

**UNIVERSITAS INDONESIA**

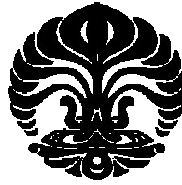
**ISOLASI DAN PRODUKSI SENYAWA DENGAN AKTIVITAS SITOTOKSIK  
TERHADAP SEL KANKER LEHER RAHIM (HeLa) DAN SEL KANKER  
PAYUDARA (T47D) DARI KAPANG LAUT *Emericella nidulans* ASAL  
PERAIRAN WAKATOBISULAWESI TENGGARA**

**TESIS**

**SUJULIYANI**

**0906651196**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
MAGISTER ILMU KELAUTAN  
DEPOK 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**ISOLASI DAN PRODUKSI SENYAWA DENGAN AKTIVITAS SITOTOKSIK  
TERHADAP SEL KANKER LEHER RAHIM (HeLa) DAN SEL KANKER  
PAYUDARA (T47D) DARI KAPANG LAUT *Emericella nidulans* ASAL  
PERAIRAN WAKATOBİ SULAWESI TENGGARA**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains**

**SUJULİYANI**

**0906651196**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
MAGISTER ILMU KELAUTAN  
DEPOK 2012**

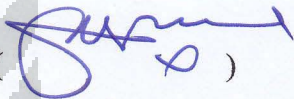
## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :  
Nama : Sujuliyani  
NPM : 0906651196  
Program Studi : Isolasi dan Produksi Senyawa dengan  
Aktivitas Sitotoksik Terhadap Sel Kanker Payudara  
(T47D) dan Sel Kanker Leher Rahim (HeLa) dari  
Kapang Laut *Emericella nidulans* Asal Perairan  
Wakatobi Sulawesi Tenggara.


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

### DEWAN PENGUJI

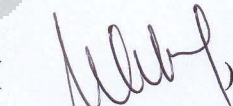
Pembimbing I : Dr. rer. nat. Yasman, M.Sc

()

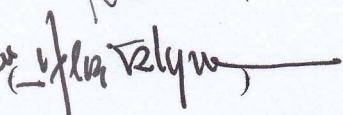
Pembimbing II : Dr. Muhammad Nursid

()

Penguji I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc

()

Penguji II : Dr. Ir. Antonius Herry Cahyana

()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : Juli 2012

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS

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

Nama : Sujuliyani

NPM : 0906651196

Tanda tangan :



Tanggal

: 11 Juli 2012

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

Sebagai sivitas akademika Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Sujuliyani  
NPM : 0906651196  
Program Studi : Magister Ilmu Kelautan  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA)  
Jenis Karya : Tesis


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

Isolasi dan Produksi Senyawa dengan Aktivitas Sitotoksik Terhadap Sel Kanker Leher Rahim (HeLa) dan Sel Kanker Payudara (T47D) dari Kapang Laut *Emericella nidulans* Asal Perairan Wakatobi Sulawesi Tenggara.

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalty Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih mediumkan/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan 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 : Juli 2012  
Yang menyatakan

  
(Sujuliyani)

## KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah, saya panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala karunia-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini dengan judul Isolasi dan Produksi Senyawa dengan Aktivitas Sitotoksik Terhadap Sel Kanker Leher Rahim (HeLa) dan Sel Kanker Payudara (T47D) dari Kapang Laut *Emericella nidulans* Asal Perairan Wakatobi Sulawesi Tenggara. Penulisan tesis ini dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains Program Studi Magister Ilmu Kelautan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Saya sadar bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikannya. Oleh karena itu, saya mengucapkan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. Dr.rer.nat. Yasman, M.Sc dan Dr. Muhammad Nursid, selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk membimbing dan mengarahkan saya selama penelitian serta penyusunan tesis.
2. Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi, Kelautan dan Perikanan (BBRP2B-KP) yang telah memberikan dukungan seluruh dana dan tempat selama penelitian.
3. Tim Penguji yang terdiri atas Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc dan Dr. Ir. Antonius Herry Cahyana atas masukan dan saran yang sangat membantu dalam memperbaiki tesis;
4. Dr. A. Harsono Soepardjo, M.Eng selaku Ketua Program Studi Ilmu Kelautan, Ibu Dra.Tuty Handayani, MS selaku Sekretaris Program Studi Ilmu Kelautan, Bapak Ir. Titis Busono dan segenap staf pengajar Ilmu Kelautan UI.

5. Badan Pengembangan Sumberdaya Manusia Kelautan dan Perikanan (BPSDM-KP) yang telah memberikan beasiswa pendidikan selama saya kuliah di Pascasarjana Ilmu Kelautan UI.
6. Seluruh keluarga besar BBRP2B-KP atas duka, suka, semangat yang diberikan dalam penelitian. Terutama untuk Mbak Dewi, Mbak Ari, Mbak Maya, Mbak Asri, Mbak Nur, Mbak Iis, Pak Tomi, Pak Endar serta rekan-rekan mahasiswa penelitian Isna dan Untung (IPB), Steni dan Amel (Al-Azhar), Rani (Biologi UI).
7. Suami Raka Momon Saputra, anakku Helen Dalilah Rakayani dan Rory Wira Kusumah Rakayani yang selalu memberikan semangat dan dukungannya selama perkuliahan dan menyelesaikan Tesis.
8. Ayahanda Satiran dan Ibunda alm Iskayati serta keluarga besar di Mempawah, terimakasih untuk dukungan, semangat dan arahan kepada penulis.

Semoga Allah SWT membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyelesaian Tesis ini. Semoga Tesis bermanfaat untuk pengembangan ilmu pengetahuan dan khususnya masyarakat.

Depok, 10 Juli 2012

Penulis

## ABSTRAK

Nama : Sujuliyani  
Program Studi : Magister Ilmu Kelautan  
Judul : Isolasi dan Produksi Senyawa dengan Aktivitas Sitotoksik Terhadap Sel Kanker Leher Rahim (HeLa) dan Sel Kanker Payudara (T47D) dari Kapang Laut *Emericella nidulans* Asal Perairan Wakatobi Sulawesi Tenggara

Kapang dari lingkungan laut (*marine derived fungi*) salahsatunya adalah *Emericella nidulans* diketahui menghasilkan senyawa aktif emestrin. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa target selain senyawa emestrin dari fraksi teraktif yang dihasilkan oleh ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans*, mengetahui efek sitotoksik senyawa target tersebut terhadap sel kanker payudara (T47D) dan sel kanker leher rahim (HeLa). Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk melakukan produksi senyawa target. Produksi senyawa target dari kapang laut *Emericella nidulans*, dilakukan dengan tiga medium fermentasi yang berbeda yaitu *Malt Ekstract Broth* (MEB), *Soluble Starch Soytone* (SWS) dan *Minimum Fungi Medium* (MFM). Waktu yang digunakan untuk fermentasi produksi senyawa target adalah 1, 2, 3, 4 dan 5 minggu. Senyawa target selain emestrin berhasil diisolasi dari ekstrak miselium *Emericella nidulans*. Senyawa target yang diisolasi memiliki perbedaan dengan emestrin berdasarkan nilai *rf* pada KLT, serapan UV dan <sup>1</sup>H-NMR. Senyawa target memiliki aktitas sitotoksik yang kuat terhadap sel HeLa dan sel T47D dengan IC<sub>50</sub> berturut-turut sebesar 21,2 dan 20,9 µg/ml. Hasil produksi senyawa target paling baik dihasilkan di medium *Malt Ekstract Broth* (MEB) pada minggu ke-3.

Kata kunci : *Emericella nidulans*, sel kanker payudara (T47D), sel kanker leher rahim (HeLa), kapang laut.



## ABSTRACT

Name : Sujuliyani  
Majority : Magister of Marine Sains  
Title : Isolation and production of cytotoxic compound against cervix cancer cell (HeLa) and breast cancer cell (T47D) from marine fungi, *Emericella nidulans* from Wakatobi Marine National Park, South East Sulawesi.

Marine fungi *Emericella nidulans* has known as its emestrin active compound. In this present study, we focused on extracting compounds beside emestrin as the most targeted compound isolated from mycelium marine fungi *Emericella nidulans* in cervix cancer cell (HeLa) and breast cancer cell (T47D). Productions from the targeted compound were seeding in fermented media *Malt Extract Broth* (MEB), *Soluble Starch Soytone* (SWS) and *Minimum Fungi Medium* (MFM). The timing production of fermenting compound were 1,2,3, 4 and 5 weeks. The targeted compound beside emestrin has been successfully isolated from *Emericella nidulans* mycelium. The targeted compound was different with emestrin base on *rf* value on TLC, UV and <sup>1</sup>H-NMR spectrum. The targeted compound showed has a cytotoxic activity against HeLa and T47D cell with IC<sub>50</sub> value of 21,5 µg/ml and 20,9 µg/ml respectively. The highest yield of the targeted compound was found in MEB after 3 week of fermentation.

Keywords: *Emericella nidulans*, breast cancer cell (T47D), cervix cancer cell (HeLa), marine fungi.

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS</b> .....	<b>iii</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Masalah Penelitian .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Batasan Penelitian .....	4
1.5 Hipotesis Penelitian.....	5
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Kapang .....	6
2.2 Kapang dari lingkungan laut ( <i>marine-derived fungi</i> ) .....	7
2.3 Metabolit Sekunder Kapang .....	9
2.4 Fermentasi Kapang .....	12
2.5 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Kapang .....	14
2.6 Ekstraksi Miselium Kapang .....	15
2.7 Pemisahan Senyawa dengan Teknik Kromatografi.....	16
2.8 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi .....	17
2.9 Kanker .....	18

2.9.1 Sel Kanker Hela .....	19
2.9.2 Sel Kanker Payudara T47D .....	20
<b>3. METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	21
3.2 Bahan Penelitian .....	21
3.3 Alat Penelitian .....	22
3.4 Isolasi Senyawa Target .....	22
3.4.1 Penyebaran dan penumbuhan kapang <i>Emericella nidulans</i> .....	22
3.4.2 Starter kapang <i>Emericella nidulans</i> .....	23
3.4.3 Fermentasi kapang <i>Emericella nidulans</i> .....	23
3.4.6 Ekstraksi metabolit .....	24
3.4.7 Fraksinasi senyawa aktif .....	24
3.4.8 Karakterisasi senyawa aktif .....	26
3.4 Uji Sitotoksik .....	27
3.6 Produksi Senyawa Target .....	30
3.6.1 Penyebaran MFW 39-08 <i>Emericella nidulans</i> .....	30
3.6.2 Starter <i>Emericella nidulans</i> .....	30
3.6.3 Produksi senyawa target dari kapang <i>Emericella nidulans</i> .....	30
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Isolasi Senyawa Aktif dari Kapang Laut <i>Emericella nidulans</i> .....	34
4.2 Aktivitas Sitotoksik Senyawa Target .....	49
4.3 Produksi Senyawa Target .....	51
4.3.1 Berat kering miselium .....	52
4.3.2 Rendemen ekstrak miselium kapang laut <i>Emericella nidulans</i> .....	55
4.3.3 Pengukuran pH dan salinitas medium fermentasi .....	56
4.3.4 KCKT senyawa target .....	60
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan .....	72
5.2 Saran .....	72
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>73</b>

## DAFTAR GAMBAR

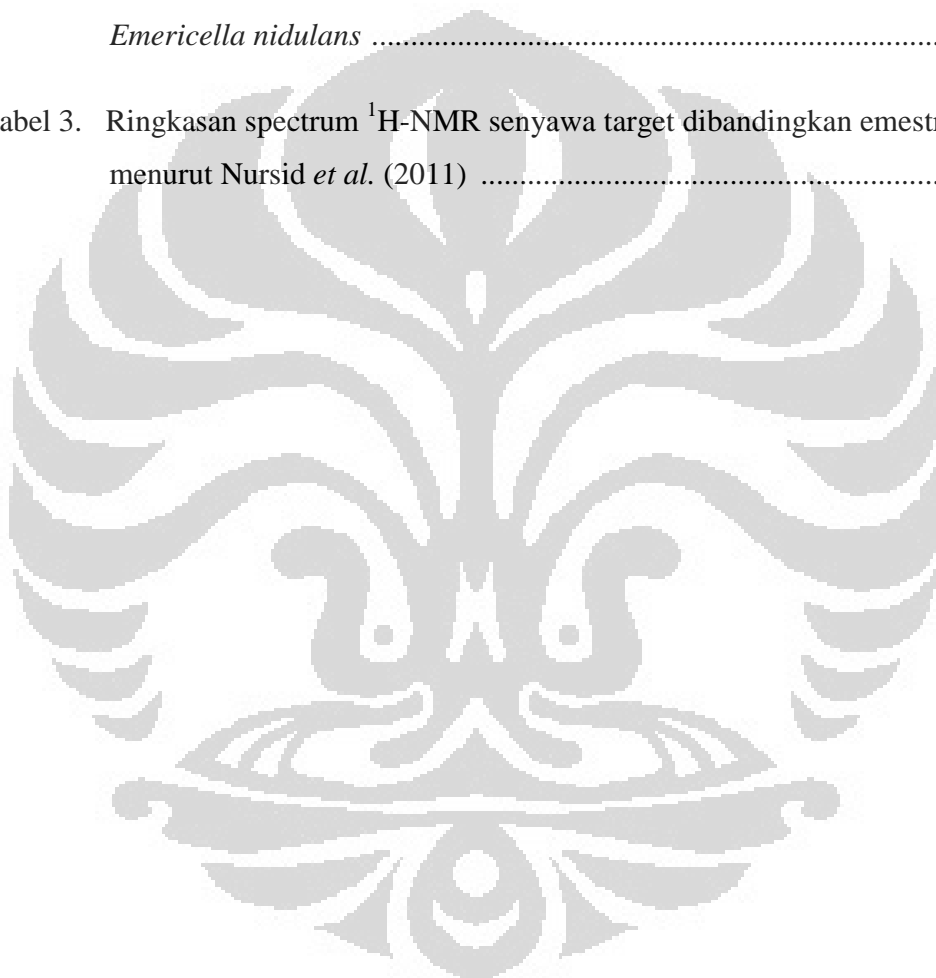
Gambar 1. Struktur senyawa emestrin (Nursid. 2012).....	12
Gambar 2. Diagram alur isolasi senyawa aktif dari kapang <i>Emericella nidulans</i> .....	29
Gambar 3. Diagram alur produksi senyawa target kapang laut <i>Emericella nidulans</i> .....	33
Gambar 4. Permukaan koloni kapang laut <i>Emericella nidulans</i> dalam media MEA (A). sebalik koloni kapang dalam medium MEA (B).....	34
Gambar 5. Fermentasi kapang <i>Emericella nidulans</i> usia 5 minggu dengan medium MEB 1L didalam labu 3L.....	35
Gambar 6. Hasil fraksinasi ekstrak miselium <i>Emericella nidulans</i> .....	37
Gambar 7. Profil KLT fraksi F1, F2, F3 dan F4 (A) Profil KLT fraksi F1, F2, F3 dan F4 (Nursid <i>et al.</i> , 2011) (B).....	38
Gambar 8. Kromatogram KLT hasil fraksinasi F3 (A) dan Kromatogram KLT hasil fraksinasi F3 (Nursid <i>et al.</i> 2011) (B).....	39
Gambar 9. Kromatogram KLT preparatif senyawa target dari fraksinasi F3.3 .....	40
Gambar 10. Kromatogram KCKT senyawa target.....	41
Gambar 11. Profil kromatogram KCKT ekstrak miselium kapang laut <i>Emericella nidulas</i> .....	42
Gambar 12. Kromatografi lapis tipis (KLT) senyawa target (A) dan KLT senyawa emestrin (Nursid <i>et al.</i> , 2011) (B).....	43

