembuatan Medium

3.4.4.1 *Artificial Seawater* (ASW)

Artificial Seawater (ASW) terdiri dari dua jenis yaitu ASW A dan ASW B. Setiap 2 L ASW A terdiri dari 351 g NaCl, 15 g KCl, dan 5,7 g Na₂SO₄, sementara setiap 2 L ASW B terdiri dari 102 g MgCl₂.6H₂O dan 2,9 g CaCl₂. Kedua jenis ASW tersebut ditambahkan akuades hingga mencapai volume 2 L (Pratitis *dkk.* 2009: 1).

3.4.4.2 Medium *Malt Extract Agar* (MEA)

Setiap 500 mL medium MEA terdiri dari 1,5 g *malt extract*; 1,5 g *yeast extract*; 2,5 g pepton; dan 7,5 g agar. Semua bahan dicampur di dalam labu Erlenmeyer, kemudian ditambahkan 50 mL ASW A dan 50 mL ASW B. Akuades ditambahkan ke dalam labu hingga volume menjadi 500 mL. Media kemudian disterilisasi pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit. Setelah disterilisasi, media ditunggu sampai suhu mencapai kira-kira 50°C, kemudian ditambahkan 250 mg streptomisin ke dalam media. Medium dituang ke dalam cawan petri steril sebanyak 15--20 mL dan dibiarkan mengeras (Pratitis *dkk.* 2009: 2).



Gambar 3.4.2 Skema pembuatan medium MEA

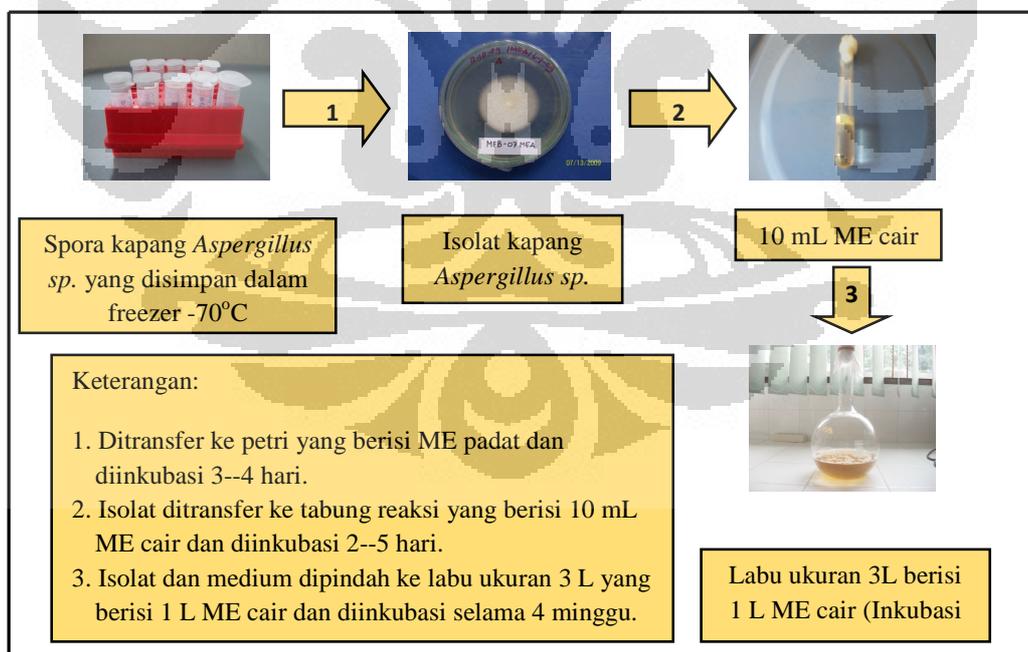
3.4.4.3 Medium *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)

Media kultur dibuat dengan melarutkan 10,4 g bubuk RPMI ke dalam 800 mL akuades, kemudian ditambahkan *4-(2-hydroxyethyl)-1 piperazineethanesulfonic acid* (HEPES) dan NaHCO_3 . Akuades ditambahkan sampai volume 1 L. Campuran dihomogenkan dengan cara diaduk kemudian pH diukur pada 7,2--7,4 dengan cara penambahan 1 M NaOH atau 1 M HCl. Sterilisasi dilakukan dengan cara menyaring

menggunakan saringan membran 0,2 μm , selanjutnya ditambahkan fungison 0,5%, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, dan streptomisin 2% (Gumita 2009: 19).

3.4.2 Kultivasi kapang dalam media produksi

Spora kapang *Aspergillus sp.* yang disimpan dalam freezer -70°C ditumbuhkan menggunakan media MEA pada cawan petri. Setelah tumbuh dengan baik sekitar 5 hari, isolat kapang ditransfer ke tabung reaksi berisi 10 mL medium ME cair dengan cara menginokulasi medium tersebut dengan inokulum kapang. Medium tersebut kemudian diinkubasi pada suhu $25\text{--}27^{\circ}\text{C}$ selama lima hari. Miselia kapang akan tumbuh menutupi seluruh media cair setelah diinkubasi. Medium yang berisi miselia kapang tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukuran 3 L berisi 1 L media ME cair. Media berisi kapang diinkubasi pada suhu $27\text{--}29^{\circ}\text{C}$ dalam kondisi statis selama empat minggu (Nurrahmi *dkk.* 2006: 38).

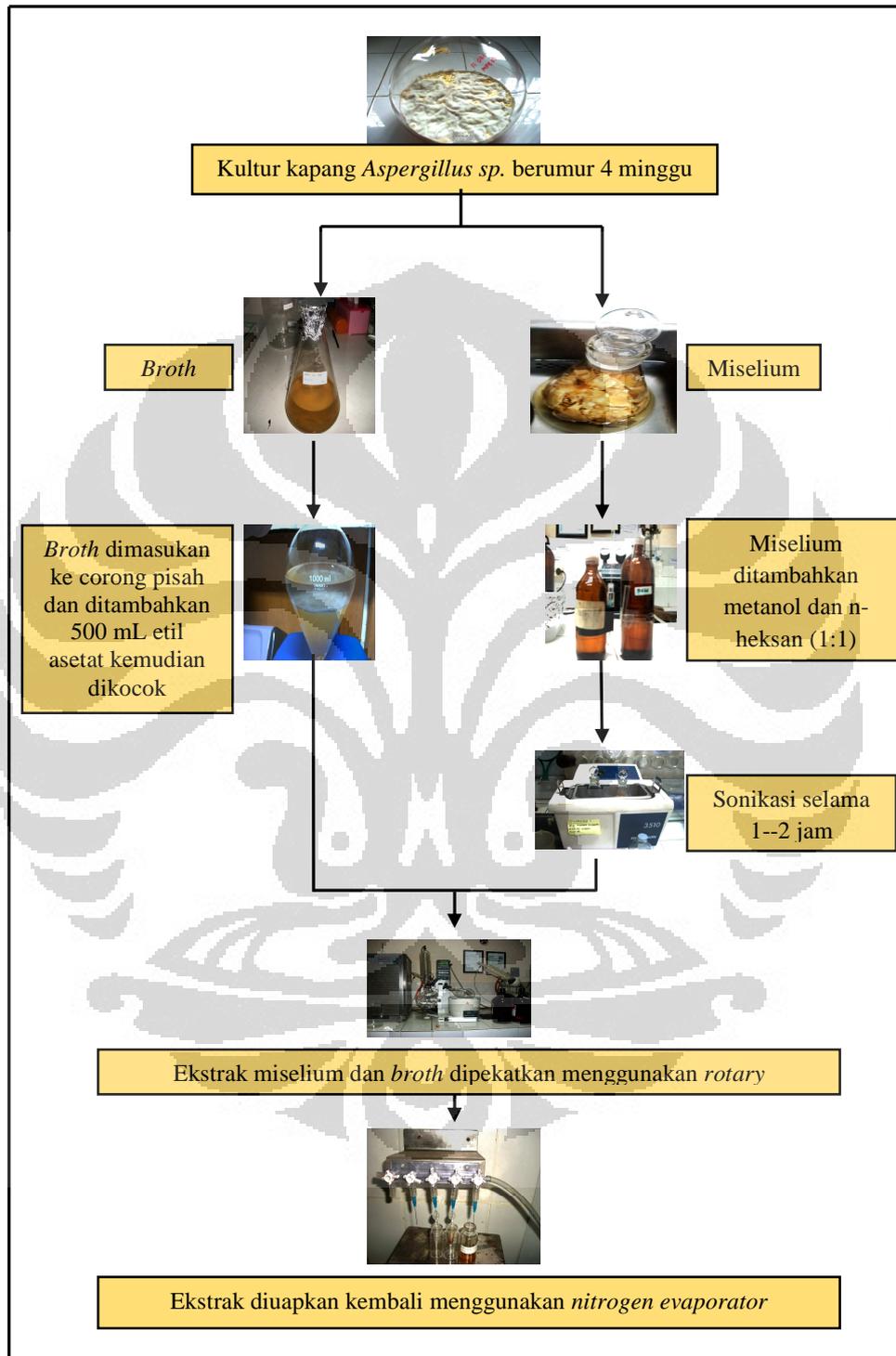


Gambar 3.4.3 Skema kultivasi kapang *Aspergillus sp.*

3.4.3 Ekstraksi senyawa bioaktif hasil kultivasi

Hasil panen kapang diekstraksi untuk mendapatkan ekstrak kapang. Proses ekstraksi dilakukan dalam dua tahap yaitu ekstraksi *broth* (media kultur) kapang dan ekstraksi miselium. Kultur kapang disaring menggunakan kain kasa, ekstraksi terhadap *broth* dilakukan dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan 2:1, ekstraksi dilakukan di dalam corong pisah volume 2000 mL. Sebanyak 500 mL *etil asetat* ditambahkan ke dalam corong pisah yang berisi *broth* kemudian dikocok selama dua menit dan didiamkan beberapa saat sampai lapisan etil asetat dan media kultur terpisah. Ekstrak etil asetat kemudian diambil dan selanjutnya diuapkan pelarutnya. Proses ini dilakukan sebanyak tiga kali (Nursid *dkk* 2010: 105).

Miselium dikeringkan terlebih dahulu menggunakan *freeze drier* sebelum diekstraksi. Miselium yang sudah kering diekstraksi menggunakan pelarut metanol dan n-heksan dengan perbandingan 1:1 sebanyak 100 mL kemudian disonikasi selama 60 menit. Ekstrak kemudian disaring menggunakan kertas saring sampai didapatkan filtrat. Proses tersebut dilakukan sebanyak tiga kali. Filtrat *broth* dan miselium kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 20--40°C sampai mengental menjadi ekstrak kasar (*crude extract*). Apabila masih terdapat sedikit pelarut maka *crude extract* diuapkan kembali menggunakan *nitrogen evaporator* hingga pelarutnya benar-benar hilang. *Crude extract* selanjutnya ditimbang menggunakan timbangan analitik dan disimpan di dalam botol vial gelap (Nursid *dkk.* 2010: 105).



Gambar 3.4.4 Skema ekstraksi kapang *Aspergillus sp.*

3.4.4 Persiapan Uji Sitotoksik

3.4.4.1. Pencairan sel (*Cell thawing*)

Tabung berisi sel dikeluarkan dari inkubator CO₂. Seluruh cairan sel dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus kemudian ditambahkan 5 mL medium RPMI. Tabung disentrifus dengan kecepatan 1.500 rpm selama lima menit. Setelah itu supernatan dibuang dan *pellet* yang diperoleh disuspensikan dalam 6 mL RPMI. Suspensi sel dipipet dan dimasukkan ke dalam labu kultur kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ selama 1 hari (Gusmita 2009: 19--20).

3.4.4.2. Pembiakan sel T47D

Semua medium RPMI yang berada dalam *flash culture* dibuang, kemudian ditambahkan PBS untuk menghilangkan medium yang masih melekat pada sel T47D. Sel T47D yang masih melekat pada *flash culture* dipisahkan dengan penambahan tripsin, kemudian di sentrifus dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang kemudian ditambahkan medium RPMI sebanyak 1 mL. Kultur dimasukkan dalam *flash culture* (sebagai larutan induk), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator CO₂ dengan kecepatan aliran CO₂ 5 mL/menit (Gusmita 2009: 19--20).

3.5 Pengujian antikanker (Uji MTT)

Metode yang digunakan dalam pengujian antitumor adalah MTT (*3-[4,5-dimetilthiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium bromide*). Uji dilakukan terhadap sel kanker payudara T47D. Sel T47D tersebut dikultur dalam media RPMI 1640 (Nursid *dkk.* 2010: 105). Sebanyak 1 mg ekstrak yang telah kering dilarutkan dalam 1000 µL *Dimetil Sulfoksida* (DMSO). Larutan tersebut digunakan sebagai larutan induk. Selanjutnya ekstrak dibuat seri dosis 16, 32, 64, 128 dan 256 ppm.

Sel dihitung kepadatannya menggunakan hemositometer Neubauer untuk mendapatkan jumlah sel sebanyak $2 \times 10^4/100 \mu\text{L}$. Suspensi sel sebanyak $2 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ didistribusikan ke dalam *microplate 96 well* dan diinkubasi dalam inkubator CO_2 pada suhu 37°C dengan aliran CO_2 5 mL/menit. Satu kolom terakhir dibiarkan kosong untuk diisi kontrol media. Setelah 12 jam, media dibuang dengan cara *microplate* yang berisi sel dikeluarkan dari inkubator CO_2 kemudian *microplate* dibalik 180° untuk membuang sisa media. Kemudian *microplate* ditekan diatas tisu untuk meniriskan sisa cairan media. Sebanyak 100 μL PBS dimasukan kedalam semua sumuran berisi sel. PBS selanjutnya dibuang dengan cara membalikan *microplate* kemudian di tekan diatas tisu untuk meniriskan sisa cairan PBS.

Sebanyak 100 μL media mengandung ekstrak uji dengan seri dosis yang telah dibuat dimasukan ke dalam sumuran *microplate* sebanyak tiga kali ulangan. *Microplate* kemudian diinkubasikan kembali di dalam inkubator CO_2 selama 24--48 jam. Menjelang waktu akhir inkubasi, kondisi setiap sel didokumentasikan. Selanjutnya menyiapkan MTT (0,5 mg/mL) dengan cara mengambil 1 mL stok MTT dalam PBS (5 mg/mL) kemudian diencerkan dengan menambahkan media kultur sebanyak 10 mL untuk satu buah *96 well plate*.

Microplate dikeluarkan dari inkubator CO_2 dan media kultur dibuang kembali dan kemudian tambahkan 100 μL MTT kedalam setiap sumuran termasuk kontrol media. Sel kemudian diinkubasi di inkubator CO_2 selama 2--4 jam. Reaksi MTT dihentikan dengan penambahan *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS) 10%. *Microplate* dibungkus dengan kertas atau aluminium foil dan diinkubasi selama dua belas jam dalam ruang gelap pada suhu kamar. Bungkus kertas atau aluminium foil dan penutup dibuka dan *microplate* dimasukan ke *ELISA reader*. Nilai absorbansi tiap sumuran diukur dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 570 nm. (Junedi 2000: 3--7).

Data absorbansi tiap sumuran digunakan untuk menghitung viabilitas sel T47D yang diberi perlakuan dibandingkan dengan kontrol (tanpa perlakuan). Jumlah sel yang mati dinyatakan dalam % dihitung berdasarkan rumus:

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{(A-D) - (B-C)}{(A-D)} \times 100\%$$

Keterangan:

A = Absorbansi kontrol sel

B = Absorbansi sampel

C = Absorbansi kontrol sampel

D = Absorbansi kontrol media

Kontrol sel = 100 μ L sel + 100 μ L media

Kontrol media = 100 μ L media

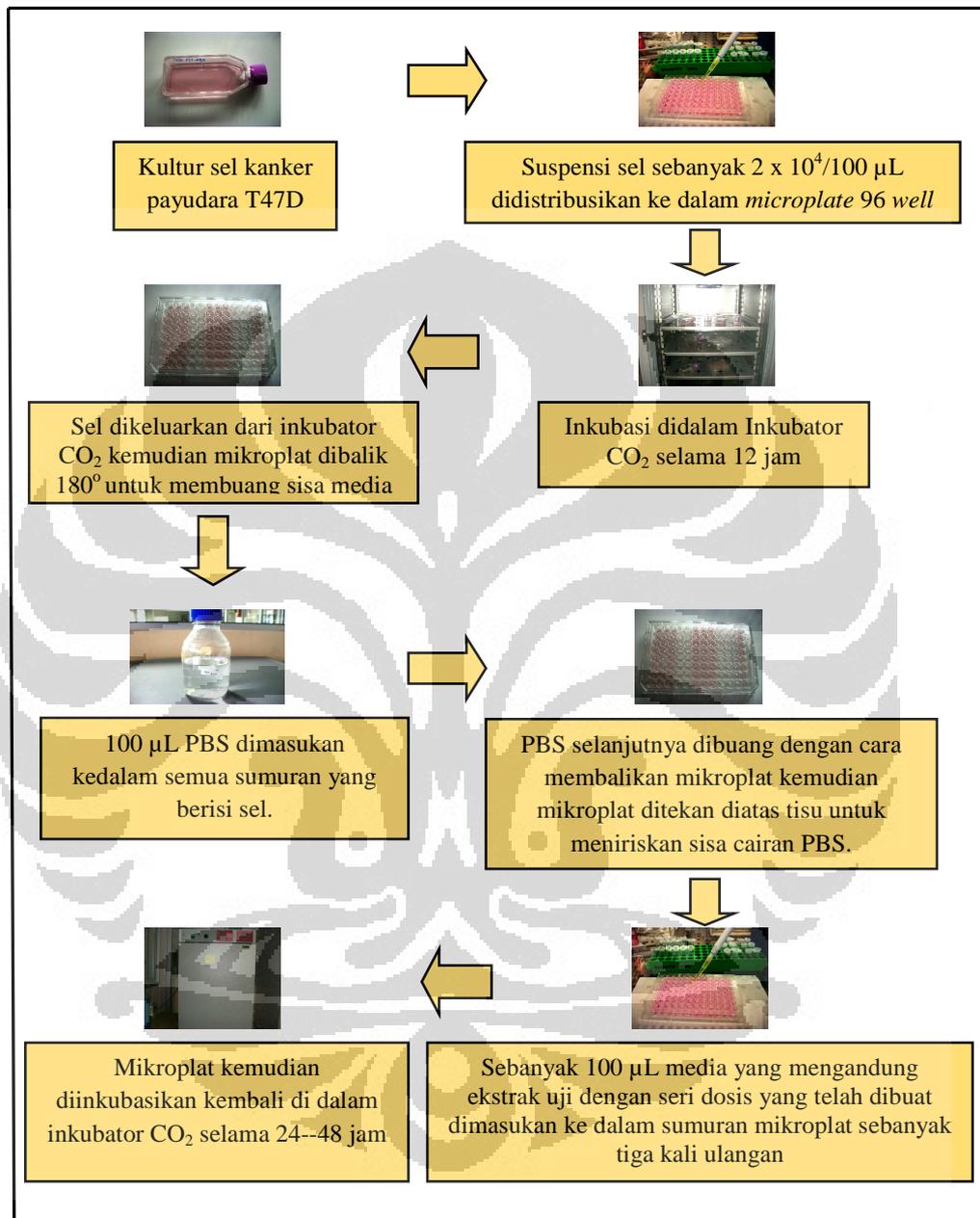
Kontrol sampel = 100 μ L sampel + 100 μ L media

Perlakuan sampel = 100 μ L sampel + 100 μ L sel

(Basmal *dkk.* 2009: 2--3).

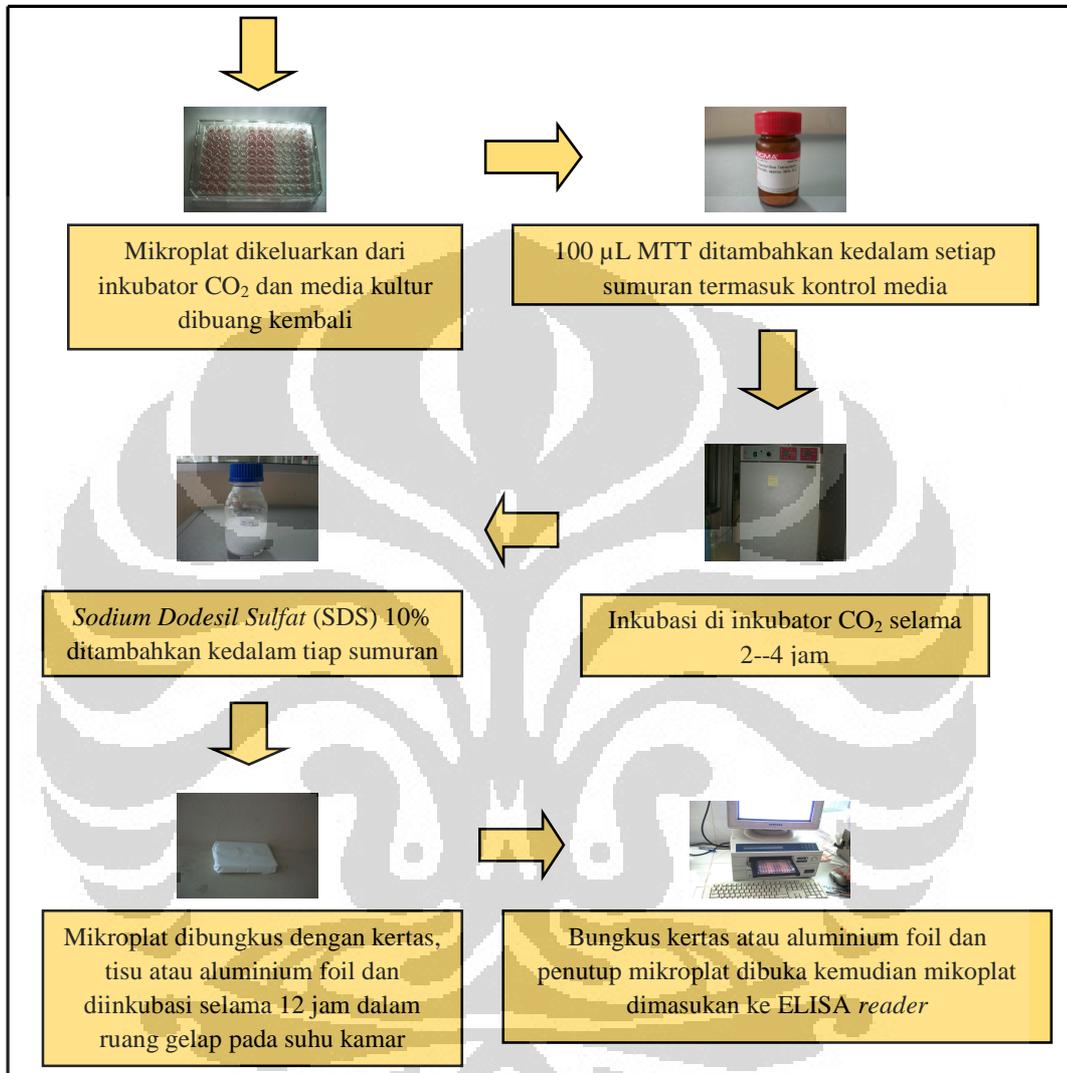
Nilai *Inhibition Concentration*₅₀ (IC₅₀) dihitung dengan analisis probit menggunakan program MINITAB versi 14,0.