Gambar 13A. Profil kromatogram KCKT (A) dan serapan UV senyawa target (B).....	44
Gambar 13B. Kromatogram KCKT dan serapan UV emestrin (Nursid <i>et al.</i> , 2011).....	44
Gambar 14 A. Profil kromatogram <sup>1</sup> H-NMR senyawa target.....	47
Gambar 14 B. Profil kromatogram <sup>1</sup> H-NMR senyawa emestrin (Nursid <i>et al.</i> , 2011).....	48
Gambar 15. Profil aktivitas sitotoksik dengan metode MTT terhadap sel HeLa dan T47D setelah diberi perlakuan senyawa target selama 24 jam.....	49
Gambar 16. Efek senyawa target terhadap morfologi sel HeLa .....	50
Gambar 17. Efek senyawa target terhadap morfologi sel T47D.....	51
Gambar 18. Berat kering miselium kapang laut <i>Emericella nidulans</i> dari minggu pertama hingga minggu kelima dengan media yang berbeda .....	52
Gambar 19. Rendemen ekstrak miselium kapang <i>Emericella nidullans</i> .....	55
Gambar 20. Hasil pengukuran pH medium fermentasi sebelum ditumbuhi dan setelah ditumbuhi kapang <i>Emericella nidulans</i> dari minggu pertama hingga minggu ke 5.....	57
Gambar 21. Hasil pengukuran salinitas medium fermentasi sebelum ditumbuhi dan setelah ditumbuhi kapang <i>Emericella nidulans</i> dari minggu pertama hingga minggu ke 5.....	59
Gambar 22. Profil kromatogram KCKT dan serapan UV ekstrak miselium dari medium fermentasi SWS diwaktu fermentasi 1 minggu .....	61

Gambar 23.	Profil kromatogram KCKT dan serapan UV ekstrak miselium dari medium fermentasi SWS diwaktu fermentasi 2 minggu .....	62
Gambar 24.	Profil kromatogram KCKT ekstrak miselium dari medium fermentasi SWS diwaktu fermentasi 3 minggu.....	63
Gambar 25.	Profil Kromatogram KCKT dan serapan UV Ekstrak miselium dari medium fermentasi SWS diwaktu fermentasi 4 minggu .....	64
Gambar 26.	Profil kromatogram KCKT dan serapan UV ekstrak miselium dari medium fermentasi SWS diwaktu fermentasi 5 minggu .....	65
Gambar 27.	Profil kromatogram KCKT dan serapan UV ekstrak miselium dari medium fermentasi MEB diwaktu fermentasi 1 minggu.....	66
Gambar 28.	Profil kromatogram KCKT dan serapan UV ekstrak miselium dari medium fermentasi MEB diwaktu fermentasi 2 minggu.....	67
Gambar 29.	Profil kromatogram KCKT dan serapan UV ekstrak miselium dari medium fermentasi MEB diwaktu fermentasi 3 minggu.....	68
Gambar 30.	Profil kromatogram KCKT ekstrak miselium dari medium fermentasi MEB diwaktu fermentasi 4 minggu .....	69
Gambar 31.	Profil kromatogram KCKT ekstrak miselium dari medium fermentasi MEB diwaktu fermentasi 5 minggu .....	69
Gambar 32.	Kadar senyawa target dari ekstrak miselium kapang laut <i>Emericella nidulans</i> hasil produksi senyawa target pada medium SWS dan MEB.....	70

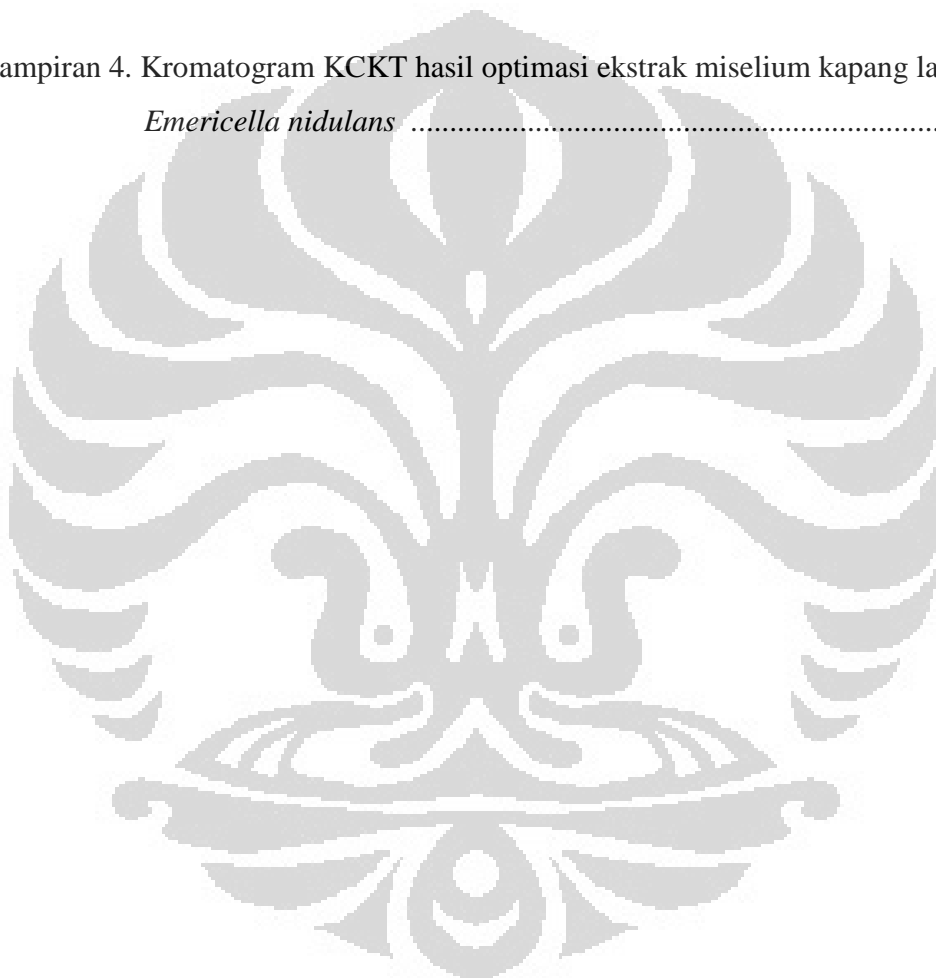
## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Berat kering hasil fraksinasi ekstrak miselium kapang laut <i>Emericella nidulans</i> .....	38
Table 2. Berat kering hasil fraksinasi F3 ekstrak kasar miselium kapang laut <i>Emericella nidulans</i> .....	39
Tabel 3. Ringkasan spectrum <sup>1</sup> H-NMR senyawa target dibandingkan emestrin menurut Nursid <i>et al.</i> (2011) .....	46



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil pengukuran $^1\text{H-NMR}$ senyawa target .....	78
Lampiran 2. Analisis probit senyawa target vs HeLa .....	82
Lampiran 3. Analisis probit senyawa target vs T47D .....	83
Lampiran 4. Kromatogram KCKT hasil optimasi ekstrak miselium kapang laut <i>Emericella nidulans</i> .....	84





# BAB 1 PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Kapang yang berasal dari lingkungan laut (*marine-derived fungi*) dikenal memiliki metabolit sekunder aktif yang potensial dikembangkan sebagai senyawa obat, salah satu diantaranya adalah kapang *Emericella nidulans var. acristata* yang diisolasi dari alga hijau laut asal Mediterania yang dilaporkan mengandung senyawa arugosins G dan H. Kedua senyawa tersebut memiliki aktivitas antitumor dengan nilai rata-rata  $IC_{50}$  5,5  $\mu$ g/mL (Kralj *et al.*, 2005). Penelitian kapang laut lain dilakukan oleh Holler *et al.* (2000) yang berhasil mengisolasi senyawa aktif asperazin dari kapang *Aspergillus niger* yang merupakan kapang endofit spons *Hyrtios proteu*. Kapang *Trichoderma harzianum* yang diisolasi dari spons *Holichondria okadai* juga dilaporkan menghasilkan senyawa aktif trichodenone A-C .

Senyawa aktif lain yang diperoleh dari kapang laut adalah senyawa aspergilide A yang memiliki aktifitas terhadap sel lestari 1210 dengan  $IC_{50}$  sebesar 2,1 $\mu$ g/mL. Senyawa tersebut dihasilkan dari kapang laut *Aspergillus ostianus* yang diisolasi dari spons laut (Kito *et al.*, 2008). Penelitian senyawa aktif dari kapang laut juga dipublikasikan oleh Hiort *et al.* (2004) dari kapang laut *Aspergillus niger* yang diisolasi dari spons *Axinella damicornis* menghasilkan senyawa bicoumanigrin yang memiliki sitotoksik moderat terhadap panel *cell line*.

Kegiatan pencarian senyawa bioaktif dari kapang laut (*marine fungi*) sudah dilakukan sejak tahun 2008 oleh Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBRP2B-KP). Pencarian senyawa bioaktif kapang laut diantaranya berasal dari pantai Binuangen, Kabupaten Lebak, Banten, perairan sekitar Kota Manado, Sulawesi Utara, perairan sekitar Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu, DKI Jakarta dan Taman Nasional Laut Wakatobi, Sulawesi Tenggara. Inang (*hospes*) kapang laut sebagian besar berasal dari spons (*Porifera*) karang lunak (*Coelenterata*), ascidia dan rumput laut merah.

Salah satu kapang laut yang diisolasi dari ascidia *Aplidium longithorax* asal perairan Taman Nasional Laut Wakatobi, Sulawesi Tenggara dilakukan oleh Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBRP2B-KP) adalah kapang *Emericella nidulans* (kode isolat MFW-39-08). Nursid *et al.* (2011) melaporkan bahwa ekstrak miselium kapang *Emericella nidulans* mengandung senyawa makrosiklik epidithiodioxopiperazine (emestrin) yang memiliki aktivitas antikanker. Rumus molekul senyawa tersebut adalah  $C_{27}H_{22}N_2O_{10}S_2$ , serta memiliki aktivitas sitotoksik kuat terhadap sel kanker payudara (T47D), HepG2, C28 dan Hela dengan  $IC_{50}$  berturut-turut sebesar 1,7  $\mu\text{g/mL}$ , 4,3  $\mu\text{g/mL}$ , 2,6  $\mu\text{g/mL}$ , dan 12,8  $\mu\text{g/mL}$ . Sebaliknya, senyawa tersebut tidak toksik terhadap sel normal Vero dengan  $IC_{50}$  sebesar 258,8  $\mu\text{g/mL}$ .

Fraksi senyawa aktif dari ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* menghasilkan satu fraksi paling aktif terhadap sel kanker T47D. Fraksi teraktif tersebut terdapat 3 spot senyawa dalam sistem kromatografi lapis tipis (KLT). Salah

satu dari spot tersebut berhasil diisolasi dan diidentifikasi sebagai emestrin (Nursid *et al.*, 2011). Dua spot lain dari fraksi teraktif tersebut diperkirakan memiliki aktifitas sitotokasik terhadap sel lestari kanker.

Isolasi terhadap dua senyawa target tersebut sangat menarik untuk dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menambah informasi kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans*.

Optimasi produksi senyawa target dari ekstrak kasar miselium kapang laut *Emericella nidulans* perlu dilakukan dengan harapan memberikan petunjuk awal jenis media fermentasi paling baik untuk memproduksi senyawa bioaktif paling optimal serta waktu fermentasi paling optimal dalam memproduksi senyawa bioaktif.

## 1.2. Masalah Penelitian

- 1.2.1 Apakah fraksi teraktif yang mengandung senyawa emestrin dari kapang laut *Emericella nidulas* dapat diperoleh dengan metode yang sama sebagaimana dilakukan Nursid *et al.* (2011) dan pengisolasian senyawa target selain emestrin dapat dilakukan?
- 1.2.2 Bagaimana aktivitas sitotoksik senyawa target yang diisolasi terhadap sel lestari kanker payudara (T47D) dan sel kanker leher rahim (HeLa)?
- 1.2.3 Media fermentasi dan waktu fermentasi manakah yang mampu memberikan produksi senyawa target paling optimal?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- 1.3.1 Mengisolasi senyawa target selain senyawa emestrin dari fraksi teraktif yang dihasilkan oleh miselium kapang laut *Emericella nidullans*.
- 1.3.2 Mengetahui efek sitotoksik senyawa target tersebut terhadap sel kanker payudara (T47D) dan sel kanker leher rahim (HeLa).
- 1.3.2 Mengetahui jenis medium fermentasi dan waktu fermentasi paling optimal memproduksi senyawa target tersebut.

### 1.4 Batasan Penelitian

- 1.4.1 Isolasi senyawa aktif dari kapang laut *Emericella nidulans* dengan metode ekstraksi dan fraksinasi sesuai dengan metode Nursid *et al.* (2011)
- 1.4.2 Karakterisasi senyawa bioaktif dari kapang *Emericella nidulans* dengan kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi cair kecepatan tinggi (KCKT) dan *Nuclear Magnetic Resonance* (<sup>1</sup>H-MNR)
- 1.4.3 Uji sitotoksik senyawa bioaktif kapang *Emericella nidulans* terhadap sel kanker payudara (T47D) dan sel kanker leher rahim (HeLa)
- 1.4.4 Produksi senyawa bioaktif dari kapang *Emericella nidullans* dengan media fermentasi *Malt Ektract Broth* (MEB), *Soluble Starch Soytone* (SWS) dan *Minimum Fungi Medium* (MFM)

## 1.5 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian adalah :

1.5.1 Ekstrak kasar miselium kapang laut *Emericella nidulans* dari fraksi teraktif mampu menghasilkan senyawa target derivat emestrin.

1.5.2 Senyawa target tersebut juga memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara (T47D) dan sel kanker leher rahim sebagaimana emestrin.

1.5.3 Jenis medium fermentasi dan waktu fermentasi kapang laut *Emericella nidulans* sangat mempengaruhi kemampuan kapang laut *Emericella nidulans* dalam memproduksi senyawa target.

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Kapang**

Kapang merupakan organisme eukario, 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 *et al.*, 2009).

Kapang atau fungi (tunggal = fungus) adalah mikroorganisme yang tidak mengandung klorofil, berbentuk hifa atau sel tunggal, eukaryotik, memiliki dinding sel dari kitin atau selulosa, serta dapat bereproduksi dengan cara seksual ataupun aseksual. Kapang dapat berbentuk uniselular ataupun multi selular (Ganjar *et al.*, 1999). Kapang multi selular memiliki hifa, yaitu struktur berbentuk tabular yang terbentuk dari pertumbuhan spora atau konodia. Hifa dapat berfungsi untuk mengabsorpsi nutrisi dan tumbuh didalam substrat. Hifa dapat memiliki septa atau tidak. Hifa yang berseptum dan memiliki satu inti disebut monositik. Hifa yang tidak berseptum dan mempunyai banyak inti disebut senositik (Madigan *et al.*, 2009).

Miselium dan spora (sel resisten dalam keadaan istirahat atau dorman) merupakan bagian dari tubuh atau talus suatu kapang. Miselium merupakan bagian tubuh kapang yang menyolok dan miselium dibentuk dari kumpulan hifa yang bercabang-cabang membentuk suatu jala dan umumnya berwarna putih. Hifa berisi

protoplasma dikelilingi oleh suatu dinding kuat. Pertumbuhan hifa berlangsung terus menerus dibagian apical, sehingga panjangnya tidak dapat ditentukan secara pasti. Diameter hifa umumnya tetap, yaitu antara 3 - 30  $\mu\text{m}$  (Gandjar *et al.*, 2006). Spesies-spesies yang berbeda memiliki diameter berbeda pula, dan ukuran diameter tersebut dapat juga dipengaruhi oleh keadaan lingkungan (Carlile & Watkinson. 1994 ; Gandjar *et al.*, 2006).

## 2.2 Kapang dari Lingkungan Laut (*marine-derived fungi*)

Kapang yang berasal dari lingkungan laut (*marine-derived fungi*) dikenal memiliki metabolit sekunder aktif yang potensial sebagai obat alami. Kapang laut memiliki jalur metabolisme sekunder spesifik dibandingkan fungi terestrial (Mabrouk *et al.*, 2008). Fungi hidup berasosiasi dengan organisme lain, yang tidak memiliki struktur mekanisme pertahanan yang jelas. Organisme tersebut memproduksi zat kimia berupa senyawa metabolit sekunder, baik dihasilkan sendiri ataupun berasosiasi dengan mikroflora untuk dapat bertahan hidup pada habitat laut (Debbab *et al.*, 2010).