(Nursid *dkk.* 2010: 105).



Gambar 3.4.5 Skema Uji MTT

Lanjutan

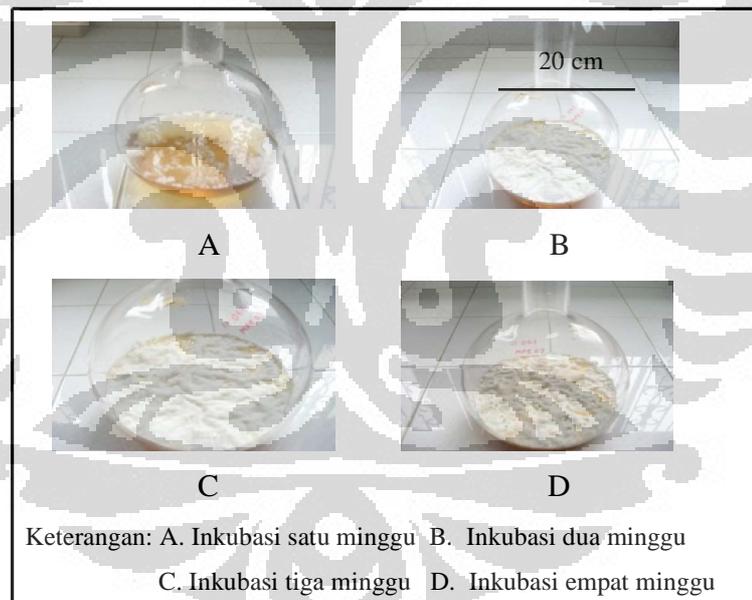


BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kultivasi

Kultivasi kapang *Aspergillus sp.* dilakukan dalam media cair *Malt Extract* (ME) 1L menggunakan labu kultur dengan volume 3 L (Gambar 4.2.1). Kultivasi dilakukan pada suhu 23--27°C, tidak terkena sinar matahari langsung dan getaran (*still culture*). Pengamatan dilakukan setiap satu minggu sekali selama empat minggu. Parameter yang diamati adalah pertumbuhan miselium dan perubahan warna *broth*.



Gambar 4.1.1 Kultivasi kapang *Aspergillus sp.* dalam media cair ME
[Sumber: Dokumentasi pribadi].

Gambar 4.1.1 (A) merupakan kultur kapang berumur satu minggu. Miselium kapang mulai tumbuh di atas permukaan medium. Miselium yang tumbuh berwarna putih dan bergerombol membentuk beberapa koloni. *Broth* berwarna coklat muda

transparan. Gambar 4.1.1 (B) adalah kultur kapang berumur dua minggu. Pada gambar terlihat miselium kapang yang tumbuh menutupi seluruh permukaan medium. *Broth* mulai mengalami perubahan yaitu berwarna coklat muda dan agak keruh.

Gambar 4.1.1 (C) adalah kultur kapang berumur tiga minggu. Pada minggu ketiga, pertumbuhan terus meningkat. Konsentrasi selular atau biomassa meningkat secara signifikan (Astuti & Rahmawati 2010: 188). Miselium kapang tumbuh semakin padat menutupi seluruh permukaan medium. *Broth* berwarna coklat tua dan cukup keruh. Hal tersebut dikarenakan komposisi kimiawi media berubah akibat proses metabolisme sel dimana terjadi sintesis produk dan penggunaan substrat (Mangunwidjaja 1994: 16--17; Scraba 2011: 1). Gambar 4.1.1 (D) adalah kultur kapang berumur empat minggu. Gambar 4.2.1 menunjukkan miselium yang menutupi permukaan medium semakin tebal. *Exudates drops* berwarna orange mulai muncul di atas permukaan miselium.

Media memiliki peran yang sangat penting dalam proses kultivasi. Susunan dan kadar nutrisi dalam suatu media harus seimbang agar pertumbuhan kapang dapat sebaik mungkin. Hal tersebut harus diperhatikan karena banyak senyawa-senyawa yang menjadi penghambat jika kadarnya terlalu tinggi (Mulyati 2009: 14). Kelebihan nutrisi, terutama sumber karbon yang mudah didegradasi akan menghambat produksi metabolit sekunder (Abraham 2004: 54). Komponen media yang baik untuk pertumbuhan kapang *Aspergillus sp.* adalah sumber karbon, nitrogen dan larutan mineral (Prabandari 2003: 2).

Media kultivasi yang digunakan dalam penelitian adalah *Malt Extract* (ME). Media ME mengandung *malt extract* dan pepton. *Malt extract* merupakan sumber karbon sedangkan pepton berperan sebagai sumber nitrogen (Thontowi *dkk.* 2007: 253). *Malt extract* mengandung sekitar 90--92 % karbohidrat berupa monosakarida (glukosa dan fruktosa), disakarida (maltosa dan sukrosa), trisakarida (maltotriosa) dan dextrin (Crueger & Crueger. 1984: 50). Pepton mengandung polipeptida, dipeptida dan asam amino (Fachraniah *dkk.* 2002: 260). Asam amino terbesar penyusun pepton adalah asam glutamat, lisin dan leusin (Crueger & Crueger. 1984: 52). Media kultivasi yang baik seharusnya mengandung semua nutrisi yang dibutuhkan untuk

pertumbuhan, tidak mengandung zat-zat penghambat dan media harus steril (Mulyati 2009: 16). Berdasarkan hal tersebut, media kultivasi yang digunakan diharapkan dapat menyediakan nutrisi yang optimum bagi kapang untuk mensintesis senyawa metabolit sekunder.

Kultivasi kapang dilakukan pada suhu 23--27°C. Suhu optimum untuk pertumbuhan *Aspergillus sp.* adalah antara 25--32°C. Suhu kultivasi merupakan salah satu faktor fisik yang memengaruhi pertumbuhan, sintesis dan sekresi metabolit sekunder. Suhu sangat mempengaruhi pertumbuhan kapang. Semua proses pertumbuhan tergantung reaksi kimiawi dan suhu mempengaruhi laju reaksi-reaksi kimia. Enzim akan mengalami denaturasi pada suhu terlalu tinggi atau menjadi tidak aktif pada suhu yang terlalu rendah (Aryantha dkk. 2004: 13).

Spora atau sel-sel vegetatif dapat dikultivasi pada kultur cair untuk mendapatkan biomassa kapang. Biomassa kapang akan meningkat dengan pembentukan sel vegetatif maupun filament-filamen hifa serta pembentukan miselium. Kultivasi kapang dalam media cair bertujuan untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder tersebut dapat menjawab permasalahan mengenai suplai atau pasokan senyawa bioaktif yang selama ini terjadi. Masalah suplai ini menurut Proksch dkk. (2002) menjadi hambatan utama dalam pengembangan senyawa bioaktif dari organisme laut terutama ketika pengembangan senyawa bioaktif tersebut sedang memasuki evaluasi preklinis dan klinis. Masalah tersebut terjadi karena faktor kecilnya rendemen (*yield*) senyawa bioaktif (Nursid dkk. 2010: 104).

4.2. Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi. Ekstraksi senyawa bioaktif dari kapang *Aspergillus sp.* dilakukan terhadap media kultur (*broth*) dan miselium. Senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada *broth* diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat. Sedangkan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada miselium kapang diekstraksi menggunakan campuran pelarut metanol : n-heksan dengan perbandingan 1:1 (Nursid dkk. 2010: 105). Hasil akhir

proses ekstraksi diperoleh berat ekstrak miselium dan ekstrak *broth* berturut-turut sebesar 18,30 g dan 0,93 g.

Miselium diekstrak menggunakan pelarut metanol dan n-heksan dengan perbandingan 1:1 sebanyak 100 mL kemudian disonikasi selama 60 menit. Sonikasi merupakan suatu proses pengubahan sinyal listrik menjadi getaran mekanis yang dapat diarahkan menuju suatu zat. Tujuan dari sonikasi adalah untuk merusak sel. Getaran yang dihasilkan dapat memecah bagian molekul dan merusak membran sel (Indrani 2010: 1). Membran sel yang rusak menyebabkan hasil-hasil metabolisme terutama senyawa metabolit sekunder yang akan diekstrak akan keluar dari sel (Utami *dkk.* 2009: 2). Miselium dikeringkan terlebih dahulu menggunakan *freeze drier* sebelum diekstraksi supaya kadar air dalam miselium berkurang. Hal tersebut bertujuan agar miselium memiliki kadar air yang cukup rendah untuk dilakukan proses ekstraksi karena semakin rendah nilai kadar air maka semakin memudahkan pelarut untuk mengekstrak komponen senyawa aktif yang diinginkan (Nurmilla 2009: 24).

Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi miselium adalah campuran metanol dan n-heksan. Metanol dapat melarutkan senyawa-senyawa polar tetapi tidak spesifik dalam melarutkan senyawa non polar (Hikmah *dkk.* 2010: 8). Oleh karena itu, ditambahkan n-heksan untuk melarutkan senyawa-senyawa non polar. Penggunaan pelarut n-heksan juga bertujuan untuk memaksimalkan proses penarikan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terdapat di dalam miselium. Pelarut n-heksan merupakan pelarut non polar yang memiliki kemampuan untuk memecah kandungan lemak (lipid) pada membran sel (Fahri 2010: 1). Hal tersebut menyebabkan perubahan komposisi membran sehingga membran sel mengalami kerusakan. Selain itu, komponen non polar juga dapat berinteraksi dengan protein membran yang menyebabkan kebocoran isi sel termasuk senyawa metabolit sekunder yang akan diekstrak. Senyawa-senyawa yang larut oleh n-heksan adalah senyawa-senyawa yang bersifat non polar seperti asam lemak (lipid), terpenoid dan steroid. Senyawa-senyawa yang bersifat polar seperti flavonoid, fenolik dan tannin selanjutnya akan larut dalam metanol (Nurmilla 2009: 3). Penggunaan campuran metanol dan n-

heksan diharapkan dapat melarutkan senyawa-senyawa polar sampai non polar yang terkandung dalam ekstrak miselium.

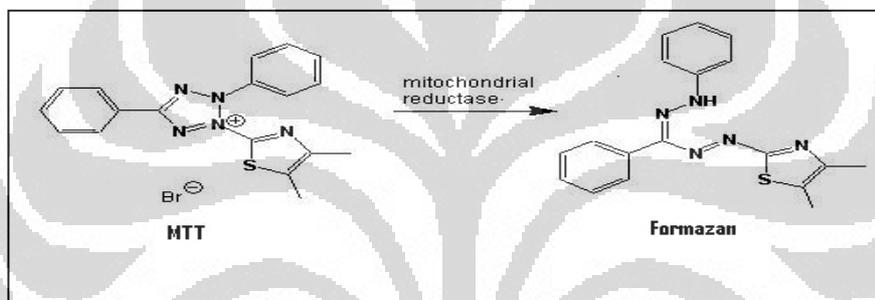
Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi *broth* adalah etil asetat. Etil asetat adalah pelarut semi polar yang dapat melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat polar sampai non polar (Nursid *dkk.* 2010: 105). Etil asetat merupakan ester dari etanol dan asam asetat yang dapat melarutkan air hingga 3% dan larut dalam air hingga kelarutan 8% pada suhu kamar dan meningkat pada suhu lebih tinggi. Pelarut tersebut sering digunakan sebagai pelarut karena dapat melarutkan senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas toksisitas diantaranya alkaloid dan fenolik (Mulyati 2009: 2).

Jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi akan mempengaruhi jenis bahan yang akan terekstrak. Kelarutan suatu senyawa dalam pelarut tergantung dari gugus-gugus yang terikat pada pelarut tersebut. Pelarut yang mempunyai gugus hidroksil (alkohol) dan karbonil (keton) termasuk pelarut polar, sedangkan hidrokarbon termasuk ke dalam non polar. Pemilihan pelarut harus didasarkan pada sifat polaritas, stabilitas, dan harga (Nurmillah 2009: 8--9).

Filtrat miselium dan *broth* yang diperoleh dievaporasi pada suhu 20--40°C dengan tekanan yang disesuaikan dengan pelarut yang digunakan agar pelarut dapat menguap dengan cepat dan tidak merusak zat aktif yang terkandung didalamnya (Gusmita 2010: 22). Filtrat dalam pelarut metanol dievaporasi pada tekanan 30 kPa dan suhu 20°C, sedangkan filtrat dalam pelarut etil asetat dievaporasi pada tekanan 14 kPa dan suhu 20°C (Engineers Edge 2010: 1). Hal tersebut didasarkan pada titik didih pelarut. Pelarut dengan titik didih rendah akan menguap lebih cepat sehingga suhu yang digunakan harus rendah (Gusmita 2010: 22). Selanjutnya ekstrak yang masih kental diuapkan kembali sampai menjadi ekstrak kering menggunakan nitrogen evaporator. Ekstrak *broth* dan miselium berwarna coklat tua. Ekstrak kering miselium lebih berat dibandingkan dengan ekstrak *broth* karena masih mengandung garam-garam yang berasal dari media. Garam-garam tersebut dapat terekstrak karena pelarut yang digunakan adalah campuran n-heksan : metanol yaitu 1 : 1 (Nursyid *dkk.* 2010: 105).

4.3. Uji sitotoksitas ekstrak kapang dengan metode MTT

Uji MTT merupakan uji yang sensitif, kuantitatif dan terpercaya. Reaksi MTT merupakan reaksi reduksi selular yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT berwarna kuning menjadi kristal formazan berwarna biru keunguan (Basmal *dkk.* 2009: 2). Metode perubahan warna tersebut digunakan untuk mendeteksi adanya proliferasi sel. Sel yang mengalami proliferasi, mitokondria akan menyerap MTT sehingga sel-sel tersebut akan berwarna ungu akibat terbentuknya kristal tetrazolium (formazan) (Depamede *dkk.* 2009: 97).



Gambar 4.3.1 Prinsip uji sitotoksik menggunakan metode MTT

[Sumber: Brescia *dkk.* 2009: 1].

Uji dilakukan terhadap sel kanker payudara T47D. Sel T47D tersebut dikultur dalam media RPMI 1640 dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C dengan aliran CO₂ 5 mL/menit (Nursid *dkk.* 2010: 105). Kultur sel adalah teknik yang biasa digunakan untuk mengembangkan sel diluar tubuh (*in vitro*). Keuntungan penggunaan kultur sel adalah lingkungan tempat hidup sel dapat dikontrol dan diatur sehingga kondisi fisiologis dari kultur relatif konstan. Kelemahan teknik tersebut adalah sel yang dikultur mengalami perubahan sifat karena perkembangbiakan sel di dalam tubuh (*in vivo*) bekerja secara terintegritas dalam satu jaringan, sedangkan dalam kultur sel terpisah-pisah. Kondisi lingkungan kultur harus dibuat semirip mungkin dengan lingkungan awal di dalam tubuh supaya sel tumbuh dengan baik (Zarisman 2006: 28). Menurut Malole (1990), faktor yang mendukung pertumbuhan

sel didalam kultur adalah media pertumbuhan dan kondisi lingkungan. Pertumbuhan sel memerlukan pH 7,4. Keseimbangan pH dapat diatur dengan penambahan NaHCO_3 sebagai *buffer*. Suhu dipertahankan 37°C dengan konsentrasi CO_2 5 % dan O_2 95 %. Suhu harus dijaga karena suhu dapat mempengaruhi pH lingkungan.

Media RPMI-1640 adalah media yang baik untuk menumbuhkan sel kanker T47D untuk jangka pendek. Medium tersebut mengandung serum FBS 10 % (Gusmita 2010: 19). FBS merupakan suplemen peningkat pertumbuhan yang efektif untuk sel kanker karena kompleksitas dan banyaknya faktor pertumbuhan, perlindungan sel dan faktor nutrisi yang dikandungnya. Kandungan tersebut dapat dibagi dalam beberapa polipeptida spesifik yang menstimulasi pertumbuhan sel (*growth factor*), protein pengangkut, agen pelindung, faktor pelekatan dan nutrisi. Medium RPMI juga mengandung streptomisin yang bertujuan untuk menghindari terjadinya kontaminasi. Streptomisin adalah antibiotik yang tidak bersifat toksik, memiliki spektrum antimikroba luas dan ekonomis (Zarisman 2006: 29).

Pada penelitian ini jumlah sel kanker hidup dalam suspensi yang digunakan dalam kultur adalah $10,8 \times 10^6$ sel/mL. Suspensi sel yang digunakan untuk setiap sumuran adalah 2×10^5 /mL. Jumlah sel tersebut diharapkan sel kanker dapat bertahan hidup melewati siklus hidupnya dengan baik dalam waktu inkubasi 24--48 jam. Penentuan waktu inkubasi 24--48 jam adalah untuk mencegah berkurangnya ketersediaan nutrisi yang dikonsumsi oleh sel. Medium RPMI akan berfungsi maksimal dalam mengkultur sel kanker T47D selama dua hari (Zarisman 2006: 44).

Sebanyak 1 mg ekstrak yang telah kering dilarutkan dalam 50 μL *Dimetil Sulfoksida* (DMSO), selanjutnya ditambahkan medium RPMI sampai volume 1000 μL . DMSO berfungsi sebagai *buffer* agar ekstrak dapat larut dengan baik. Larutan tersebut digunakan sebagai stok. Selanjutnya ekstrak dibuat seri dosis 16, 32, 64, 128 dan 256 ppm. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui signifikansi peningkatan dosis konsumsi dengan efek peningkatan proliferasi sel yang dihasilkan. Reaksi MTT dengan enzim *mitokondria reduktase* yang terdapat pada sel dihentikan dengan penambahan *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS). SDS berfungsi sebagai detergen yang dapat melisiskan membran sel dan mendenaturasi protein (Maulana *dkk.* 2010: 13).

4.3.1 Ekstrak *broth*

Ekstrak *broth* diujikan pada sel T47D dengan seri dosis 16, 32, 64, 128 dan 256 ppm. Hasil dari pengujian didapatkan data nilai absorbansi untuk masing-masing dosis. Nilai absorbansi digunakan untuk menghitung besarnya persen (%) kematian sel. Parameter yang diukur adalah besarnya persen kematian sel (%) dan kristal formazan yang terbentuk.

Tabel 4.3.1.1 Hasil uji MTT dari ekstrak *broth* kapang *Aspergillus sp.*

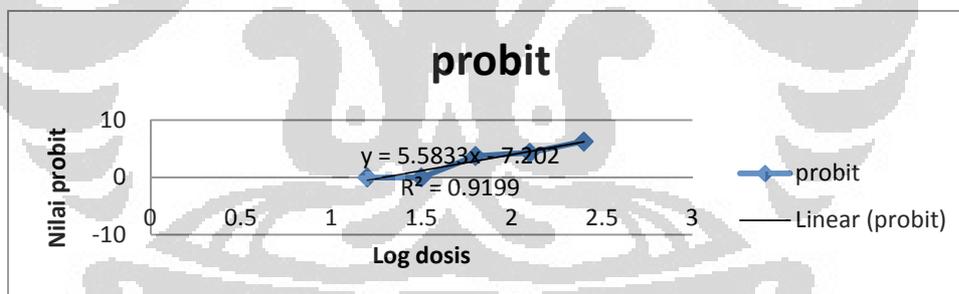
Dosis (ppm)	Serapan rata-rata perlakuan sampel	Serapan rata-rata kontrol sampel	Penghambatan (%)
16	0,376	0,268	0
32	0,365	0,247	0
64	0,337	0,251	10,42
128	0,334	0,261	23,96
256	0,263	0,252	88,54
Rata-rata kontrol sel	0,390		
Rata-rata kontrol media	0,294		

Berdasarkan Tabel 4.3.1.1, nilai absorbansi sampel pada dosis 16 ppm adalah 0,376 dan nilai absorbansi kontrol sampel adalah 0,268. Kedua nilai absorbansi tersebut digunakan untuk menghitung persen kematian sel dan didapatkan kematian sel sebesar 0 %. Nilai absorbansi sampel dan kontrol sampel pada dosis 32 ppm berturut-turut sebesar 0,365 dan 0,247 serta kematian sel sebesar 0 %. Nilai absorbansi sampel dan kontrol sel pada dosis 64 ppm berturut-turut sebesar 0,337 dan 0,251 serta kematian sel sebesar 10,42%. Nilai absorbansi sampel dan kontrol sel pada dosis 128 ppm berturut-turut sebesar 0,334 dan 0,261 serta kematian sel sebesar 23,96 %. Nilai absorbansi sampel dan kontrol sel pada dosis 256 ppm berturut-turut sebesar 0,263 dan 0,252 serta kematian sel sebesar 88,54 %.

Tabel 4.3.1.2 Analisis probit uji MTT dari ekstrak *broth* kapang *Aspergillus sp.*

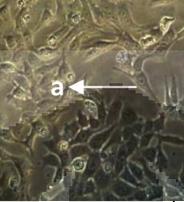
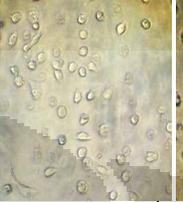
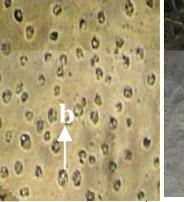
Dosis (ppm)	Penghambatan (%)	Log Dosis (x)	Probit (y)
16	0	1,2	0
32	0	1,5	0
64	10,42	1,8	3,72
128	23,96	2,1	4,29
256	88,54	2,4	6,23
IC ₅₀	153,266 ppm		

Berdasarkan Tabel 4.3.1.2, nilai log dosis dan probit untuk dosis 16 ppm adalah 1,2 dan 0. Nilai log dosis dan probit untuk dosis 32 ppm adalah 1,5 dan 0. Nilai log dosis dan probit untuk dosis 64 ppm adalah 1,8 dan 3,72. Nilai log dosis dan probit untuk dosis 128 adalah 2,1 dan 4,29. Nilai log dosis dan probit untuk dosis 256 ppm adalah 2,4 dan 6,23.

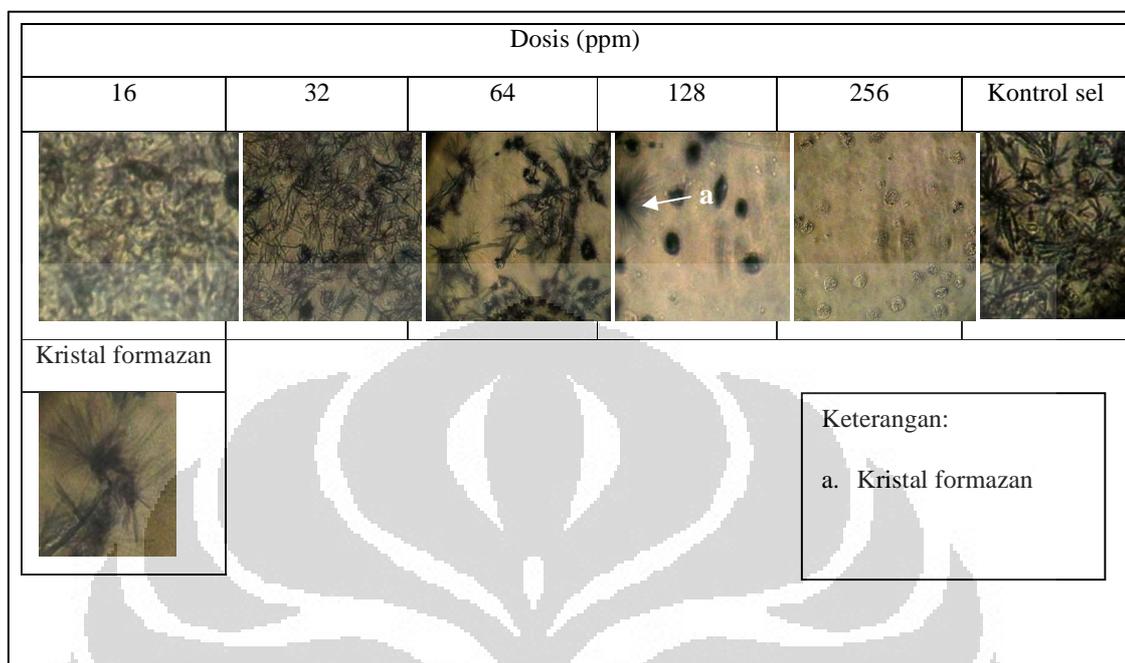


Gambar 4.3.1.2 Hubungan antara nilai log dosis dengan nilai probit dari hasil uji MTT ekstrak *broth* kapang *Aspergillus sp.* terhadap sel T47D.

Berdasarkan Gambar 4.3.1.2 didapatkan persamaan $y = 5,5833 x - 7,202$ dan nilai R^2 sebesar 0,9199. Nilai y tersebut digunakan untuk mencari nilai IC₅₀ dan didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 153,266 ppm (Tabel 4.3.1.2).

Dosis (ppm)					
16	32	64	128	256	Kontrol sel
Kematian sel 0%	Kematian sel 0%	Kematian sel 10,42%	Kematian sel 23,96%	Kematian sel 88,54%	
					
Sel hidup	Sel mati	Keterangan:			
		a. Sel hidup : bentuk lonjong dan besar b. Sel mati : bentuk bulat, mengkerut dan kecil			

Gambar 4.3.1.3 Efek paparan ekstrak *broth* kapang *Aspergillus sp.* terhadap morfologi sel T47D (perbesaran 400 x).



Gambar 4.3.1.4 Kristal formazan yang terbentuk setelah perlakuan dengan MTT (perbesaran 400 x).

Gambar 4.3.1.3 merupakan efek paparan ekstrak *broth* terhadap morfologi sel T47D. Jumlah sel yang mati adalah 0 % pada dosis 16 dan 32 ppm (Tabel 4.3.1.1). Morfologi sel pada dosis 16 dan 32 ppm tidak berbeda jika dibandingkan dengan kontrol sel. Sel berbentuk lonjong, bergerombol dan tidak terlihat adanya sel yang lisis (Gambar 4.3.1.3). Selain itu kristal formazan yang terbentuk sangat banyak (Gambar 4.3.1.4). Hal tersebut mengindikasikan bahwa ekstrak *broth* pada dosis 16 dan 32 ppm belum mampu menghambat atau menurunkan sifat proliferasi sel T47D.

Jumlah sel kanker yang mati adalah 10,42 % pada dosis 64 ppm (Tabel 4.3.1.1). Gambar 4.3.1.3 menunjukkan adanya sel yang mengalami lisis dan pengkerutan. Sel kanker yang masih hidup tidak terlalu padat jika dibandingkan dengan kontrol sel. Selain itu, terjadi penurunan pembentukan kristal formazan. Pembentukan kristal formazan semakin menurun seiring dengan banyaknya sel yang mati (Gambar 4.3.1.4). Jumlah sel yang mati sebesar 23,96 % pada dosis 128 ppm

(Tabel 4.3.1.1). Gambar 4.3.1.3 dan 4.3.1.3 menunjukkan bahwa sebagian besar sel mengalami lisis dan mati, kristal formazan yang terbentuk semakin sedikit. Jumlah sel yang mati sebesar 88,54 % pada dosis 256 ppm (Tabel 4.3.1.1). Efek kematian sel sebesar 88,54 % terlihat pada Gambar 4.3.1.3 dan 4.3.1.4, hampir semua sel mengalami lisis dan tidak terlihat adanya kristal formazan yang terbentuk. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak *broth* pada dosis 64, 128 dan 256 ppm mampu menghambat atau menurunkan sifat proliferasi sel T47D. Efek penghambatan proliferasi semakin besar seiring peningkatan dosis ekstrak yang diujikan.

Kematian sel mulai terjadi pada sel yang diberi perlakuan ekstrak pada dosis 64 ppm sebesar 10,40% (Tabel 4.3.1.1). Kematian sel terus meningkat seiring dengan penambahan dosis ekstrak. Kematian sel meningkat menjadi 23,96% pada dosis 128 ppm dan menjadi 88,54% pada dosis 256 ppm (Tabel 4.3.1.1). Berdasarkan Gambar 4.3.1.2 terlihat hubungan antara nilai log dosis dengan nilai probit dari hasil uji MTT ekstrak *broth* terhadap sel T47D yang linear. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi pemberian ekstrak maka kematian sel T47D semakin meningkat.

Berdasarkan Tabel 4.3.1.3 ekstrak *broth* memiliki toksisitas terhadap sel T47D, terlihat dari nilai IC_{50} yang diperoleh yaitu 153,266 ppm. Persentase penghambatan sel yang dihasilkan antara log dosis versus nilai probit memiliki korelasi positif yang tinggi ($R^2=0,9199$). Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50 % dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Amalina 2008: 15--16). Batas IC_{50} suatu ekstrak untuk dapat dinyatakan berpotensi sebagai suatu antikanker adalah 10 μ g/ml atau 10.000 ppm (Lisdawati 2002: 1). Berdasarkan hal tersebut maka ekstrak *broth* dengan nilai IC_{50} sebesar 153,266 ppm tergolong ekstrak yang bersifat toksik terhadap sel T47D.

Berdasarkan hasil tersebut, ekstrak *broth* kapang *Aspergillus sp.* diketahui mampu menyebabkan kematian sel T47D. Kematian sel tersebut disebabkan karena adanya penghambatan proliferasi sel. Proliferasi merupakan proses pembelahan sel dimana satu atau lebih sel dapat memisahkan diri dari kelompok utamanya dan

berpindah ke tempat lain (metastasis) (Heti 2008: 8). *Aspergillus sp.* menghasilkan beberapa senyawa metabolit sekunder yang bersifat antikanker, diantaranya yaitu *terphenyllin* dan *chlorflavon* (Varga dkk. 2007: 75). *Terphenyllin* tergolong ke dalam senyawa polifenol sedangkan *chlorflavon* tergolong ke dalam senyawa flavonoid. Polifenol dan flavonoid mampu menghambat pertumbuhan sel kanker dengan cara menghambat pembentukan enzim *nitric oxide synthase* (NOS). Penghambatan enzim NOS pada sel kanker akan memacu terjadinya apoptosis melalui jalur p53 (Meiyanto dkk. 2008: 17). P53 merupakan gen represor tumor yang penting dalam pengaturan apoptosis. Protein p53 berfungsi sebagai aktivator transkripsi yang meregulasi ekspresi beberapa protein pro-apoptosis (Bax, Noxa, PUMA (p53 *upregulated modulator of apoptosis*), Bid maupun anti-apoptosis. Aktivasi ini dapat terjadi setelah adanya stimulasi kemoterapi, radiasi atau stress. Ketergantungan aktivasi Bax oleh p53 ini sangat tergantung oleh jenis sel (Rumiyanti 2006: 240).

Hasil penelitian menunjukkan potensi ekstrak *broth* kapang *Aspergillus sp.* sebagai agen antikanker yang dapat menghambat proliferasi sel dan memacu apoptosis. Meskipun aktivitas sitotoksik relatif rendah jika dibandingkan dengan agen kemoterapi konvensional seperti *doxorubicin*, tetapi nilai IC₅₀ tersebut cukup menjanjikan untuk dikembangkan sebagai agen kemoprevensi mengingat pada percobaan ini digunakan sel T47D yang diketahui memiliki sifat resistensi yg tinggi terhadap beberapa agen kemoterapi (Meiyanto dkk. 2008: 17--18).

4.3.2 Ekstrak Miselium

Ekstrak miselium diujikan pada sel T47D dengan seri dosis 16, 32, 64, 128 dan 256 ppm. Parameter yang diukur adalah persen kematian sel dan banyaknya kristal formazan yang terbentuk. Hasil dari pengujian didapatkan data nilai absorbansi untuk masing-masing dosis. Nilai absorbansi selanjutnya digunakan untuk menghitung besarnya persen kematian sel.

Tabel 4.3.2.1 Hasil uji MTT dari ekstrak miselium kapang *Aspergillus sp.*

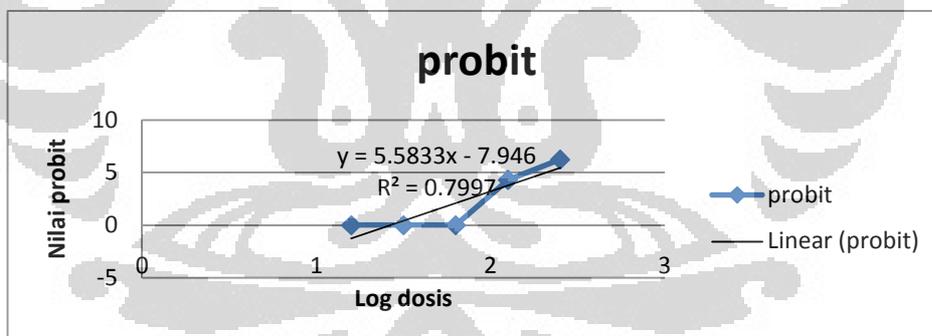
Dosis (ppm)	Serapan rata-rata perlakuan sampel	Serapan rata-rata kontrol sampel	Penghambatan (Kematian sel) (%)
16	0,355	0,234	0
32	0,367	0,230	0
64	0,347	0,250	0
128	0,315	0,237	18,75
256	0,291	0,245	52,08
Rata-rata kontrol sel	0,390		
Rata-rata kontrol media	0,294		

Berdasarkan Tabel 4.3.2.1, nilai absorbansi sampel pada dosis 16 ppm adalah 0,335 dan nilai absorbansi kontrol sampel adalah 0,234. Kedua nilai absorbansi tersebut digunakan untuk menghitung persen kematian sel dan didapatkan kematian sel sebesar 0 %. Nilai absorbansi sampel dan kontrol sampel pada dosis 32 ppm berturut-turut sebesar 0,367 dan 0,230 serta kematian sel sebesar 0 %. Nilai absorbansi sampel dan kontrol sel pada dosis 64 ppm berturut-turut sebesar 0,347 dan 0,250 serta kematian sel sebesar 3,54 %. Nilai absorbansi sampel dan kontrol sel pada dosis 128 ppm berturut-turut sebesar 0,315 dan 0,247 serta kematian sel sebesar 18,75 %. Nilai absorbansi sampel dan kontrol sel pada dosis 256 ppm berturut-turut sebesar 0,291 dan 0,245 serta kematian sel sebesar 52,08 %.