Kohlmeyer & Kohlmeyer (1979) membagi fungi laut menggunakan definisi ekologi menjadi dua, yaitu fungi laut obligat dan fakultatif. Fungi laut obligat merupakan kelompok fungi yang hanya dapat tumbuh dan bersporulasi dalam lingkungan laut atau estuarin. Fungi laut fakultatif merupakan kelompok fungi dari lingkungan darat yang mampu tumbuh dan bersporulasi di lingkungan laut.

Beberapa penelitian tentang kapang laut sudah dilakukan diantaranya adalah penelitian yang dilakukan oleh Heller (1999) berhasil mengisolasi 45 isolat

*Penicillium* dari 11 jenis spons dan dihasilkan juga 52 isolat *Aspergillus* dari 4 jenis spons. Holler *et al.* (2000) dari kapang *Aspergillus niger* menghasilkan senyawa aktif asperazine, diisolasi dari spons *Hyrtios proteu*, selain itu juga ditemukan kapang *Trichoderma harzianum* menghasilkan senyawa aktif trichodenone A-C, diisolasi dari spons *Holichondria okadai*.

Kralj *et al.* (2005) mengisolasi kapang *Emericella nidulans* var. *acristata* diisolasi sebagai endophyte dari alga hijau Mediterania. Kapang tersebut menghasilkan dua senyawa baru yaitu arugosins G dan H senyawa ini memiliki aktivitas antitumor dengan nilai rata-rata  $IC_{50}$  5,5  $\mu$ g/mL.

Nursid *et al.* (2011) melakukan isolasi kapang laut *Emericella nidulans* atau *Aspergillus nidulans* memiliki toleransi dan adaptasi dalam lingkungan yang berkadar garam 30 %, dan merupakan kapang filamentus yang tersebar luas dan bersifat kosmopolitan. Koloni tumbuh dengan cepat dengan warna koloni putih kekuningan. Namun diperkirakan kapang laut tersebut bukan merupakan kapang laut sejati (*marine obligate*). Kemungkinan besar spora kapang ini terbawa aliran air hujan (*run off*) dari daratan kemudian terbawa ke lingkungan laut.

Kapang *Emericella nidulans* dengan kode MFW 39-08 diisolasi dari ascidia *Aplidium longithorax*. Ascidia merupakan hewan laut dari filum Chordata (kelompok hewan yang memiliki tulang belakang) tetapi masih primitif. Meskipun ascidia memiliki tubuh yang lunak dan tidak memiliki tulang belakang tetapi ascidia tidak termasuk invertebrata. Ascidia merupakan hewan yang bersifat sesil dan biasanya



hidup menempel pada substrat karang, nama umum dari ascidia *sea squirts*. Ascidia dikenal sebagai salah satu hewan laut yang banyak mengandung senyawa metabolit sekunder aktif. Beberapa metabolit yang dihasilkan bersifat toksik sehingga memiliki potensi untuk digunakan dalam bidang farmasi. Metabolit yang dihasilkan tersebut berfungsi sebagai sarana mempertahankan diri secara kimia. (Nursid *et al.*, 2011).

### 2.3 Metabolit Sekunder Kapang

Metabolisme adalah reaksi kimia yang berlangsung di dalam sel. Metabolit merupakan hasil dari proses metabolisme. Metabolit terdiri atas dua macam, yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder (Calvo *et al.*, 2002). Polisakarida, protein, lemak, dan asam nukleat, merupakan penyusun utama dari metabolit primer. Keseluruhan proses sintesis dan perombakan zat-zat yang dilakukan mikroorganisme untuk kelangsungan hidupnya, disebut proses-proses metabolisme primer (Manitto, 1992).

Metabolit sekunder diproduksi sampai kapang mencapai fase logaritmik akhir dan memasuki fase stasioner (Bilgrami & Verma, 1994). Metabolit sekunder, meskipun tidak sangat penting bagi eksistensi suatu individu, namun sering berperan pada kelangsungan hidup suatu spesies, dalam perjuangan menghadapi spesies lain. Misalnya zat kimia untuk pertahanan, penarik seks dan feromon (Manitto, 1992).

Senyawa metabolit sekunder kapang dapat bersifat sebagai antikanker, diantaranya hasil penelitian Liu *et al.* (2009) bahwa senyawa metabolit derivat

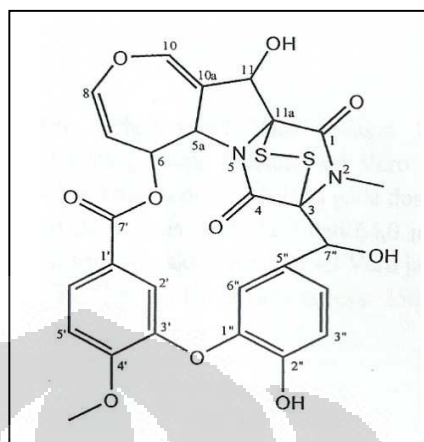
*Dimane sesquiterpenoid* yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus ustus* diisolasi dari spons *Suberitas demuncula* memiliki aktivitas sitotoksik, dengan nilai *Inhibition concentration*<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub>) sebesar 0,6 ug/ml terhadap sel L5178Y. Penelitian senyawa metabolit sekunder dari kapang *Emericella nidulans var. acristata* yang diisolasi dari alga hijau laut asal Mediterania dilaporkan mengandung senyawa arugosins G dan H. Kedua senyawa tersebut memiliki aktivitas antitumor dengan nilai rata-rata IC<sub>50</sub> 5,5 µg/mL (Kralj *et al.*, 2005). Penelitian kapang laut lain dilakukan oleh Holler *et al.* (2000) berhasil mengisolasi senyawa aktif asperazin dari kapang *Aspergillus niger* yang merupakan kapang endofit spons *Hyrtios proteu*. Kapang *Trichoderma harzianum* yang diisolasi dari spons *Holichondria okadai* juga dilaporkan menghasilkan senyawa aktif trichodenone A-C .

Senyawa aktif lain yang diperoleh dari kapang laut adalah senyawa aspergilide A yang memiliki aktifitas terhadap sel lestari 1210 dengan IC<sub>50</sub> sebesar 2,1µg/mL. Senyawa tersebut dihasilkan dari kapang laut *Aspergillus ostianus* yang diisolasi dari spons laut (Kito *et al.*, 2008). Penelitian senyawa aktif dari kapang laut juga dipublikasikan oleh Hiort *et al.* (2004) dari kapang laut *Aspergillus niger* yang diisolasi dari spons *Axinella damicornis* menghasilkan senyawa bicoumanigrin yang memiliki sitotoksik moderat terhadap panel *cell line*. Penelitian senyawa metabolit dari kapang laut juga dilakukan oleh Pratitis *et al.* (2010), dari kapang *Aspergillus ustus* menghasilkan metabolit sekunder yang mampu menghambat 89% pertumbuhan sel kanker payudara (T47D), serta mampu menghambat pertumbuhan radikal bebas sampai 56%.

Metabolit sekunder dari kapang laut yang telah dimanfaatkan sebagai obat, antara lain adalah kapang *Penicillium chrysogenum* menghasilkan senyawa metabolit sekunder penicillin berfungsi sebagai antibakteri, selain itu kapang *Cephalosporium acremonium* menghasilkan senyawa metabolit sekunder Cephalosporin yang juga berfungsi sebagai antibakteri dan kapang *Trichoderma polysporum* menghasilkan senyawa metabolit sekunder Cyclosporin yang berfungsi sebagai immunosupresan (Effendi, 2004).

Miselium kapang *Emericella nidulans* menghasilkan senyawa emestrin dengan aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D, HepG2, C28 dan Hela dengan  $IC_{50}$  berturut-turut sebesar 1,7  $\mu\text{g/ml}$ , 4,3  $\mu\text{g/ml}$ , 2,6  $\mu\text{g/ml}$ , dan 12,8  $\mu\text{g/ml}$ , namun senyawa tersebut tidak toksik terhadap sel normal Vero dengan  $IC_{50}$  sebesar 258,8  $\mu\text{g/ml}$  (Nursid *et al.*, 2011).

Isolasi senyawa aktif emestrin oleh Nursid *et al.* (2011) dari miselium kapang laut *Emericella nidullans* diisolasi dari ascidia laut. Senyawa aktif emestrin dengan rumus molekul  $C_{27}H_{22}N_2O_{10}S_2$  memiliki aktifitas sitotoksik yang kuat terhadap sel T47D, HepG2, C28 dan Hela dengan  $IC_{50}$  berturut-turut 1,7  $\mu\text{g/ml}$ , 4,3  $\mu\text{g/ml}$ , 2,6  $\mu\text{g/mL}$  dan 12,8  $\mu\text{g/mL}$ . Senyawa aktif emestrin dapat menyebabkan perubahan yang signifikan terhadap morfologi sel T47D, HepG2 dan C28 pada dosis 0,8  $\mu\text{g/mL}$ . Aktifitas sitotoksik senyawa aktif tidak begitu kuat terhadap sel vero (sel normal) dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 258,8  $\mu\text{g/ml}$ , struktur senyawa emestrin dapat digambarkan pada Gambar 1.



Gambar1. Struktur senyawa emestrin  
Sumber : (Nursid, 2012)

Seya *et al.* (1985) Pertama kali berhasil mengisolasi emestrin oleh dari kapang *Emericella striata*. Herath *et al.* (2005) juga berhasil mengisolasi emestrin dari kapang *Verticimonosporium ellipticus*. Onodera *et al.* (2004) telah mengisolasi senyawa MPC 1001 serta beberapa analognya. MPC 1001 merupakan derivat dari emestrin dimana salah satu gugus OH dari emestrin dimana salah satu gugus OH dari emestrin berubah menjadi gugus metoksi (OCH<sub>3</sub>). MPC1001 memiliki aktivitas sitotoksik yang sangat kuat terhadap sel DU145 (tumor prostat) dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 9,3 mol/L.

#### 2.4 Fermentasi Kapang

Fermentasi merupakan proses yang melibatkan aktivitas mikroorganisme untuk menghasilkan suatu produk. Aktivitas tersebut dapat bersifat fermentatif jika tidak melibatkan O<sub>2</sub> sebagai akseptor elektron terakhir dan bersifat respiratif jika melibatkan O<sub>2</sub> (Black, 1999). Aktivitas mikroorganisme bertujuan untuk memecah

senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan memanfaatkan enzim-enzimnya (Gandjar *et al.*, 1992).

Proses fermentasi terdiri atas berbagai macam tipe, antara lain dapat diklasifikasikan berdasarkan jenis substrat yang dimetabolisme (Madigan *et al.*, 2000). Berdasarkan substratnya, proses fermentasi dapat dibedakan menjadi dua, yaitu fermentasi substrat padat dan fermentasi substrat cair.

Fermentasi dengan cara *Batch fermentation* merupakan fermentasi dengan sistem tertutup, yaitu proses menginokulasi mikroorganisme dalam wadah berisi nutrisi dan nutrisi tidak ditambah lagi ketika fermentasi berlangsung, kecuali penambahan oksigen (untuk 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 relatif murah. Hasil didapatkan berupa metabolit atau produk seragam dan konsisten dengan waktu relatif cepat (Glazer & Nikaido, 1998). Fermentasi umumnya menggunakan substrat karbohidrat seperti glukosa atau laktosa, kemudian menghasilkan produk berupa alkohol atau jenis senyawa organik lainnya disertai gas CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, dan konsentrasi H<sup>+</sup> berlebih (Madigan *et al.*, 2000).

Nursid *et al.* (2011) melakukan fermentasi biomassa kapang *Emericella nidulans* yang diisolasi dari *Acidia Aplidium longithorax*, di dalam medium SWS (*Soluble Starch-Soytone*) yang mengandung 1% pati dapat larut, 0,2% pepton soya

dan 1 L air laut, fermentasi dilakukan secara statis pada suhu 27 - 28°C selama 5 minggu.

Fermentasi dengan menggunakan medium *Malt Extract Broth* (MEB) dengan komposisi 0,3 % *malt extract*, 0,3 % *yeast extract* dan 0,5 % *pepton* selama 3 minggu terhadap kapang laut *Trichoderma*. Fermentasi dilakukan secara statis pada suhu 26 – 28°C (Hikmah, 2011). Fermentasi menggunakan medium *Minimum Fungi Medium* (MFM) dengan komposisi 0,02% *extract yeast*, 0,1% *soluble starch* juga dilakukan Pratitis *et al.*, (2010) pada proses fermentasi kapang *Aspergillus ustus*

## 2.5 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Kapang

Kapang memerlukan kondisi yang optimim agar dapat tumbuh dengan baik. Faktor-faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan adalah : media/substrat, temperatur, cahaya, pH dan kelembapan (Gandjar *et al.*, 2006). Menurut Gadd (1988) umumnya kapang dapat tumbuh dan berkembang dengan baik pada media mengandung karbohidrat tinggi. Sumber-sumber karbon dapat digunakan oleh kapang untuk pertumbuhannya berasal dari asam-asam organik, alkohol, makromolekul seperti protein, polisakarida dan lemak, tetapi glukosa, fruktosa, manosa dan galaktosa merupakan sumber karbon yang banyak digunakan dalam fermentasi kapang. Amonia, nitrat, nitrit dan urea merupakan sumber nitrogen yang umum digunakan oleh kapang untuk pertumbuhannya. Sumber nitrogen dalam medium fermentasi kapang diantaranya dapat diperoleh dari *soya pepton* dan *extract yeast*.

pH substrat sangat mempengaruhi pertumbuhan kapang, karena enzim-enzim tertentu hanya akan mengurai suatu substrat sesuai aktivitasnya pada pH tertentu dan umumnya kapang menyukai pH media asam (Gandjar *et al.*, 2006). Namun ada sebagian besar kapang konidial memiliki kisaran pertumbuhan pada pH media antara 4 – 8. Jong (1981) menyatakan selama proses fermentasi kapang, pH media dapat berubah, tergantung dari komposisi dan kapasitas penyangga dari media, temperatur inkubasi dan jenis senyawa metabolit yang dihasilkan.

Bugni & Ireland (2004) menyatakan bahwa kapang laut bersifat halotolerant dan umumnya memiliki mekanisme metabolisme yang unik sebagai respon atas tingginya kadar garam. Kapang halotoleran memiliki mekanisme osmoregulasi yang mengatur produksi senyawa-senyawa *polyol* dan asam amino dalam hubungannya dengan peningkatan konsentrasi ion-ion dalam sitoplasma, dan kemungkinan besar produksi metabolit sekunder dari kapang tersebut sensitif terhadap perubahan konsentrasi kadar garam (salinitas).

## **2.6 Ekstraksi Miselium Kapang**

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutan terhadap dua cairan berbeda, seperti air dan pelarut organik lain. 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).

Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai cara, contohnya seperti maserasi, perkolasi, sokhletasi dan refluks. Faktor yang memengaruhi proses ekstraksi antara lain adalah : persiapan sampel, waktu ekstraksi, kuantitas pelarut, temperatur pelarut dan tipe pelarut (Freimoser, 1999).

## **2.7 Pemisahan Senyawa dengan Teknik Kromatografi**

Kromatografi merupakan teknik pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kepolaran (Cannell, 1998). 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)

Kromatografi terbagi menjadi beberapa jenis, antara lain kromatografi padatan cair, kromatografi partisi, kromatografi penukar ion, kromatografi eksklusi, 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).



Kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase diam berbahan gel silika yang dicampur dengan  $\text{CaSO}_4$  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).

Pairet *et al.* (1995) menggunakan plat gel silika dengan eluen  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH (19:1, v/v) untuk memisahkan ekstrak kapang *Penicillium sclerotiorum*, terutama senyawa *azaphilone*. Selain itu Burkhardt *et al.* (1996) menggunakan KLT analitik gel silika dengan eluen  $\text{CHCl}_3$  : MeOH (9:1, v/v), untuk mengelusi ekstrak *Streptomyces griseoviridis*, khususnya mengekstrak senyawa *lactone* dan *cineromycin B*.

## 2.8 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau biasa juga disebut dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) merupakan teknik pemisahan yang dipergunakan secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu. Hampir setiap campuran kimia, mulai dari bobot molekul rendah sampai tinggi, dapat dipisahkan menjadi komponen-komponen dengan beberapa metode kromatografi (Cinquina *et al.*, 2003). KCKT sering dipergunakan dalam pemurnian senyawa dan analisis suatu sampel pada sejumlah bidang, antara lain : farmasi, lingkungan dan industri-industri makanan.

Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan teknik dimana solut atau zat-zat

terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan solut-solut melewati suatu kolom kromatografi. Pemisahan solut-solut diatur oleh distribusi dalam fase gerak dan fase diam. Penggunaan kromatografi cair kinerja tinggi membutuhkan pengabungan secara tepat dari berbagai macam kondisi operasional seperti jenis kolom, fase gerak, panjang dan diameter kolom, kecepatan alir fase gerak, suhu kolom dan konsentrasi sampel (Nielsen *et al.*, 2003).

## 2.9 Kanker

Kanker adalah penyakit pertumbuhan sel dengan terjadinya gangguan atau hilangnya mekanisme pengontrol pertumbuhan dan pembelahan. Adanya gangguan tersebut menghasilkan pertumbuhan baru dan menghasilkan masa jaringan yang abnormal yang disebut tumor (Sukardja, 2000).

Kanker adalah penyakit akibat pertumbuhan tidak normal dari sel-sel jaringan tubuh yang berubah menjadi sel kanker. Dalam perkembangannya, sel-sel kanker ini dapat menyebar ke bagian tubuh lainnya sehingga dapat menyebabkan kematian. Kanker sering dikenal oleh masyarakat sebagai tumor, padahal tidak semua tumor adalah kanker. Tumor adalah segala benjolan tidak normal atau abnormal.

Tumor dibagi dalam 2 golongan, yaitu tumor jinak dan tumor ganas. Kanker adalah istilah umum untuk semua jenis tumor ganas. Sebagian besar tumor jinak tidak menyebabkan masalah serius dan dapat dibuang dengan proses pembedahan. Tumor ganas dapat menyebar dan merusak fungsi suatu organ. Seorang individu dengan tumor ganas dikatakan mengidap kanker. Selama masa perkembangan sel

kanker mampu menghasilkan dan melepas sel pioner yang dapat berpindah, menginvasi jaringan didekatnya, kemudian pindah ketempat lain, membentuk koloni dan tumbuh ditempat itu. Penyebaran sel kanker diluar tempat asalnya disebut dengan metastasis (Hanahan & Weinberg, 2000; Campbell & Reece, 2005).

Kanker dapat menimpa semua orang, pada setiap bagian tubuh, dan pada semua golongan umur, namun lebih sering menimpa orang yang berusia 40 tahun. Umumnya sebelum kanker meluas atau merusak jaringan di sekitarnya, penderita tidak merasakan adanya keluhan ataupun gejala. Bila sudah ada keluhan atau gejala, biasanya penyakitnya sudah lanjut (Anonim. 2012)

### **2.9.1 Sel Kanker HeLa**

Kultur sel HeLa atau *HeLa cell line* merupakan *continuous cell line* yang diturunkan dari sel epitel kanker leher rahim (*cervix*) seorang wanita penderita kanker leher rahim bernama Henrietta Lacks yang meninggal akibat kanker pada tahun 1951. Kultur sel ini memiliki sifat semi melekat dan digunakan sebagai model sel kanker dan untuk mempelajari sinyal transduksi seluler. Sel HeLa ini cukup aman dan merupakan sel manusia umum digunakan untuk kepentingan kultur sel. HeLa bersifat imortal yang tidak dapat mati karena tua dan dapat membelah secara tidak terbatas selama memenuhi kondisi dasar bagi sel untuk tetap hidup masih ada. Strain-strain baru dari sel HeLa telah dikembangkan dalam berbagai macam kultur sel, tapi semua sel HeLa berasal dari keturunan yang sama (Rosita *et al.*, 2012).

## 2.9.2 Sel Kanker Payudara T47D

Sel T47D merupakan *continous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continous cell line* sering dipakai dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogenitas yang tinggi serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdall *et al.*, 2003).

Pengobatan kanker payudara dilakukan dengan serangkaian pengobatan, meliputi pembedahan, penyinaran, kemoterapi, terapi hormon, dan terapi imonologi. Salah satu contoh obat kemoterapi adalah *Cepecitabine*, obat anti kanker oral yang diaktifkan oleh enzim yang ada pada sel kanker sehingga hanya menyerang sel kanker saja. Selain itu obat anti kanker yang sudah diperdagangkan adalah *Doxorubicin*. Sel kanker payudara T47D merupakan sel yang sensitif terhadap doxorubicin (Frederik *et al.*, 1990).

## **BAB 3**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2011 sampai dengan bulan Juni 2012 di Laboratorium Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBRP2B-KP), Jl. K.S. Tubun Petamburan VI Jakarta 10260.

#### **3.2 Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kapang laut *Emericella nidullans* koleksi Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBRP2B-KP). Kapang laut *Emericella nidullans* diisolasi dari Ascidia laut yang berasal dari perairan Wakatobi pada tahun 2008 dan diberi kode MFW-39-08. Uji sitotoksik dalam penelitian ini menggunakan sel kanker payudara (T47D) dan sel kanker leher rahim (HeLa).

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah : pelarut n-heksana (Baker), etil asetat (Baker), diklorometan ( Baker), metanol ( Baker), asetonitril HPLC *grade* (Baker), silika gel (SiO<sub>2</sub>) 50 $\mu$ M (Phenomenex), pelat aluminium silika gel (SiO<sub>2</sub>) 60 F<sub>254</sub> (Merck), pelat kaca silika gel (SiO<sub>2</sub>) 60 F<sub>254</sub> preparatif 10 x 20 cm (Merck), deuteriokloroform (CDCL<sub>3</sub>) (Merck), *soluble starch* (Oxoid), *soytone* (Oxoid), *pepton* (Oxoid), *yeast extract* (Oxoid), *malt extract* (Oxoid), *glukosa* (Merck).

Medium pertumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: *Malt Extract Agar* (MEA) dengan komposisi 0,3% *extract malt*, 0,3 *extract yeast*, 0,5% *pepton* dan 1,5% agar, sedangkan medium yang digunakan untuk fermentasi adalah : *Malt Extract Broth* (MEB) dengan komposisi 0,3 % *malt extract*, 0,3 % *yeast extract* dan 0,5 % *pepton*. *Soluble Starch Soytone* (SWS) dengan komposisi 1% *soluble starch*, 0,2 % *soya peptone*, dan *Minimum Fungi Medium* (MFM) dengan komposisi 0,02% *yeast extract*, 0,1% *soluble starch*.

### 3.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Erlenmeyer, jarum tanam tajam, jarum tanam bulat, pembakar spiritus, cawan petri, pinset, *drawing pen*, spatula , pipet tetes, *flask culture* 3L (Duran), *cryotube* (Nalgen), parafilm, *Laminar Flow* (Esco), mikroskop (Olympus), *deep freezer* -80°C (Shel Lab), mikropipet (Ependorf), kertas saring no 41 (Whatman), autoklaf (Hirayama), sentrifuse (Hettich), timbangan analitik, pH meter ilmiah (Thermo), *hand refraktometer*, evaporator vakum (Buchi), evaporator nitrogen, sonikator (Branson), kolom kaca 2,5 x 40 cm, NMR 500 MHz (JEOL), *microplate* 96 well (Iwaki), *flask culture* (Nunc).

### 3.4 Isolasi Senyawa Target

#### 3.4.1 Penyegaran dan penumbuhan kapang *Emericella nidulans*

Biakan beku dari spora *Emericella nidulans* diambil dari *freezer* bersuhu -73°C lalu didiamkan beberapa saat dalam suhu kamar 27 – 29°C hingga media dan gliserol yang ada dalam tabung mencair. Spora yang terdapat dalam biakan

dipindahkan secara aseptis ke dalam cawan petri yang berisi media MEA dengan menggunakan jarum tanam tajam. Cawan petri dibungkus dengan kertas parafilm kemudian diinkubasikan pada suhu 27 – 29°C selama 3 – 7 hari hingga biakan spora tumbuh dengan baik.

#### **3.4.2 Starter kapang *Emericella nidulans***

Kapang *Emericella nidulans* dari koloni yang ditumbuhkan dalam cawan petri diambil dengan jarum tanam dengan cara miselium kapang yang tumbuh di atas media di dalam cawan petri dipotong hingga ke media tumbuh dengan ukuran sekitar 1 x 1 cm dan secara aseptis dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang mengandung media cair *Malt Extract Broth* (MEB) 10 ml. Komposisi media MEB sama dengan media MEA tetapi media MEB tidak mengandung agar. Biakan diinkubasikan selama 48 jam, lalu secara aseptis dipindah ke dalam labu Erlenmeyer bervolume 500 ml yang berisi media MEB 300 ml. Biakan diinkubasi selama 48 jam secara statis pada suhu 27-29°C. Biakan di dalam labu Erlenmeyer ini selanjutnya digunakan sebagai starter pada proses fermentasi kapang *Emericella nidullans*.

#### **3.4.3 Fermentasi kapang *Emericella nidulans***

Fermentasi kapang dalam 1 L medium cair SWS dilakukan dalam labu bervolume 3 L. Sebanyak 10 ml starter berumur 48 jam selanjutnya dipindah dengan menggunakan mikropipet secara aseptis ke dalam 10 labu bervolume 3 L, berisi media SWS 1 L dan air laut alami. Fermentasi dilakukan selama 5 minggu pada suhu sekitar 27 - 29°C dengan kondisi statis.

#### 3.4.4 Ekstraksi metabolit

Ekstraksi metabolit yang terdapat dalam miselium dilakukan mengikuti metode Nursid *et al.* (2010). Miselium kapang disaring dengan menggunakan kain kasa bersih untuk memisahkan miselium dari *broth*. Miselium selanjutnya dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambah campuran DCM : MeOH = 1 : 1 sebanyak 300 ml. Erlenmeyer disonikasi selama 2 jam, lalu filtrat yang didapat disaring dengan kertas saring Whatman nomor 41. Proses ekstraksi diulang sebanyak tiga kali. Pelarut yang terdapat dalam ekstrak miselium selanjutnya dievaporasi dengan Buchi rotavapor hingga diperoleh ekstrak miselium.

#### 3.4.5 Fraksinasi senyawa aktif

Fraksinasi dan isolasi senyawa sitotoksik dilakukan sesuai dengan metode Nursid *et al.* (2011) yang merupakan modifikasi dari Kjer *et al.* (2010). Fraksinasi terhadap ekstrak kasar miselium dilakukan dengan kolom vakum SiO<sub>2</sub> 2 x 12 cm. Ekstrak kasar miselium dilarutkan dalam sesedikit mungkin dengan campuran n-heksana : etil asetat = 1 : 1 lalu dimasukkan dalam gelas Beaker yang mengandung sekitar 1 g serbuk SiO<sub>2</sub> lalu diuapkan dengan bantuan gas nitrogen. Campuran ekstrak dan SiO<sub>2</sub> dimasukkan ke dalam kolom, dielusi dengan n-heksana : etil asetat = 8 : 1, n-heksana : etil asetat = 1 : 1, etil asetat 100 %, dan metanol 100% dengan volume masing-masing 150 ml. Hasil fraksinasi dilihat pola pemisahannya dengan kromatografi lapis tipis (KLT) yang dikembangkan dengan n-heksana : etil asetat =



1 : 1. Hasil KLT divisualisasi dengan UV 254 nm dan hasilnya dilihat dibandingkan dengan hasil KLT Nursid *et al.* (2011).

Fraksi F3 kembali di fraksinasi dengan kolom vakum SiO<sub>2</sub> 2x12 cm. Eluen yang digunakan untuk mengelusi adalah campuran n-heksana : etil asetat = 8 : 1 (80 ml), n-heksana : etil asetat = 5 : 1 (80 ml), n-heksana : etil asetat = 1 : 1 (240 ml), etil asetat 100% (160 ml), etil asetat : metanol = 8 : 1 (100 ml). Hasil fraksi dilihat pola pemisahannya dengan KLT yang dikembangkan dengan n-heksana : etil asetat = 1 : 1. Hasil KLT dipantau di bawah sinar UV 254 nm, kemudian hasilnya di foto. Selanjutnya hasil KLT dibandingkan dengan hasil KLT Nursid *et al.* (2011).

Hasil KLT dan profil kromatogram KCKT yang serupa dengan hasil Nursid *et al.* (2011) dilanjutkan dengan KLT preparatif. KLT preparatif dilakukan dengan plat kaca (10 x 20 cm) mengandung matriks SiO<sub>2</sub>. Fraksinasi dilakukan menggunakan sistem eluen n-heksana : etil asetat = 1 : 1. Bercak-bercak yang menjadi target isolasi lalu diamati di bawah lampu UV 254 nm, kemudian ditandai dengan pensil, selanjutnya dikerok dan dimasukkan ke dalam gelas Beaker yang sudah berisi pelarut etil asetat 20 ml. Campuran etil asetat dan SiO<sub>2</sub> yang terdapat dalam gelas Beaker kemudian sonikasi untuk melarutkan senyawa aktif yang terdapat di dalam SiO<sub>2</sub>. Filtrat kemudian disaring dengan kertas Whatman nomor 41. Cara ini dilakukan berulang-ulang hingga semua senyawa yang terikat pada SiO<sub>2</sub> larut ke dalam etil asetat. Filtrat dievaporasi dengan Buchi evaporator. Etil asetat yang masih tersisa kemudian dikeringkan dengan bantuan gas nitrogen. Hasil isolasi kemudian dipantau kemurniannya dengan KLT dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

### 3.4.6 Karakterisasi senyawa aktif

#### Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan menggunakan fase diam SiO<sub>2</sub> 60 F<sub>254</sub> yang dikembangkan dengan n-heksan : etil asetat = 1 : 1. Hasil KLT lalu diamati dibawah lampu UV 254 nm dan dihitung nilai *Retention factor* (*R<sub>f</sub>*) dengan rumus sebagai mana berikut :

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

#### Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

KCKT dalam penelitian ini menggunakan instrumen LC Shimadzu, kolom Waters Xselect CSH<sup>Tm</sup> C18 5 μm. 2,1 x 100 mm column, sistem elusi asetonitril dalam H<sub>2</sub>O 10 % – asetonitril 90% secara gradien.

#### *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)

Pengukuran spektra <sup>1</sup>H-NMR dilakukan dengan instrumen JEOL JNM ECA 500 MHz. Nilai geseran kimia (δ) dilakukan dalam satuan *parts per million* (ppm) dengan menggunakan tertametilsilana (TMS) sebagai standar. Pelarut yang digunakan adalah klorofom terdeuterasi (CDCl<sub>3</sub>). Pengukuran NMR dilakukan di Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (Puslit Kimia LIPI) Serpong, Banten.

### 3.5 Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide} (MTT) dengan menggunakan sel kanker payudara (T47D) dan sel kanker leher rahim (HeLa). Sel tersebut dikultur dalam medium RPMI 1640, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, fungison 0,5% dan penisilin-streptomisin 2%.

Suspensi sel yang berjumlah 20.000 sel per 100  $\mu$ l dimasukkan ke dalam *microplate* 96 well dan diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C dengan aliran CO<sub>2</sub> 5 ml/menit selama 12 jam. Setelah sel melekat dengan baik pada dasar mikroplat, media sel dibuang kemudian ditambahkan 100  $\mu$ L media baru yang sudah mengandung senyawa hasil isolasi dengan seri dosis : 3,125 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 dan 50  $\mu$ g/ml. Mikroplat diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> pada suhu 37°C dengan aliran CO<sub>2</sub> 5 ml/menit selama 24 jam. Setelah 24 jam, morfologi sel diamati dengan mikroskop lalu didokumentasikan.