Tabel 4.3.2.1 Analisis probit uji MTT dari ekstrak miselium kapang *Aspergillus sp.*

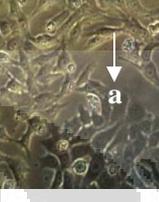
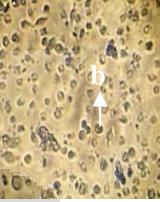
Dosis (ppm)	Penghambatan (Kematian sel) (%)	Log dosis (x)	Probit (y)
16	0	1,2	0
32	0	1,5	0
64	0	1,8	0
128	18,75	2,1	4,12
256	52,08	2,4	5,05
IC ₅₀	214,19 ppm		

Berdasarkan Tabel 4.3.2.1, nilai log dosis dan probit untuk dosis 16 ppm adalah 1,2 dan 0. Nilai log dosis dan probit untuk dosis 32 ppm adalah 1,5 dan 0. Nilai log dosis dan probit untuk dosis 64 ppm adalah 1,8 dan 0. Nilai log dosis dan probit untuk dosis 128 adalah 2,1 dan 4,12. Nilai log dosis dan probit untuk dosis 256 ppm adalah 2,4 dan 5,05.

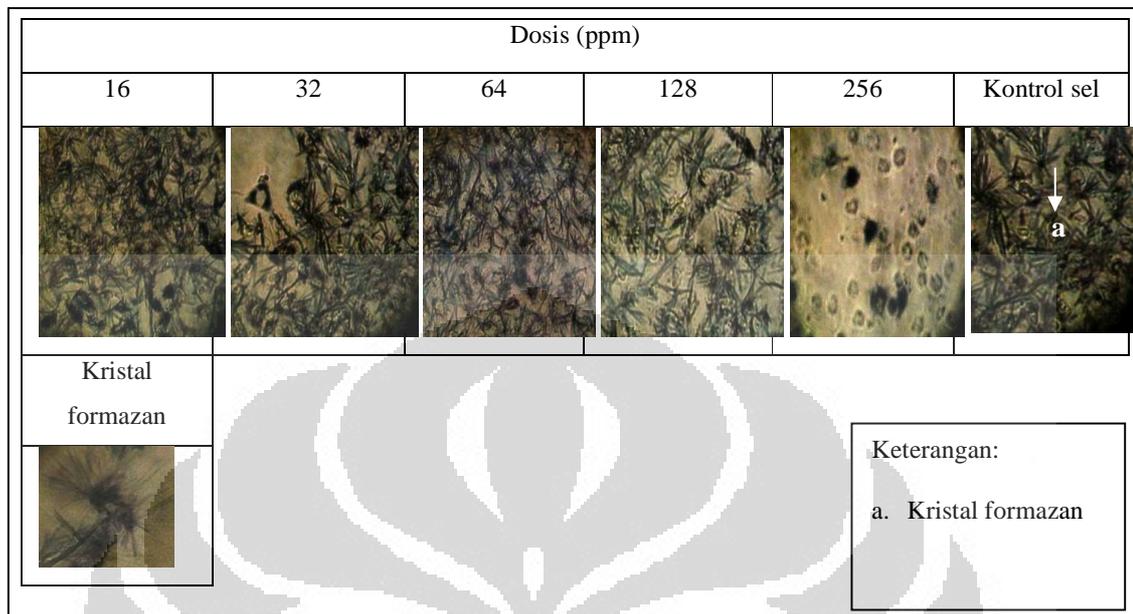


Gambar 4.3.2.1 Hubungan antara nilai log dosis dengan nilai probit dari hasil uji MTT ekstrak miselium isolat MFB 07 terhadap sel T47D.

Berdasarkan Gambar 4.3.2.1 didapatkan persamaan $y = 5,5833x - 7,946$ dan nilai R^2 sebesar 0,7997. Nilai y tersebut digunakan untuk mencari nilai IC₅₀ dan didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 208,305 ppm (Tabel 4.3.2.1).

Dosis (ppm)					
16	32	64	128	256	Kontrol sel
Kematian sel 0%	Kematian sel 0%	Kematian sel 0%	Kematian sel 18,75%	Kematian sel 52,08%	
					
Sel hidup	Sel mati	Keterangan:			
		a. Sel hidup : bentuk lonjong dan besar b. Sel mati : bentuk bulat, mengkerut dan kecil			

Gambar 4.3.2.2 Efek paparan ekstrak miselium kapang *Aspergillus sp.* terhadap morfologi sel T47D (perbesaran 400 x).



Gambar 4.3.2.3 Kristal formazan yang terbentuk setelah perlakuan dengan MTT (perbesaran 400 x).

Gambar 4.3.2.2 merupakan efek paparan ekstrak miselium terhadap morfologi sel T47D. Ekstrak miselium belum mampu menghambat pertumbuhan sel kanker pada dosis 16, 32 dan 64 ppm. Berdasarkan perhitungan persen kematian sel, sel kanker yang mati adalah 0% (Tabel 4.3.2.1). Morfologi sel kanker yang terlihat pada dosis 16 ppm dan 32 ppm tidak memiliki perbedaan dengan kontrol sel. Sel kanker berbentuk lonjong dan bergerombol. Pembentukan kristal formazan sama dengan kristal formazan yang terbentuk pada kontrol sel (Gambar 4.3.2.3). Hal tersebut menunjukkan tidak terjadi penghambatan atau penurunan proliferasi sel T47D.

Jumlah sel yang mati sebesar 18,75 % pada dosis 128 ppm. Kristal formazan yang terbentuk masih sama dengan kontrol sel (Gambar 4.3.2.3) tetapi pada Gambar 4.3.2.2 terdapat sel yang mati. Sel mati memiliki bentuk berbeda dengan sel hidup. Sel mati mengalami lisis pada inti sel dan pengkerutan pada membran sel sementara sel hidup berbentuk lonjong dan ukurannya lebih besar. Jumlah sel yang mati sebesar

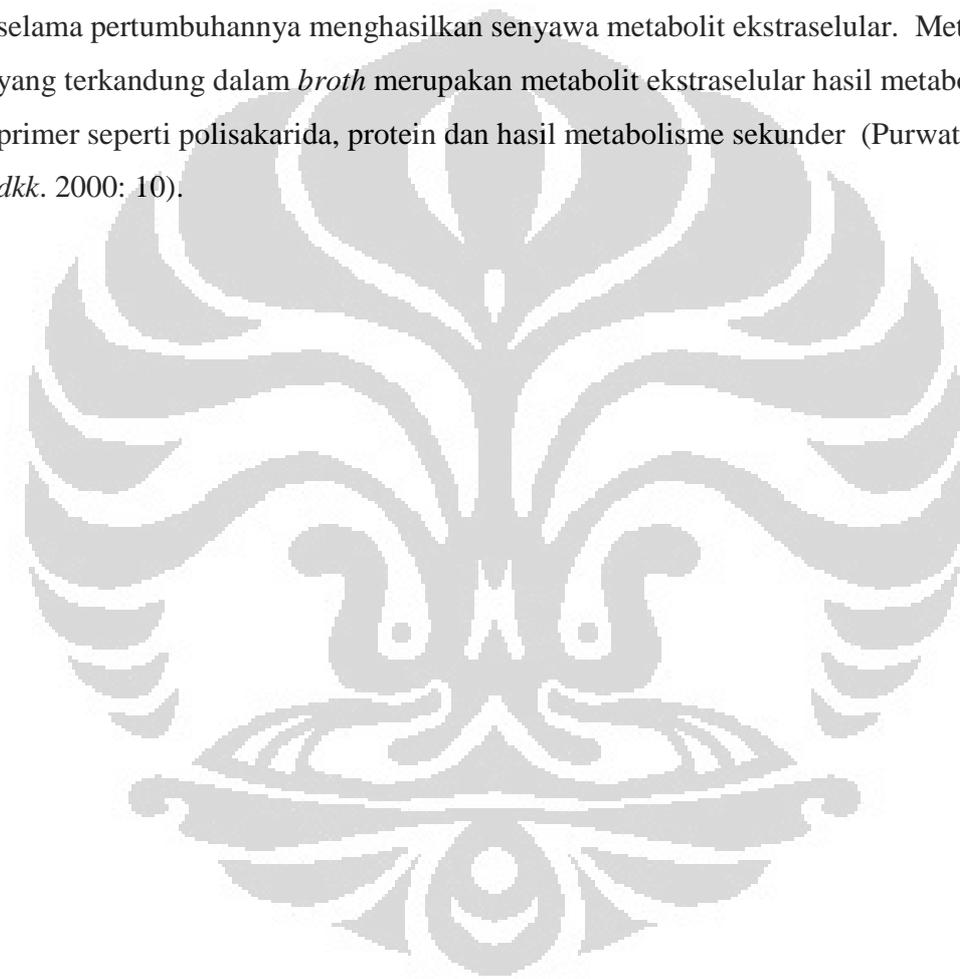
52,08 % pada dosis 256 ppm (Tabel 4.3.2.1). Efek kematian sel sebesar 52,08 % terlihat pada Gambar 4.3.2.2 dan 4.3.2.3, jumlah sel yang mati meningkat dan sedikit kristal formazan yang terbentuk jika dibandingkan dengan kontrol sel. Sel-sel kanker terlihat tidak menggerombol dan kepadatannya semakin menurun jika dibandingkan dengan kontrol sel. Hal tersebut menunjukkan terjadinya penghambatan atau penurunan proliferasi sel T47D. Penghambatan proliferasi tersebut semakin meningkat seiring dengan penambahan dosis ekstrak.

Kematian sel mulai terjadi pada sel yang diberi perlakuan ekstrak pada dosis 128 ppm sebesar 18,75 % (Tabel 4.3.2.1). Kematian sel terus meningkat seiring dengan penambahan dosis ekstrak. Berdasarkan Gambar 4.3.2.1 terlihat hubungan antara nilai log dosis dengan nilai probit dari hasil uji MTT ekstrak miselium terhadap sel T47D yang linear. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi pemberian ekstrak maka penghambatan proliferasi sel T47D semakin besar.

Berdasarkan Tabel 4.3.2.1, ekstrak miselium memiliki toksisitas terhadap sel T47D yang baik, terlihat dari nilai IC_{50} yang diperoleh yaitu 208,305 ppm. Persentase penghambatan sel yang semakin meningkat seiring dengan kenaikan konsentrasi yang dihasilkan antara log dosis versus nilai probit memiliki korelasi positif yang tinggi ($R^2=0,7997$). Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50 % dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Amalina 2008: 15--16). Batas IC_{50} suatu ekstrak untuk dapat dinyatakan berpotensi sebagai suatu antikanker adalah 10.000 ppm (Lisdawati 2002: 1).

Tabel 4.3.1.2 dan Tabel 4.3.2.2, nilai IC_{50} dari ekstrak *broth* lebih kecil (153,266 ppm) jika dibandingkan dengan ekstrak miselium (208,305 ppm). Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak *broth* memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih kuat dibandingkan ekstrak miselium. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Nursid *dkk.* (2010). Penelitian tersebut adalah mengkultivasi kapang MFW-01-08 yang diisolasi dari *Ascidia Aplidium longithorax* dan menguji ekstrak kapang tersebut terhadap sel T47D. Hasil penelitian tersebut adalah ekstrak

broth memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak miselium dengan nilai IC_{50} *broth* dan miselium berturut-turut sebesar 92,6 $\mu\text{g/ml}$ dan 183,6 $\mu\text{g/ml}$. Hal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa-senyawa aktif yang mampu menghambat pertumbuhan sel T47D terdapat pada ekstrak *broth* dan diperkirakan hasil metabolisme kapang termasuk metabolit sekunder banyak yang dilepas ke dalam *broth* selama proses kultivasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa selama pertumbuhannya menghasilkan senyawa metabolit ekstraselular. Metabolit yang terkandung dalam *broth* merupakan metabolit ekstraselular hasil metabolisme primer seperti polisakarida, protein dan hasil metabolisme sekunder (Purwatiningsih *dkk.* 2000: 10).