Media sel dibuang dari dalam mikroplat lalu ditambahkan MTT 100  $\mu$ l (konsentrasi MTT sebesar 0,5 mg/ml) ke dalam setiap mikroplat. Mikroplat diinkubasi kembali dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 4 jam. Setelah 4 jam, ditambahkan 100  $\mu$ L Sodium Dodesil Sulfat (SDS) 10% untuk melarutkan kristal formazan yang terbentuk. Mikroplat diinkubasi kembali selama 12 jam pada suhu kamar. Pengukuran aktivitas sitotoksik senyawa yang diuji dilakukan dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm. Persentase kematian sel tumor dihitung

berdasarkan rumus :

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

Dimana :

A = absorbansi kontrol sel,

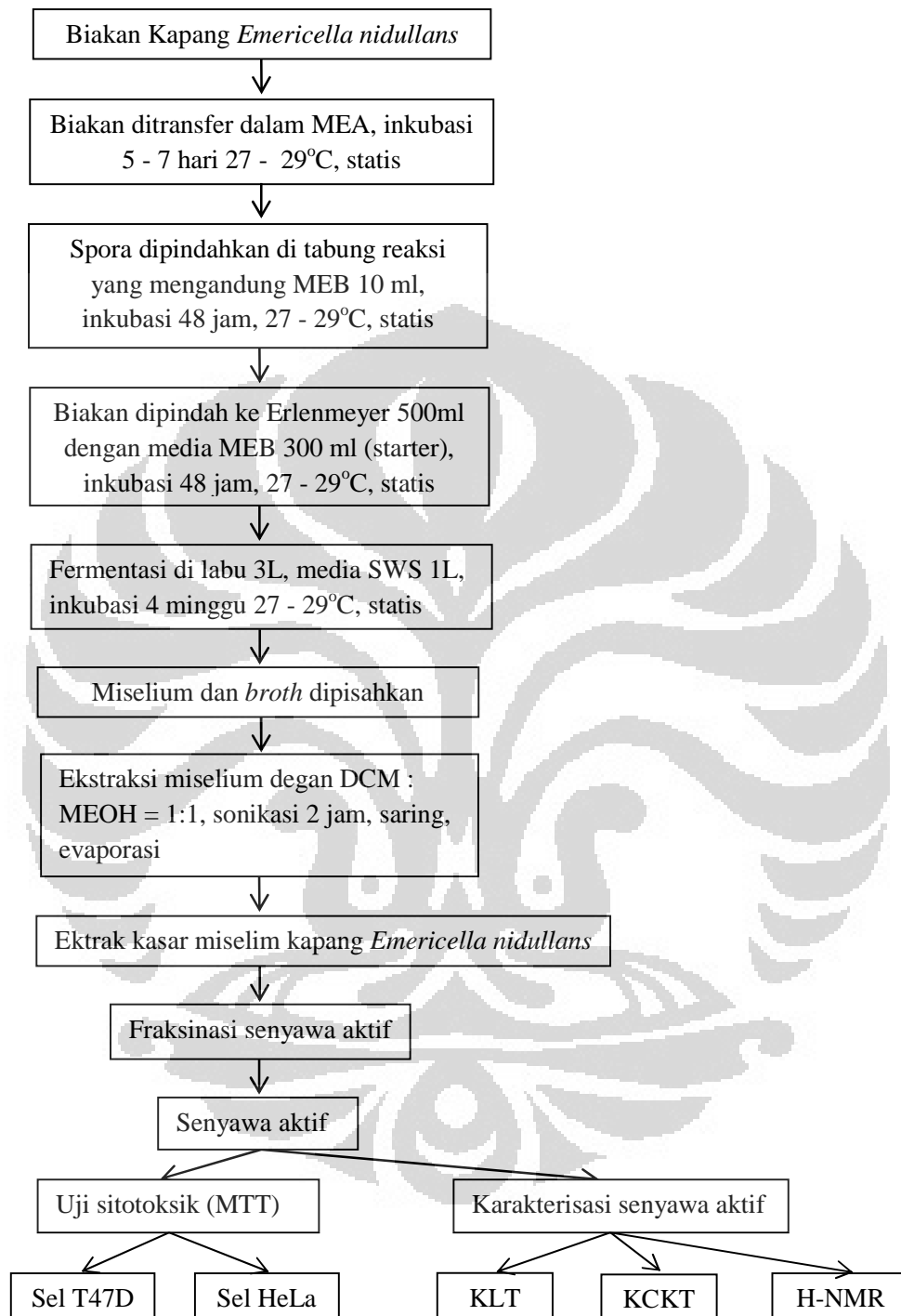
B = absorbansi sampel,

C = absorbansi kontrol sampel dan

D = absorbansi kontrol media.

Penentuan nilai *Inhibitor Concentration 50* (IC<sub>50</sub>) dilakukan dengan menggunakan analisis probit dengan bantuan program statistik MINITAB 16.0.

Alur isolasi senyawa aktif dari kapang laut *Emericella nidulans* dan uji sitotoksik, secara ringkas disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Diagram alur isolasi senyawa aktif dari kapang *Emericella nidulans*

### **3.6 Produksi Senyawa Target**

#### **3.6.1 Penyegaran MFW 39-08 *Emericella nidulans***

Biakan beku dari spora *Emericella nidulans* diambil dari freezer bersuhu - 73°C lalu didiamkan beberapa saat dalam suhu kamar hingga media dan gliserol yang ada dalam tabung mencair. Spora yang terdapat dalam biakan dipindahkan secara aseptis ke dalam cawan petri yang berisi media MEA yang mengandung 0,3% *extract malt*, 0,3% *extract yeast*, 0,5% *pepton*, dan 1,5% agar dengan menggunakan jarum tanam. Cawan petri dibungkus dengan kertas parafilm kemudian diinkubasikan selama 3 – 7 hari pada suhu 27 – 29 °C hingga biakan spora tumbuh dengan baik.

#### **3.6.2 Starter *Emericella nidulans***

Kapang *Emericella nidulans* yang tumbuh di dalam cawan petri selanjutnya diambil menggunakan jarum tanam dengan cara memotong bagian miselium kapang hingga ke media dengan ukuran 1x1 cm, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang mengandung media cair *Malt Extract Broth* (MEB) 5 ml. Komposisi media MEB mengandung 0,3% *extract malt*, 0,3% *extract yeast*, 0,5% *pepton*. Biakan diinkubasikan selama 2 hari, lalu dipindah ke dalam labu Erlenmeyer 200 ml masing-masing berisi media MEB, SWS dan MFM dengan volume 50 ml (biakan dalam Erlenmeyer ini digunakan sebagai starter).

#### **3.6.3 Produksi senyawa target dari kapang *Emericella nidulans***

Produksi senyawa target kapang laut *Emericella nidulans* dilakukan dengan menggunakan labu Erlenmeyer 300 ml yang berisi media sebanyak 100 ml. Media

fermentasi menggunakan SWS (*Soluble Starch-Soytone*) dengan komposisi 1% *soluble starch*, 0,2 % *soya peptone*. MEB (*Malt Extrach Broth*) dengan komposisi 0,3 % *malt extract*, 0,3 % *yeast extract* dan 0,5 % *pepton*, serta media MFM (*Minimum Fungi Medium*) dengan komposisi 0,02% *extract yeast*, 0,1% *soluble starch*. Ketiga medium fermentasi dilarutkan dalam ASW (*Artificial Sea Water*) dengan komposisi NaCl 70 g; KCl 3,0 g; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,1 g, MgCl<sub>2</sub> 20,4g dan CaCl<sub>2</sub> 0,6g. Medium fermentasi yang sudah dilarutkan dalam ASW dilanjutkan dengan proses sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit dan dinkubasi selama 24 jam.

Medium fermentasi yang sudah disiapkan, selanjutnya secara aseptis ditambahkan stater sebanyak 5 ml ke masing-masing media fermentasi. Fermentasi dilakukan selama 1, 2, 3, 4 dan 5 minggu. Penelitian dilakukan dengan 3 ulangan (triplo) disetiap jenis media, sehingga setiap minggu di panen (*harvest*) sebanyak 9 biakan kapang di dalam Erlenmeyer dengan rincian sebagai berikut : 3 Erlenmeyer kapang dari media SWS, 3 Erlenmeyer kapang dari media MEB dan 3 Erlenmeyer kapang dari media MFM.

Hasil *harvest* dilakukan pemisahan antara media fermentasi kapang (*broth*) dan miselium kapang. *Broth* yang sudah dipisahkan dari miselium diukur pH dan salinitas, sedangkan miselium dikeringkan dan diekstrak hingga mendapatkan rendemen ekstrak serta mencari kadar senyawa target dari ekstrak kasar miselium dengan menggunakan metode KCKT.

### **Berat Kering**

Berat kering miselium diketahui dengan cara pengeringan miselium yang sudah dipisahkan dari *broth* dengan *Freeze dryer* bersuhu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pengeringan miselium dilakukan di laboratorium bioteknologi Universitas Atmajaya, Jakarta.

### **Rendemen Ekstrak**

Ekstraksi terhadap miselium kapang dilakukan mengikuti metode Nursid *et al.* (2011). Miselium diekstraksi dengan campuran diklorometan (DCM) : metanol (MeOH) = 1 : 1. Miselium kapang disaring dengan kertas saring untuk memisahkan antara *broth* dengan miselium. Miselium selanjutnya dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambah campuran DCM : MeOH = 1 : 1. Erlenmeyer disonikasi selama 2 jam, campuran lalu disaring dengan kertas saring Whatman nomor 41. Proses ekstraksi diulang sebanyak 3 kali. Pelarut yang terdapat dalam ekstrak miselium selanjutnya dievaporasi dengan Buchi rotavapor hingga diperoleh ekstrak pekat miselium. Sisa pelarut yang masih terdapat pada ekstrak diuapkan dengan bantuan gas nitrogen.

### **Pengukuran pH**

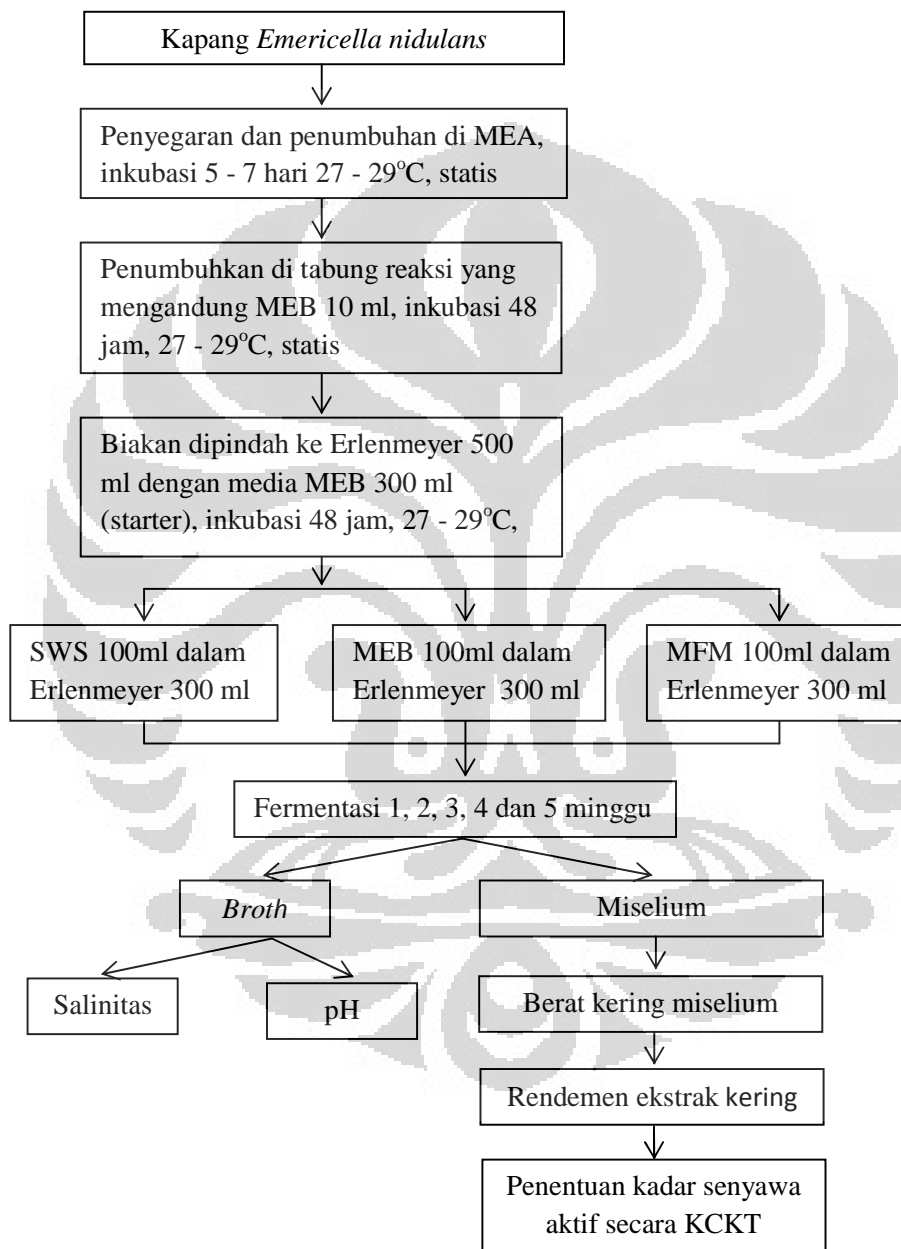
Pengukuran pH dengan menggunakan pH meter thermo scientific, pengukuran dilakukan pada *broth* yang sudah dipisahkan miselium.

### **Pengukuran Salinitas**

Pengukuran salinitas dengan menggunakan *hand refraktometer*, pengukuran dilakukan pada *broth* yang sudah dipisahkan dari miselium.



Secara ringkas alur proses produksi senyawa aktif dari kapang laut *Emericella nidulans* dari proses penyegaran dan penumbuhan kapang hingga analisis, disajikan dalam Gambar 3.



Gambar 3. Diagram alur produksi senyawa target kapang laut *Emericella nidulans*

## BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Isolasi Senyawa Aktif dari Kapang Laut *Emericella nidulans*

Penumbuhan kembali kapang laut *Emericella nidulans* dari freezer-73°C menghasilkan kapang dengan pertumbuhan yang baik dalam media MEA. Koloni kapang laut *Emericella nidulans* pada umur 5 hari memiliki diameter 7 cm. Secara visual warna koloni *Emericella nidulans* berwarna putih kekuning dengan zona pertumbuhan berwarna putih. Sebalik koloni berwarna kuning – oranye dengan tepi koloni berwarna abu-abu. (Gambar 4).



Gambar 4. Permukaan koloni kapang laut *Emericella nidulans* dalam media MEA (A). Sebalik koloni kapang dalam medium MEA (B)

Penumbuhan kapang laut menggunakan medium MEA juga dilakukan oleh Pratitis *et al.* (2010) pada kapang *Aspergillus ustus*. Koloni kapang berwarna putih kekuningan, dengan bagian tengah berwarna kuning sampai kecoklatan. Tekstur koloni kapang *Aspergillus ustus* berwarna seperti kapas.

Fermentasi kapang laut *Emericella nidulans* di dalam labu 3 L dengan medium fermentasi *Soluble Starch Soytone* (SWS) 1L sebanyak 10 labu selama 5 minggu menghasilkan miselium basah seberat 450 gr. Gambar fermentasi kapang laut *Emericella nidulans* usia 5 minggu dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Fermentasi kapang *Emericella nidulans* usia 5 minggu dengan medium MEB 1L didalam labu 3L.

Fermentasi kapang laut *Emericella nidulans* dilakukan secara statis dan *Batch fermentation*. Penggunaan *Batch fermentation* dalam produksi senyawa bioaktif dari kapang *Emericella nidullans* dikarenakan fermentasi mudah dan tidak perlu mengganti medium lalu mensterilisasi kembali. Hasil yang didapat berupa metabolit atau produk yang seragam atau konsisten (Glazer & Nikaido, 1998). Fermentasi kapang laut secara *batch* dan statis juga dilakukan oleh Pratitis *et al.* (2010) yang melakukan fermentasi biomassa kapang *Aspergillus ustus* yang diisolasi dari spons laut dalam.

Ekstraksi metabolit dari miselium kapang laut *Emericella nidullans* menggunakan campuran diklorometan (DCM) : metanol (MeOH) = 1 : 1.

Diklorometan merupakan pelarut yang bersifat non polar sedangkan metanol bersifat polar sehingga campuran keduanya diharapkan dapat menarik atau melarutkan semua metabolit sekunder yang terdapat pada miselium. Proses ekstraksi metabolit dari miselium kapang *Emericella nidulans* dilakukan dengan sonikasi selama 2 jam untuk memecah dinding sel dari miselium sehingga proses ekstraksi berjalan sempurna (Nursid *et al.*, 2011).

Hasil evaporasi diperoleh ekstrak kering miselium kapang laut *Emericella nidulans* seberat 20,2473 gr. Ekstrak kering adalah ekstrak yang tidak mengandung pelarut lagi, diperoleh dari penimbangan berat konstan. Berat kering ekstrak miselium kapang *Emericella nidullans* diperkirakan masih ada garam – garam mineral yang berasal dari miselium, dikarenakan pelarut MeOH yang bersifat polar dan DCM yang bersifat nonpolar, sehingga seluruh senyawa polar maupun nonpolar dapat ditarik secara maksimal. Ekstraksi miselium kapang dengan menggunakan pelarut DCM dan MeOH juga dilakukan Hikmah *et al.* (2011), untuk mengekstraksi miselium kapang laut *Trichoderma* yang diisolasi dari spons.

Berdasarkan berat basah miselium dihasilkan rendemen ekstrak sebanyak 4.50 %. Warna yang dihasilkan oleh ekstrak kasar miselium kapang laut *Emericella nidulans* berwarna coklat gelap dan berbentuk padatan berminyak.

Hasil Fraksinasi ekstrak miselium dengan kolom vakum SiO<sub>2</sub> dengan ukuran kolom 2,5 x 40 cm diperoleh 4 fraksi yaitu fraksi F1, F2, F3, dan F4. Keempat fraksi tersebut secara visual memiliki warna yang berbeda (Gambar 6).

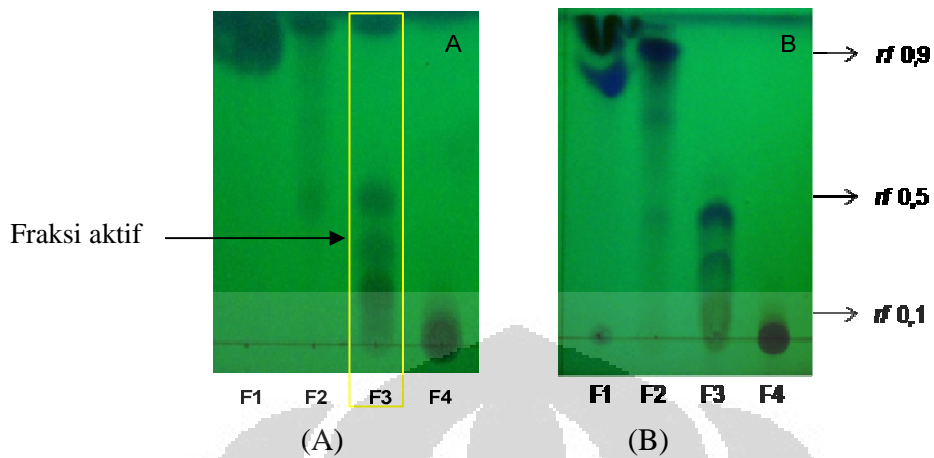


Keterangan (F1) n-heksana:etil asetat 8:1; (F2) n-heksana:etil asetat 1:1; (F3) Etil asetat 100%; (F4) Metanol 100% .

Gambar 6. Hasil fraksinasi ekstrak miselium *Emericella nidulans*

Setelah di keringkan dengan Buchi evaporator keempat fraksi tersebut dilihat profil kromatogram KLT dibawah serapan UV 254. Profil kromatogram KLT yang dihasilkan dari keempat fraksi tersebut, serupa dengan profil kromatogram KLT yang dihasilkan oleh Nursid *et al.* (2011) saat mengisolasi senyawa emestrin dari kapang laut *Emericella nidulans*. Profil kromatogram KLT yang dibandingkan dengan kromatogram KLT Nursid *et al.* (2011) dalam mengisolasi senyawa emestrin disajikan pada Gambar 7. Berat kering fraksi F1, F2, F3, dan F4 dari ekstrak kasar miselium dapat dilihat pada Tabel 1.

Pemisahan metabolit yang terdapat dalam ekstrak miselium berjalan dengan baik. Bercak-bercak yang terdapat dalam masing-masing fraksi memiliki nilai  $R_f$  yang berbeda. Fraksi F1 dan F2 didominasi oleh senyawa-senyawa nonpolar dengan nilai  $R_f$  sekitar 0,80 – 0,90. Fraksi F3 didominasi oleh senyawa-senyawa non polar sedikit dan sedikit senyawa-senyawa semi polar dengan nilai  $R_f$  sekitar 0,10 – 0,55 dan terakhir fraksi F4 hanya memiliki satu bercak dengan nilai  $R_f$  sekitar 0,0 – 0,10.



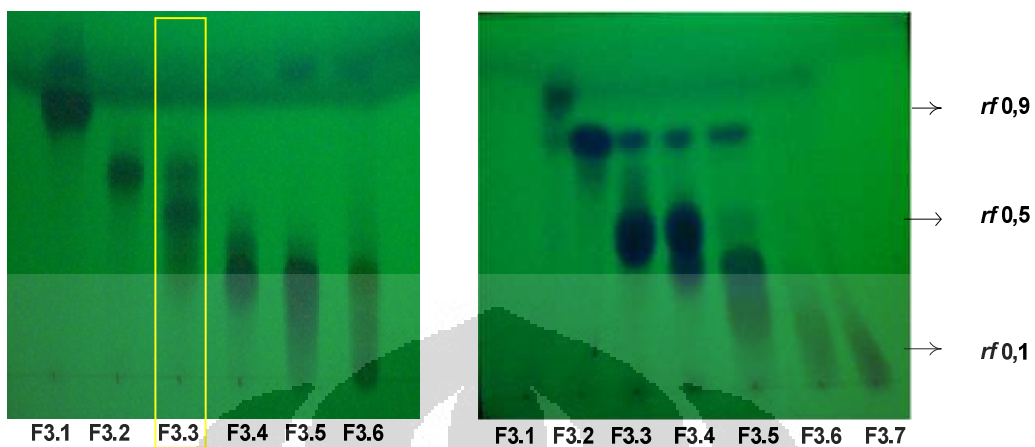
Keterangan : fraksi aktif (F3.3) dengan nilai  $rf$  0,10 – 0,55

Gambar 7. Profil KLT fraksi F1, F2, F3 dan F4 (A) Profil KLT fraksi F1, F2, F3 dan F4 (Nursid *et al.* 2011) (B)

Tabel 1. Berat kering hasil fraksinasi ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans*

Fraksi (F)	Berat kering (mg)	Yield (%)
1	1206	6.0
2	364.8	1.8
3	122.1	0.6
4	1030	5.1

Fraksi F3 selanjutnya difraksinasi lagi dengan menggunakan vakum  $\text{SiO}_2$  dengan ukuran kolom 2,5 x 40 cm. Hasil fraksinasi F3 dilihat profil kromatogram KLT di bawah UV 254 nm dan menghasilkan 6 fraksi (Gambar 8A). Fraksinasi F3 yang dihasilkan oleh Nursid *et al.* (2011) disajikan pada Gambar 8B.



Keterangan : Fraksi target (F3.3) dengan nilai  $rf$  0,50

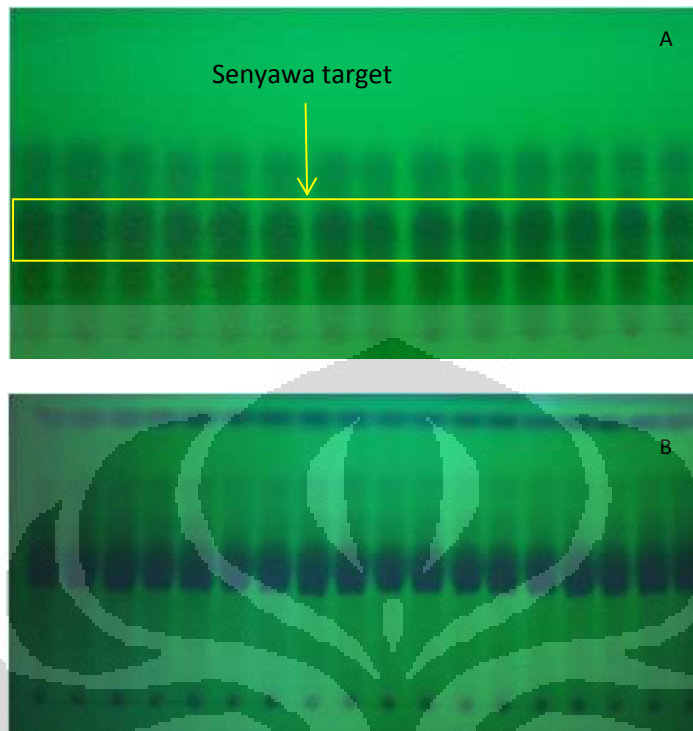
Gambar 8. Kromatogram KLT hasil fraksinasi F3 (A) dan kromatogram KLT hasil fraksinasi F3 (Nursid *et al.*, 2011) (B)

Hasil fraksi yang sudah diuapkan pelarutnya dengan Buchi evaporator memiliki berat masing-masing sebagaimana disajikan pada Tabel 2.

Table 2. Berat kering hasil fraksinasi F3 ekstrak kasar miselium kapang laut *Emericella nidulans*

Fraksi F3	Berat Kering (mg)	Rendemen (%)
F3.1	23,2	19
F3.2	9,1	7.5
F3.3	7,9	6.5
F3.4	3,5	2.9
F3.5	6,7	5.5
F3.6	18,4	15.1

Purifikasi terhadap fraksi F3.3 dilakukan dengan metode KLT preparatif  $\text{SiO}_2$  berdimensi 10 x 20 cm dan dikembangkan dengan larutan n-heksana : etil asetat 1 : 1 yang diamati dibawah UV 254 nm sebagaimana disajikan pada Gambar 9.



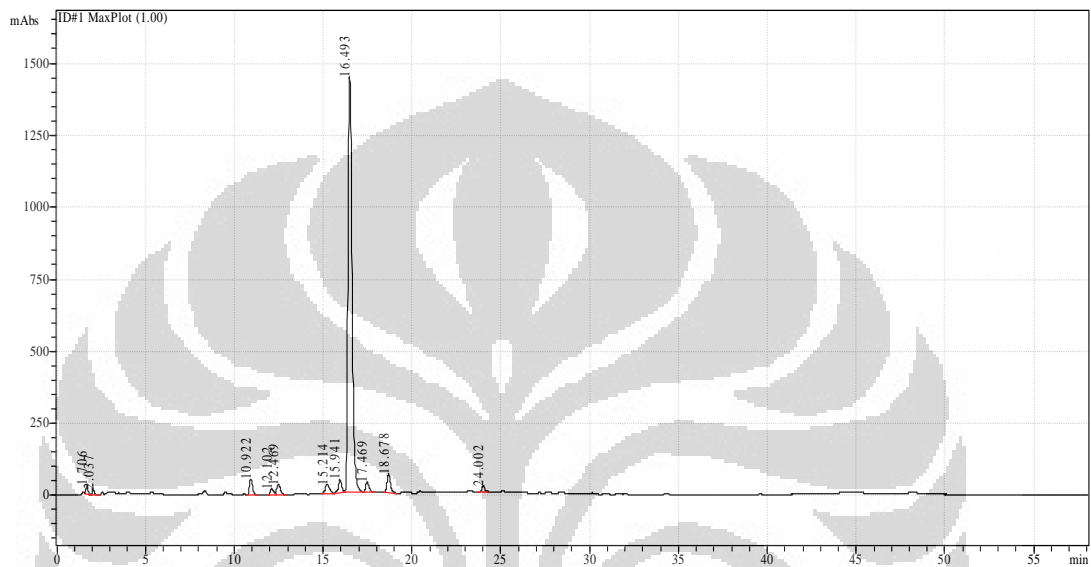
Keterangan : (A) KLT preparatif senyawa target  
 (B) KLT preparatif (Nursid *et al.* 2011) dalam isolasi senyawa emestrin dari kapang laut *Emericella nidulans*

Gambar 9. Kromatogram KLT preparatif senyawa target dari fraksinasi F3.3

Profil kromatogram KLT preparatif senyawa target dari fraksi F3.3 terdapat 3 bercak yang saling berdekatan. Bercak yang paling dominan dibagian tengah merupakan senyawa target. Profil kromatogram KLT preparatif tersebut berbeda dengan yang dihasilkan oleh Nursid *et al.* (2011), saat mengisolasi senyawa aktif emestrin dari hasil Fraksi F3.3. Kromatogram KLT preparatif tersebut terlihat lebih dominan dan tidak terdapat bercak senyawa lain yang berdekatan dengan senyawa emestrin.

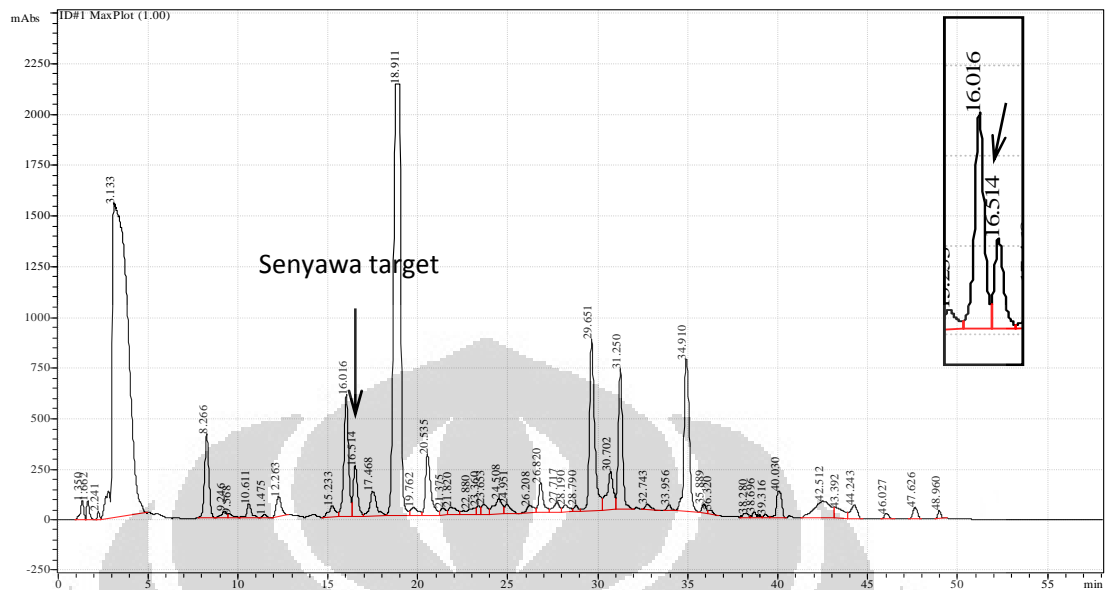


Hasil KLT preparatif terhadap senyawa target (Gambar 9) selanjutnya dimonitor dengan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Hasil profil kromatogram KCKT senyawa target dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Kromatogram KCKT senyawa target

Hasil Kromatogram KCKT senyawa target memperlihatkan puncak utama terelusi pada menit 16.493. Untuk mengetahui keberadaan senyawa target pada ekstrak miselium, maka ekstrak kasar juga dilihat profil kromatogramnya di KCKT. Profil kromatogram ekstrak miselium di KCKT dapat dilihat bahwa senyawa target berada pada waktu retensi 16.514 yang berdekatan dengan waktu retensi senyawa yang diduga emestrin (16.016). Profil kromatogram KCKT ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidullans* disajikan pada Gambar 11.