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Hasil ekstraksi medium kultur dari kapang *Aspergillus sp.* menggunakan etil asetat (2:1) sebesar 18,30 g sedangkan hasil ekstraksi miselium menggunakan metanol: n-heksan (1:1) sebesar 0,93 g. Uji sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan metode MTT menghasilkan nilai IC_{50} untuk ekstrak *broth* dan miselium sebesar 153,266 ppm dan 208,305 ppm. Batas IC_{50} suatu ekstrak untuk dapat dinyatakan berpotensi sebagai suatu antikanker adalah 10.000 ppm. Oleh karena itu, ekstrak *broth* dan miselium kapang *Aspergillus sp.* tersebut berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai obat antikanker.

5.2 Saran

Perlu dilakukan pemisahan dan pengujian lebih lanjut untuk mengetahui jenis senyawa aktif pada isolat MFB 07 dan seri dosis yang tepat serta efektif terhadap sel kanker payudara T47D. Pengembangan aplikasinya dapat diarahkan pada efek sinergistik kombinasi ekstrak isolat MFB 07 dengan *dokorubicin* terhadap sel T47D. *Dokorubicin* adalah agen kemoterapi yang sering digunakan dalam pengobatan kanker payudara.

BAB 6

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, S. 2004. *Isolation and skrining antibacterial activity of fungi from sponges Axinella carteri Ridley & Dendy obtained from marine water of Pramuka Island in Seribu Island, Jakarta*. Jakarta: iii + 81 hlm.
- Amalina, N. 2008. *Uji sitotoksik ekstrak etanol 70 % buah merica hitam (Piper nigrum L.) terhadap sel HeLa*. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta: 1 + 17 hlm.
- Anggraini, P. 2008. *Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Kemukus (Piper cubeba L.) Terhadap Sel HeLa*. Universitas Muhammadiyah Surakarta: 1 + 28 hlm.
- Aryantha, I. N. P., Widayanti, S. & Yuanita. 2004. *Eksplorasi fungi Deuteromycetes (Aspergillus sp. dan Penicillium sp.) penghasil senyawa anti kolesterol lovastatin*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung, Bandung: 1 + 32 hlm.
- Astuti & Rahmawati, A. 2010. *Asimilasi kolesterol dan dekonjugasi garam empedu oleh bakteri asam laktat (Bal) dari limbah kotoran ayam secara in vitro*. Prosiding Seminar Nasional, Fakultas MIPA UNY. Yogyakarta: 185--192.
- Basmal, J., Amini, S., Sugiyono, & Murniyati. 2009. *Seminar Nasional Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Jakarta: iii + 208 hlm.
- Berata, I. K. 2000. *Umur sapi bali berpengaruh pada respon kekebalan selular terhadap virus penyakit jembrana pasca vaksinasi*. Laboratorium Patologi FKH Universitas Udayana. Bali: 1 + 13 hlm.
- BPPT. 2009. *Teknik-teknik dasar kultur sel manusia*. Laboratorium Pengembangan Teknologi Industri Agro dan Biomedika, Serpong: 2 hlm.
- Brescia, P. & Banks, P. 2009. *Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer*. <http://quontification-cell-viability-epoch.html>. Jakarta: 1 hlm, 4 April 2011, pkl. 09.10 WIB.

- Chasanah, E., Januar, H. I., Irianto, H. E., Bourne, D., Liptrot, C., & Wright, A. 2009. *Screening of anticancer activity of fungi derived from Indonesia marine sponges. Journal of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology, special edition in conjunction with World Ocean Conference 2009*. Jakarta: 1--8.
- Crueger, A & Crueger, W. 1984. *Biotechnology: A textbook of industrial microbiology*. Academic Verlagsgesellschaft, Wiesbaden: v + 308 hlm.
- Da'i, M., Meiyanto, E. & Supardjan, A. M. 2004. *Efek antiproliferatif pentagamavunon-0 terhadap sel myeloma*. Program Studi Farmasi, Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta: 1 + 8 hlm.
- Depamede, S. N., & Rosyidi, A. 2009. Penghambatan proliferasi limfosit mencit Balb/C oleh ekstrak testis sapi bali: Peran TGF- β . *Media Peternaka* **32**(2): 95--103.
- Engineers Edge. 2010. *Fluid characteristics chart, density, vapor pressure and viscosity*. http://www.engineersedge.com/fluid_flow/fluid_data.htm. Jakarta: 1 hlm, 10 Mei 2011, pkl 14.15 WIB.
- Fachraniah, Fardiaz, D. & Idiyanti, T. 2002. Pembuatan pepton dari bungkil kedelai dan khamir dengan enzim papain untuk media pertumbuhan bakteri. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* **8**(3): 260--266.
- Fahri M. 2010. *Teknik ekstraksi senyawa flavonoid dari alga coklat Sargassum cristaefolium*. <http://elfahrybima.blogspot.com/2010/10/teknik-ekstraksi-senyawa-flavonoid-dari.html>. Jakarta: 1 hlm, 10 Mei 2011, pkl 14.10 WIB.
- Fajarningsih, N. D., Januar, H. I., Nursid, M. & Wikanta, T. 2006. Potensi antitumor ekstrak rumput laut *Crella papilata* asal Taman Nasional Laut Kepulauan Seribu. *Dalam: Chasanah, E., Nursid, M. & Wikanta, T. 2006. Jurnal Pascapanen Bioteknologi Kelautan dan Perikanan* **1**(1): I + 83 hlm.
- Fenical, W. 2001. Marine Pharmaceuticals. *Dalam: Abraham, S. 2004. Isolation and skrining antibacterial activity of fungi from sponges Axinella carteri Ridley & Dendy obtained from marine water of Pramuka Island in Seribu Island, Jakarta*. Jakarta: iii + 81 hlm.

- Gandjar, I., Samson, R., Oetari, A., & Santoso, I. 1999. *Pengenalan kapang tropik umum*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta: vii + 135 hlm.
- Gandjar, I. & Sjamsuridzal, W. 2006. *Mikologi: Dasar dan Terapan*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta: vii + 76 hlm.
- Gusmita, D. 2010. *Uji sitotoksitas ekstrak etanol spons *Callyspongia sp.* dan fraksi-fraksinya terhadap sel lestari tumor HeLa*. Universitas Pancasila: I + 40 hlm.
- Hartono, N. W. B. 2009. *Pengaruh *Alpinia galangal* (Lengkuas) terhadap aktivitas proliferasi sel dan indeks apoptosis pada adenokarsinoma*. Universitas Diponegoro. Semarang: I + 101 hlm.
- Heti, D. 2008. *Uji Sitotoksik ekstrak etanol 70% herba *Sisik naga* (*Drymoglossum piloselloides Presl*) terhadap sel T47D*. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta: I + 18 hlm.
- Hikmah, M., N. & Zuliyana. 2010. *Pembuatan metal ester (Biodiesel) dari minyak dedak dan methanol dengan proses esterifikasi dan transesterifikasi*. Universitas Diponegoro. Semarang: I + 43 hlm.
- Indrani, N. J. 2010. *Preparasi dan kultur dari sel hewan*.
<http://nadzzsukakamu.wordpress.com/2010/10/20/preparasi-dan-kultur-dari-sel-hewan/>. Jakarta: 1 hlm, 28 April 2011, 14.30 WIB.
- Jarotrustono. 2009. *Jamur*. <http://blog.unnes.ac.id/rustono/2009/10/09/biologi/>. Jakarta: 1 hlm, 12 Juli 2011, 22.30 WIB.
- Junedi, S. 2000. *Uji sitotoksik metode MTT*. Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada. Yogyakarta: 1 + 18 hlm.
- Kennia. 2008. *Kanker payudara*. <http://www.mer-c.org/penyakit-infeksi/93-kanker-payudara.pdf>. Jakarta: 4 hlm, 4 April 2011, 09.20 WIB.
- Klich, M. A. 2002. *Identification of common *Aspergillus species**. Centraal bureau voor Schimmelcultures, Netherland: I + 116.
- Lisdawati, V. 2002. *Efek antioksidan dan antikanker berdasarkan uji penapisan farmakologi buah Mahkota Dewa*.
<http://www.farmakologi.fk.ugm.ac.id/2008/05/30/berdasar-uji-penapisan-farmakologi-pada-buah-mahkota-dewa/>. Jakarta: 1 hlm, 10 Mei 2011, 15.15 WIB.

- Malole, M. B. M. 1990. Kultur sel dan jaringan hewan. *Dalam: Zairisman, S. Z.* 2006. Potensi ilmu nomodulator bubuk kakao bebas lemak sebagai produk substandar secara *in vitro* pada sel limfosit manusia. Fakultas Teknologi Pertanian Bogor, Institut Pertanian Bogor, Bogor: I + 74 hlm.
- Mangunwidjaja, D., & Suryani, A. 1994. *Teknologi Bioproses*. Penebar Swadaya. Jakarta: iv + 394 hlm.
- Maulana, R., Adriyana, Hafida, E. Putri, J. K. Noviyanti, F. Murti, S. R. & Zetina, Z. 2010. Isolasi DNA tanaman dan elektroforesis DNA. Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Jakarta: 1 + 19 hlm.
- Meiyanto, E. S., Da'I, M. & Agustina, D. 2006. *Efek antiproliferatif pentagamavunon-0 terhadap sel kanker payudara T47D*. Universitas Gajah Mada, Semarang. Semarang: 1 + 5 hlm.
- Meiyanto, E. S., Susidarti, S. A., Handayani, S. & Rahmi F. 2008. Ekstrak etanolik biji buah pinang (*Areca catechu* L.) mampu menghambat proliferasi dan memacu apoptois sel MFC-7. *Majalah Farmasi Indonesia* **19**(1): 12--19.
- Niawanti, H. 2011. Faktor Lingkungan Terhadap Pertumbuhan Mikroba. <http://heldaluvchemeng.blogspot.com/2011/03/faktor-lingkungan-terhadap-pertumbuhan.html>. Jakarta: 1 hlm, 25 Juni 2011, pk1 14.20 WIB.
- Novilia, R. D. 2008. Uji sitotoksik ekstrak etanol kultur akar ceplukan (*Physalis angulata* L.) yang ditumbuhkan pada media murashige-skoog terhadap sel Myeloma. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta: 1 + 21 hlm.
- Nurmillah, O. Y. 2009. *Kajian aktivitas antioksidan dan antimikroba ekstrak biji, kulit buah, batang dan daun tanaman jarak pohon (Jatropha curcas L.)* Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Teknologi Bogor, Bogor: I + 55 hlm.
- Nursid, M., Pratitis, A., & Chasanah, E. 2010. Kultivasi Kapang MFW-01-08 Yang Diisolasi Dari Ascidia *Aplidium longithorax* dan Uji Aktivitas Sitotoksiknya Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *Jurnal pasca panen dan bioteknologi kelautan dan perikanan*. **5**(2): 103--116.