Gambar 11. Profil kromatogram KCKT ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans*

Publikasi Nielsen *et al.* (2003) dalam pencarian metabolit sekunder dari kapang diketahui bahwa senyawa emestrin dan emestrin B masing-masing dapat terelusi di waktu retensi 16,05 dan 15,50 dengan sitem elusi gradien dimulai 90 – 95% H<sub>2</sub>O hingga 100 % acetonitril dan menggunakan suhu rendah.

### Karakterisasi Senyawa Target

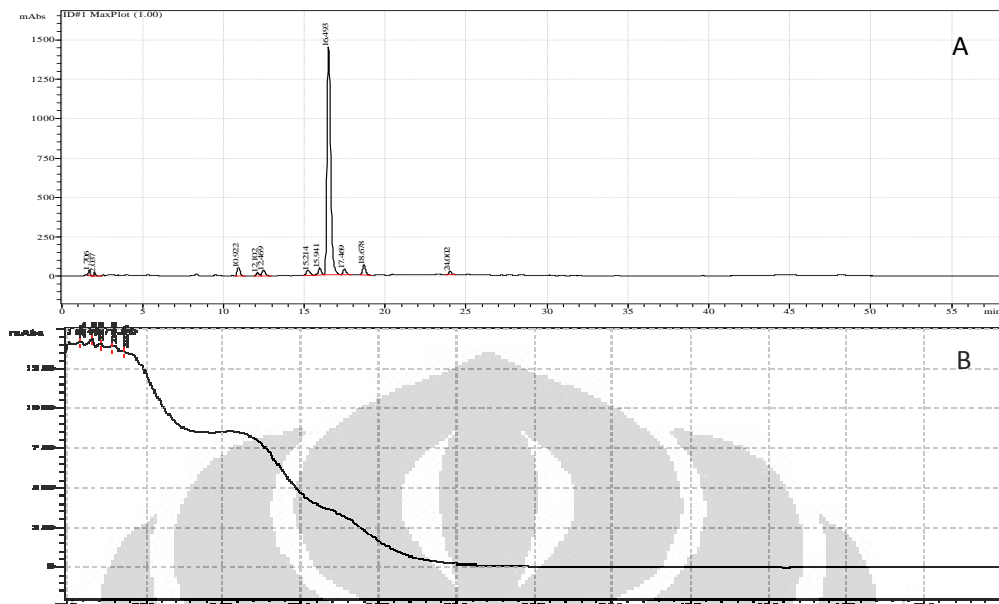
Kromatogram KLT yang dihasilkan oleh senyawa target diperoleh nilai *R<sub>f</sub>* 0,35. Senyawa target diperoleh dari ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans*. Publikasi senyawa emestrin oleh Nursid *et al.* (2011), diketahui nilai *R<sub>f</sub>* yang dihasilkan senyawa emestrin adalah 0,45. Gambar kromatogram KLT senyawa target yang dibandingkan dengan kromatogram KLT senyawa emestrin dapat dilihat pada Gambar 12.



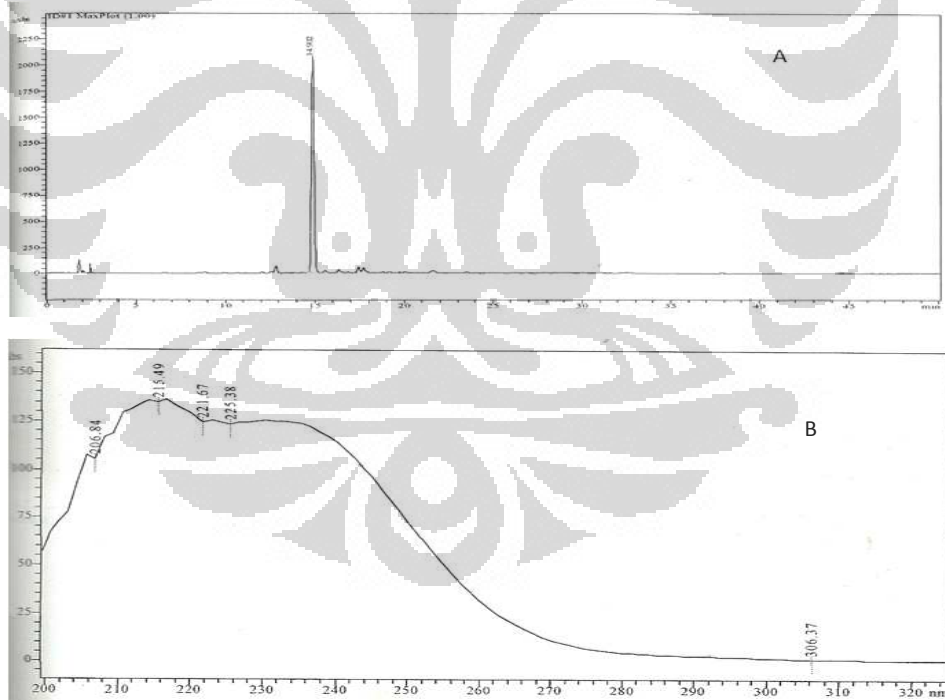
Keterangan : (A) KLT senyawa target dengan nilai  $rf$  0,35  
(B) KLT senyawa emestrin dengan nilai  $rf$  0,45

Gambar 12. Kromatografi lapis tipis (KLT) senyawa target (A) dan KLT senyawa emestrin (Nursid *et al.*, 2011) (B)

Senyawa target terelusi di waktu retensi 16,493 pada sistem KCKT. Serapan UV maksimum yang dihasilkan oleh senyawa target, yaitu pada serapan maksimum ( $\lambda_{max}$ ) pada 208 dan 250 - 254 nm. Profil kromatogram KCKT senyawa emestrin terelusi pada menit ke 14.902. Serapan UV dari senyawa emestrin tersebut memiliki serapan maksimum ( $\lambda_{max}$ ) di 215 nm (Nursid *et al.*, 2011). Gambar KCKT berikut dengan serapan UV senyawa target dibandingkan dengan KCKT dan serapan UV senyawa emestrin dapat dilihat pada Gambar 13A dan 13B.



Gambar 13A. Profil kromatogram KCKT (A) dan serapan UV senyawa target (B)



Gambar 13B. Kromatogram KCKT dan serapan UV emestrin (Nursid *et al.*, 2011)

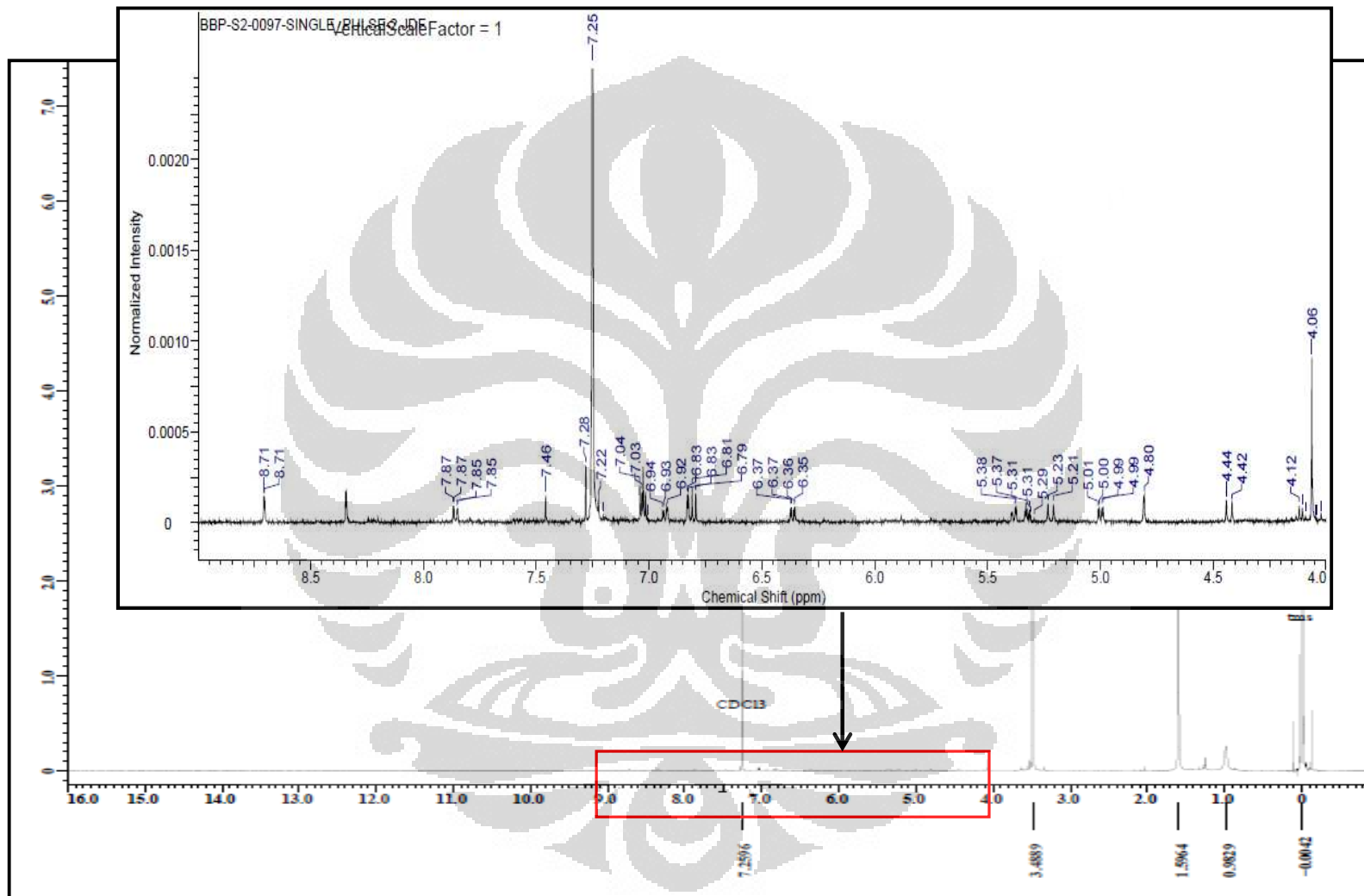
Kromatografi cair kinerja tinggi yang digunakan untuk pemantauan senyawa target menggunakan instrumen LC shimadzu, kolom Waters Xselect CSH<sup>Tm</sup> C18 5 µm. 2,1 x 100 mm, sistem elusi menggunakan asetonitril dalam H<sub>2</sub>O 10 % – asetonitril 90% secara gradien. Penelitian Nursid (2012) pemantauan senyawa emestrin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan instrumen LCMS shimadzu, kolom OD 2.0 x 150 mm, sistem elusi yang digunakan adalah asetonitril 10 % 10 menit, gradient 100 % asetonitril 30 menit dan 100% asetonitril 10 menit secara gradien. Publikasi Nielsen *et al.* (2003) dalam pencarian metabolit sekunder dari kapang diketahui senyawa emestrin dan emestrin B masing-masing dapat terelusi di waktu retensi 16,05 dan 15.50. Serapan maksimum ( $\lambda_{max}$ ) dari senyawa tersebut adalah 230, 260 dan 282 sh pada senyawa emestrin sedangkan serapan UV senyawa Emestrin B 218, 255 dan 284 sh.

Karakterisasi senyawa target di spektra <sup>1</sup>H-NMR dilakukan dengan instrumen JEOL JNM ECA 500 Mhz, dari profil proton senyawa target secara keseluruhan memiliki kemiripan dengan senyawa emestrin. Profil proton senyawa target (Gambar 13A) terdapat geseran kimia 8.35 dan 8.71. Geseran kimia tersebut tidak dimiliki oleh senyawa emestrin. Berdasarkan profil proton senyawa target diperkirakan senyawa target memiliki struktur dasar yang sama dengan emestrin dengan perbedaan pada geseran kimia pada 8.35 dan 8.71 yang diduga adanya senyawa amida (Pretsch *et al.*, 2000). Ringkasan spektrum <sup>1</sup>H-NMR senyawa target dibandingkan dengan emestrin (Nursid, 2012) diringkas pada Tabel 3. Gambar

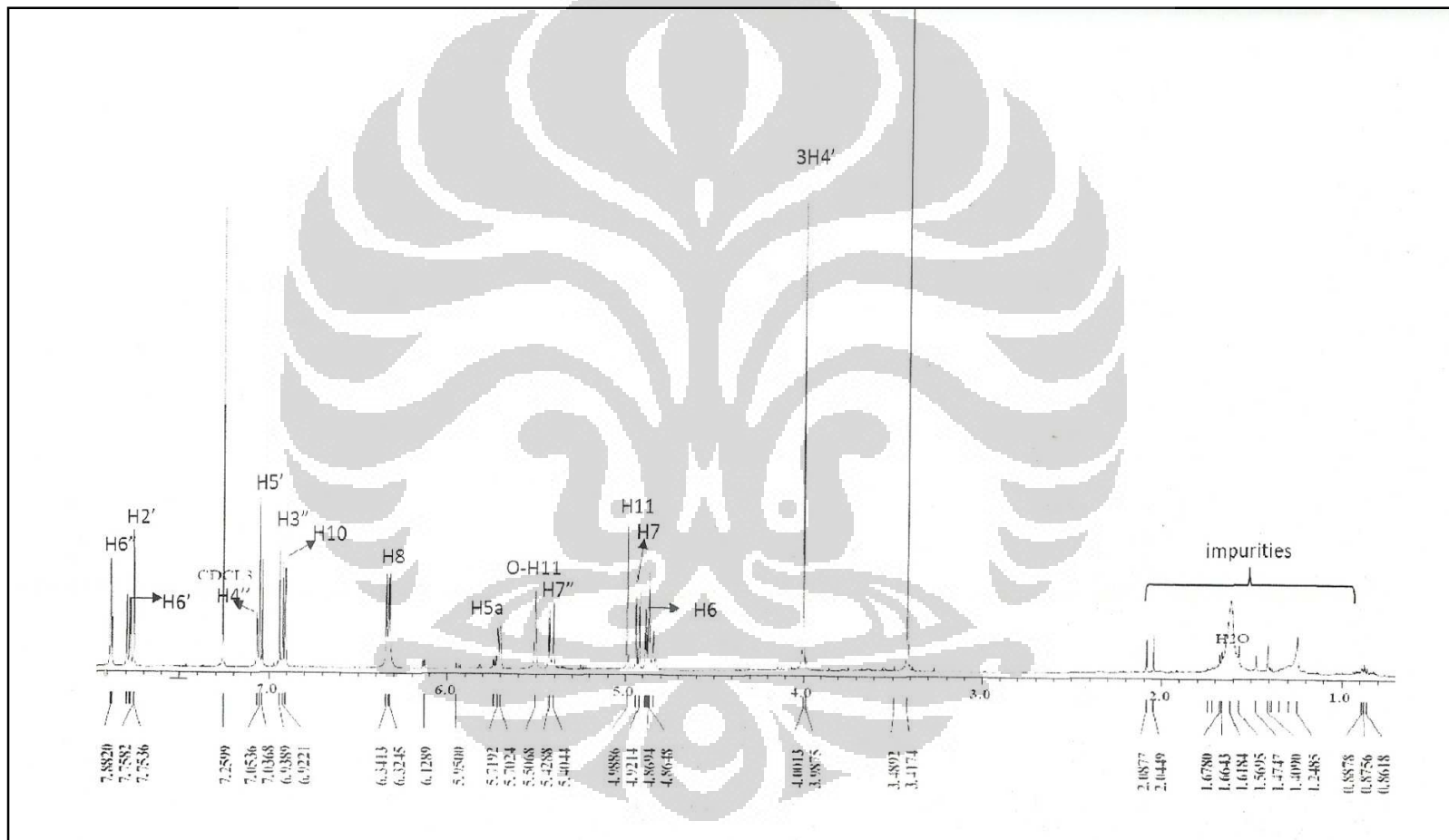
kromatogram spektra  $^1\text{H-NMR}$  senyawa target dan senyawa emestrin disajikan pada Gambar 14 A dan 14 B.