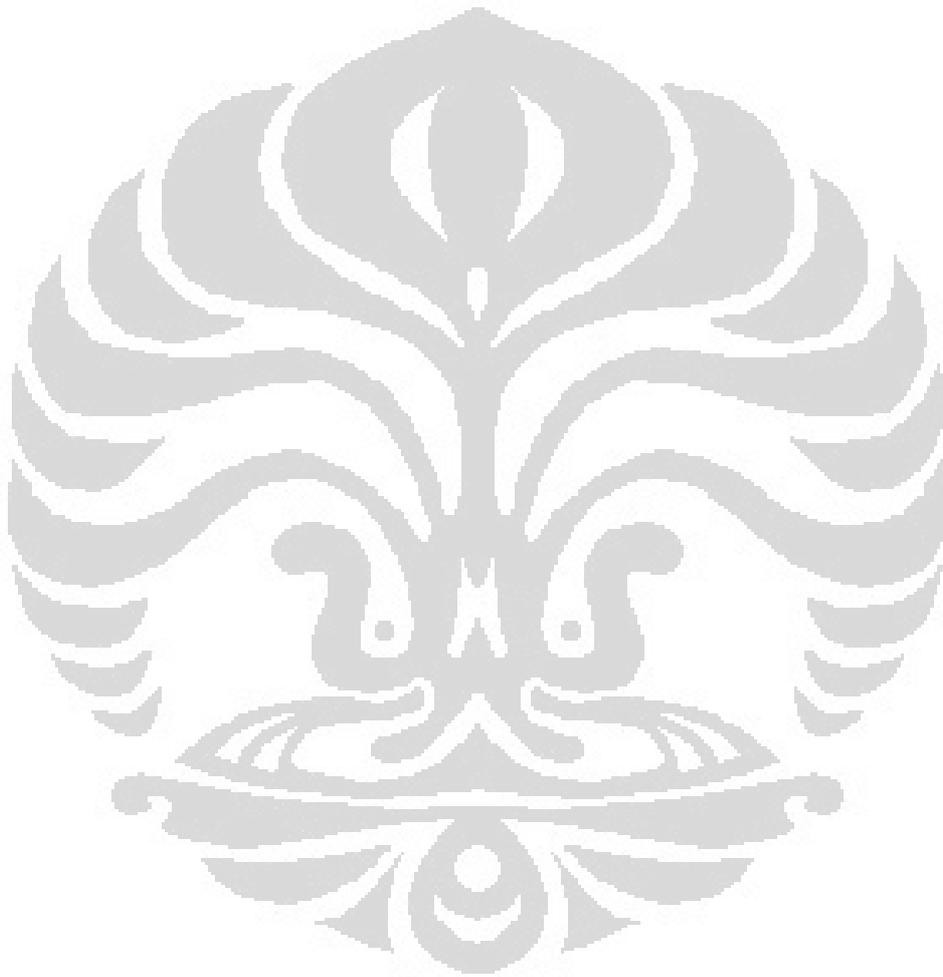
- Prabandari, E. E. 2003. *Optimalisasi media kultivasi Aspergillus terreus untuk produksi lovastatin dengan metode Central Composite Design*. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor: i + 10 hlm.
- Pratitis, A., Chasanah, E., & Nursid, M. 2009. Skrining aktivitas sitotoksik dan peredaman radikal bebas DPPH ekstrak marine fungi yang diisolasi dari spons asal Perairan Wakatobi. *Dalam: Prosiding Seminar Nasional Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Jakarta: 1--9.
- Proksch, P., Edrada, R. A., & Ebel, R. 2002. Drugs from the seas-current status and microbiological implication. *Dalam: Nursid, M., Pratitis, A., & Chasanah, E.* 2010. Kultivasi kapang MFW-01-08 yang diisolasi dari *Ascidia Aplidium longithirax* dan uji sitotoksiknya terhadap sel kanker payudara T47D. *Jurnal pasca panen dan bioteknologi kelautan dan perikanan*. **5(2)**: 103--116.
- Proksch, P., Ebel, R., Edrada, R. S., Schupp., Lin W. H., Sudarsono, Wray, V. & Steube, K. 2003. Detection of pharmacologically active natural products using ecology. Selected examples from indopacific marine invertebrates and sponge-derived fungi. *Pure Appl. Chem.* **75**: 343--352.
- Purwatiningsih., Darusman, L. K. & Heryanto, R. 2000. Isolasi dan karakterisasi terpenoid dari medium kultur *Ganoderma sp.* *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia* **2(2)**: 8--15.
- Rahardjo, S. J. 2011. Lavender Oil (Monoterpenoid Lavendula). <http://www.putraindonesiamalang.or.id/lavender-oil-monoterpenoid-lavendula.html>. Jakarta: 1 hlm, 25 Juni 2011, pkl 14.30 WIB.
- Rahmawati, E. 2006. *Uji aktivitas antikanker ekstrak etanol daging buah Mahkota Dewa [Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.] terhadap tumor kelenjar susu mencit C3H*. Program Studi Biomedik-program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta: i--75 hlm.
- Ramli, M. 2000. Kanker tiroid penataksanaan diagnosis dan terapi. *Dalam: Ramli, H., Umbas, R., & Danigoro, S.* 2000. Deteksi dini kanker. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta: iii + 149 hlm.

- Rostika, T. 2010. *Sel Kanker*. <http://iamtiku.wordpress.com/2010/03/28/sel-kanker/>. Jakarta: 1 hlm, 21 Maret 2011, pkl 13.59 WIB.
- Rumiyanti. 2006. Protein kelompok BCL-2 sebagai target senyawa antikanker. *Jurnal Kedokteran Yarsi* **14**(3): 238--242.
- Scabra, R. 2011. *Fase dan prinsip pertumbuhan bakteri*. . Jakarta: 1 hlm, 27 April 2011, pkl. 13.20 WIB.
- Sulis. 2011. *Kurva tumbuh bakteri*. Jakarta: 1 hlm, 27 April 2011, pkl. 13. 25 WIB.
- Supit, N. I. S. H. 2000. Deteksi dini keganasan payudara. *Dalam: Ramli, H., Umbas, R., & Danigoro, S.* 2000. Deteksi dini kanker. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta: iii + 149 hlm.
- Susilowati, S., meiyanto, E. & Sugiyanto. Efek ekstrak etanolik daun *Gynura procumbens* (Lour) Merr terhadap proliferasi sel kanker payudara tikus. Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada. Yogyakarta: 1--6.
- Thontowi, A., Kusmiati & Nuswantara, S. 2007. Produksi β -Glukan *Saccharomyces cerevisiae* dalam Media dengan Sumber Nitrogen Berbeda pada *Air-Lift Fermentor*. Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Ilmu Pengetahuan Indonesia. Cibinong, Bogor **8** (4): 253--256.
- Tjitrosoepomo, G. 1994. *Taksonomi tumbuhan obat-obatan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta: 1 + 445 hlm.
- Utami, T. S., Arbianti, R., hermansyah, H. & Reza, A. 2009. Perbandingan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun Simpur (*Dilenia indica*) dai berbagai metode ekstraksi dengan uji ANOVA. *Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia* **16**(1): 1--6.
- Varga, J., Frisvad, J. C. & Samson, R. A. 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data. *Stud Mycol* **59**(1): 75--88.
- Wijaya, M. T. & Sandra, F. 2007. Proses dalam umbilical cord blood banking. *Cermin Dunia Kedokteran* **157**: 217--220.

Yajri, F. 2009. Keladi tikus terbukti anti leukemia.

http://karantinapertaniansorong.org/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=55. Jakarta: 1 hlm, 10 mei 2011, pkl 14.10 WIB.

Zairisman, S. Z. 2006. Potensi ilmu nomodulator bubuk kakao bebas lemak sebagai produk substandar secara *in vitro* pada sel limfosit manusia. Fakultas Teknologi Pertanian Bogor, Institut Pertanian Bogor, Bogor: I + 74 hlm.



Lampiran 1. Tabel Analisis Probit

[Sumber: Gusmita 2010: 38].

Persentase	Probit									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	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	4,65	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
99	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	9,09

Lampiran 2. Perhitungan hasil uji sitotoksitas dengan metode MTT ekstrak miselium terhadap sel T47D dan perhitungan persamaan regresi antara log dosis dengan probit.

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{(A-D) - (B-C)}{(A-D)} \times 100\%$$

Keterangan:

A = Absorbansi kontrol sel

B = Absorbansi sampel

C = Absorbansi kontrol sampel

D = Absorbansi kontrol media

Perhitungan hasil uji MTT ekstrak miselium

Probit

$$16 \mu\text{g/mL} = \frac{(0,390-0,293)-(0,355-0,234)}{(0,390-0,293)} \times 100\% = 0\% \quad 0$$

$$32 \mu\text{g/mL} = \frac{(0,390-0,293)-(0,367-0,230)}{(0,390-0,293)} \times 100\% = 0\% \quad 0$$

$$64 \mu\text{g/mL} = \frac{(0,390-0,293)-(0,343-0,250)}{(0,390-0,293)} \times 100\% = 0\% \quad 0$$

$$128 \mu\text{g/mL} = \frac{(0,390-0,293)-(0,315-0,237)}{(0,390-0,293)} \times 100\% = 18,75\% \quad 4,12$$

$$256 \mu\text{g/mL} = \frac{(0,390-0,293)-(0,291-0,245)}{(0,390-0,293)} \times 100\% = 52,08\% \quad 5,05$$

Perhitungan persamaan regresi antara konsentrasi dengan kematian (%)

$$v = ax + b \quad y = 5 \quad \Rightarrow \quad x = \frac{5-b}{a}$$

Sampel	Persamaan regresi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak miselium	y = 4,74 x - 6,048	0,7997	208,305

Lampiran 3. Perhitungan hasil uji sitotoksitas dengan metode MTT ekstrak *broth* terhadap sel T47D dan perhitungan persamaan regresi antara log dosis dengan probit.

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{(A-D) - (B-C)}{(A-D)} \times 100\%$$

Keterangan:

A = Absorbansi kontrol sel

B = Absorbansi sampel

C = Absorbansi kontrol sampel

D = Absorbansi kontrol media

Perhitungan hasil uji MTT ekstrak miselium

Probit

$$16 \mu\text{g/mL} = \frac{(0,390-0,293) - (0,376-0,268)}{(0,390-0,293)} \times 100\% = 0\% \quad 0$$

$$32 \mu\text{g/mL} = \frac{(0,390-0,293) - (0,365-0,247)}{(0,390-0,293)} \times 100\% = 0\% \quad 0$$

$$64 \mu\text{g/mL} = \frac{(0,390-0,293) - (0,334-0,261)}{(0,390-0,293)} \times 100\% = 10,42\% \quad 3,72$$

$$128 \mu\text{g/mL} = \frac{(0,390-0,293) - (0,363-0,252)}{(0,390-0,293)} \times 100\% = 23,96\% \quad 4,29$$

$$256 \mu\text{g/mL} = \frac{(0,390-0,293) - (0,291-0,245)}{(0,390-0,293)} \times 100\% = 88,54\% \quad 6,23$$

Perhitungan persamaan regresi antara konsentrasi dengan kematian (%)

$$v = ax + b \quad y = 5 \quad \Rightarrow \quad x = \frac{5-b}{a}$$

Sampel	Persamaan regresi	R ²	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak miselium	y = 5,5833 x - 7,202	0,9199	153,266

Lampiran 4. Perhitungan jumlah sel kanker payudara T47D

	Jumlah sel
I	122
II	103
III	111
IV	97
Rata-rata	108,25 => 108

$$\begin{aligned} \text{Jumlah sel} &= 108 \times 10^4 \times 10 \text{ sel/mL} \\ &= 108 \times 10^5 \text{ sel/mL (stok)} \end{aligned}$$

$$\text{Jumlah yang dibutuhkan untuk pengujian} = 2 \times 10^4 \text{ sel/well}$$

Untuk 1 *microplate* yang diisi sel kanker = 58 well

$$\text{Untuk 1 well} = \frac{2 \times 10^4}{108 \times 10^5} = 1,85 \mu\text{L/well}$$

$$\text{Untuk 1 } \textit{microplate} \text{ maka } 1,85 \mu\text{L} \times 58 \text{ well} = 107,3 \mu\text{L sel/well}$$

→ diambil dari stok

Untuk mendapatkan 100 μL maka ditambah 98,5 media kultur (1 well)

$$\text{Untuk 1 } \textit{microplate} \text{ maka } 98,5 \times 58 \text{ well} = 5713 \mu\text{L media kultur}$$

**Suspensi sel yang dibutuhkan untuk 1 *microplate* yaitu
107,3 μL sel/well + 5713 μL media kultur**