Tabel 3. Ringkasan spektrum  $^1\text{H-NMR}$  senyawa target dibandingkan dengan emestrin menurut Nursid *et al.* (2011)

Active Compound $\delta\text{H}$ (Multiciplity, $J$ coupling)	
Senyawa Target	Emestrin
3.48 (s)	3.40 (3H,s)
	5.71 (1H, d, 8.4 Hz)
4.80 (s)	4.88 (1H, td, 2.3 & 2.8 Hz)
4.99 (d, 5 Hz)	4.93 (1H, dd, 2.3 & 8.4 Hz)
6.36 (d, 3.3 & Hz)	6.32 (1H,dd,2.3 & 8.4 Hz)
6.83 (d, 3.2 Hz)	6.91 (1H, d, 2.3 Hz)
4.99 (d, 1.5 Hz)	4.98 (1H, s)
5.39 (dd, 2.3 &5.8 Hz)	5.5 (s, 1H)
7.46 (s)	7.75 (1H, d, 2.3 Hz)
4.06 (s)	4.0 (3H, s)
7.04 (d, 8.4 Hz)	7.04 (1H, dd, 8.4 Hz)
7.85 (d, 2.5 Hz)	7.79 (1H, dd, 1.55 Hz)
6.36 (d, 2.3 & 8.4 Hz)	6.32 (1H)
6.92 (d, 1.5 Hz)	6.92 (1H, dd, 8.4 Hz)
7.20 (s)	7.07 (1H, d, 2.3 Hz)
7.87 (d, 5 Hz)	7.88 (1H, d, 2.3 Hz)
5.39 (dd, 0.2 & 4.1Hz)	5.41 (1H, d, 12.2 Hz)
8. 35 (d, 0.1Hz)	
8.71 (s)	



Gambar 14 (A). Profil kromatogram <sup>1</sup>H-NMR senyawa target

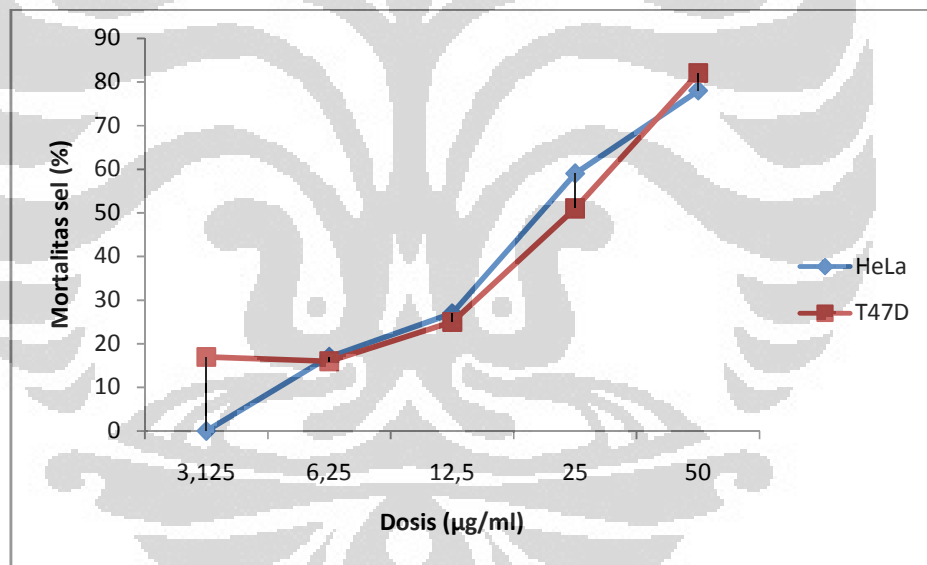


Gambar 14 (B). Profil kromatogram  $^1\text{H-NMR}$  senyawa emestri (Nursid *et al.* 2011)



## 4.2 Aktivitas Sitotoksik Senyawa Target

Profil penghambatan senyawa target terhadap pertumbuhan sel kanker payudara (T47D) dan sel kanker leher rahim (HeLa) (Gambar 17) secara umum memiliki pola penghambatan terhadap sel kanker T47D dan HeLa yang sama. Kematian sel kanker T47D dan HeLa semakin meningkat pada kisaran dosis 6.25 sampai 50  $\mu\text{g/ml}$ , namun pada dosis yang lebih rendah yaitu 3.125  $\mu\text{g/ml}$ , sel kanker HeLa belum mengalami kematian, sedangkan sel kanker T47D pada dosis yang sama sudah mampu menghambat pertumbuhan sel kanker hingga 17 %.

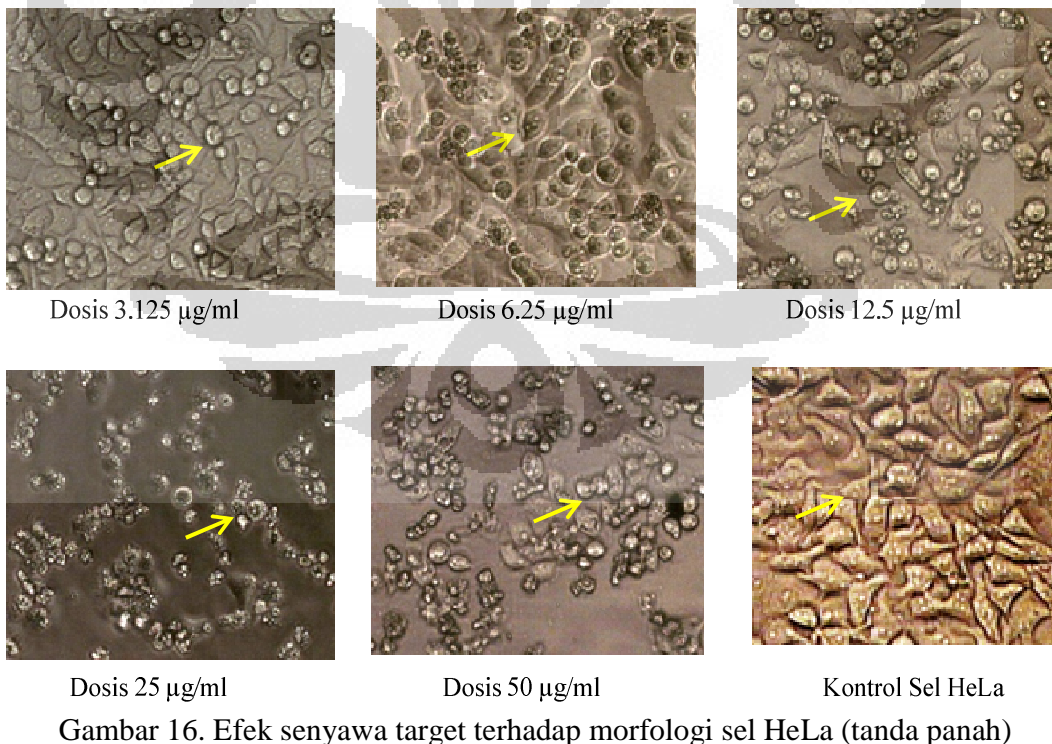


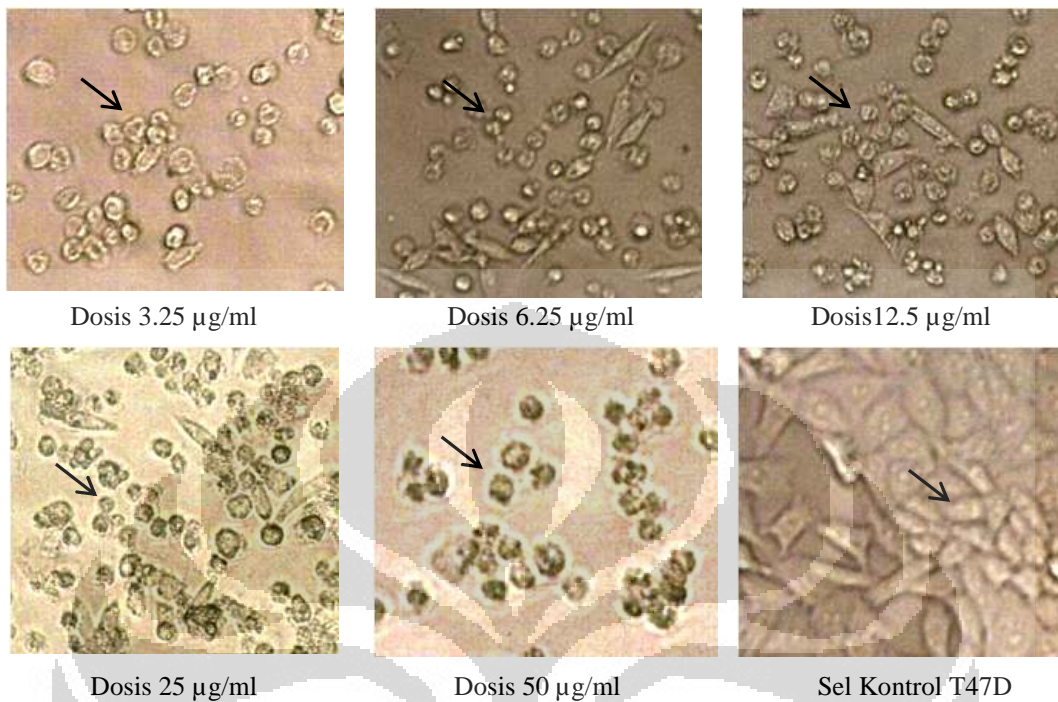
Gambar 15. Profil aktivitas sitotoksik dengan metode MTT terhadap sel HeLa dan T47D setelah diberi perlakuan senyawa target selama 24 jam

Hasil analisis probit dengan program MINITAB 16.0 memperlihatkan bahwa senyawa target memiliki efek sitotoksik kuat terhadap sel HeLa dengan nilai  $\text{IC}_{50}$

sebesar 21,2  $\mu\text{g/ml}$ , sedangkan pada sel T47D senyawa target memiliki efek sitotoksik lebih kuat dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar 20,9  $\mu\text{g/ml}$ .

Emestrin dari kapang laut *Emericella nidulans* memiliki efek sitotoksik paling kuat terhadap sel T47D yaitu 1,8  $\mu\text{g/ml}$  dan 13,8  $\mu\text{g/ml}$  terhadap sel kanker HeLa, namun emestrin tidak toksik terhadap sel normal (vero), dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  260,9 (Nursid, 2012). Publikasi lain tentang aktivitas sitotoksik senyawa metabolit dari kapang laut *Aspergillus ustus* yang memiliki efek sitotoksik yang kuat terhadap sel T47D (Pratitis *et al.* 2010). Selain itu penelitian lain tentang aktivitas sitotoksik ekstrak miselium kapang laut *Trichoderma* terhadap sel T47D juga dilakukan oleh Hikmah (2011) dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar 31  $\mu\text{g/ml}$ . Efek senyawa target terhadap morfologi sel HeLa dan T47D dapat dilihat pada Gambar 16 dan 17.





Gambar 17. Efek senyawa target terhadap morfologi sel T47D (tanda panah)

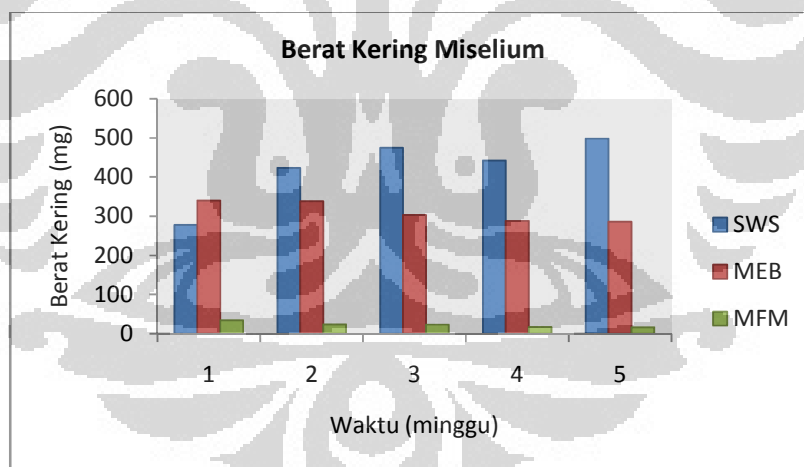
#### 4.3 Produksi Senyawa Target

Produksi senyawa target dari kapang laut *Emericella nidulans* bertujuan untuk mengetahui jenis medium fermentasi yang mampu memproduksi senyawa target paling optimal serta waktu fermentasi paling efektif untuk menghasilkan senyawa target. Fermentasi menggunakan medium *Malt Extract Broth* (MEB), *Soluble Starch Soytone* (SWS) dan *Minimum Fungi Medium* (MFM). Waktu fermentasi yang digunakan untuk produksi senyawa target adalah : 1, 2, 3, 4 dan 5 minggu. Produksi senyawa aktif dari kapang laut *Aspergillus ustus* juga pernah dilakukan oleh Pratitis *et al.* (2010) dengan menggunakan medium MEB, MFM dan *Glucose Peptone Yeast* (GPY). Waktu yang digunakan untuk produksi kapang laut tersebut adalah 2, 4, 6, 8

dan 10 minggu. Waktu yang digunakan untuk produksi tersebut berguna untuk mengetahui kemampuan kapang memproduksi metabolit sekunder yang paling baik.

#### 4.3.1 Berat kering miselium

Pengukuran berat kering miselium kapang laut *Emericella nidulans* bertujuan untuk mengetahui pertumbuhan dan biomasa kapang laut *Emericella nidulans* selama proses fermentasi dari minggu pertama hingga minggu ke-5. Berat kering miselium kapang laut *Emericella nidulans* diperoleh dari hasil panen kapang yang difermentasi dengan medium MEB, SWS dan MFM. Profil berat kering miselium kapang laut *Emericella nidulans* dengan medium fermentasi yang berbeda dengan masa fermentasi 1 - 5 minggu secara ringkas disajikan pada Gambar 18.



Gambar 18. Berat kering miselium kapang laut *Emericella nidulans* dari minggu pertama hingga minggu kelima dengan media yang berbeda

Biomasa yang dihasilkan oleh kapang dipengaruhi oleh substrat yang merupakan sumber nutrisi utama bagi kapang (Gandjar., *et al* 2006). Kapang *Emericella nidulans* difermentasi di medium SWS adalah penghasil biomasa

terbanyak dari ketiga medium fermentasi. Biomasa kapang dari fermentasi di medium SWS pada minggu ke 2, 3, 4 dan 5 masing-masing memiliki berat rata-rata 423.15; 474.9; 442.5 dan 497.9 mg, namun pada minggu pertama medium fermentasi MEB adalah penghasil biomasa kapang terbanyak dengan berat rata-rata 339.7 mg dan 277.6 mg pada medium fermentasi SWS. Biomasa yang dihasilkan oleh kapang *Emericella nidulans* di medium fermentasi MEB terus mengalami penurunan dari minggu ke-2 hingga minggu ke-5. Berat biomasa kapang di medium MEB pada minggu ke 2, 3, 4 dan 5 masing-masing memiliki berat rata-rata 337.8; 303.5; 288.4 dan 285.9 mg.

Perbedaan biomassa yang dihasilkan dari kapang laut *Emericella nidulans* diduga terjadi karena adanya perbedaan komposisi nutrisi pada medium fermentasi yang digunakan. Medium SWS memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi dengan komposisi utama yaitu : 1% pati larut air (*soluble starch*) dan 0,2 % pepton soya. Pati terutama berperan sebagai sumber karbon, hidrogen dan oksigen sedangkan pepton sebagai sumber nitrogen. Umumnya kapang dapat tumbuh dengan baik pada medium yang mengandung karbohidrat tinggi (Dharmaputra *et al.*, 1989).

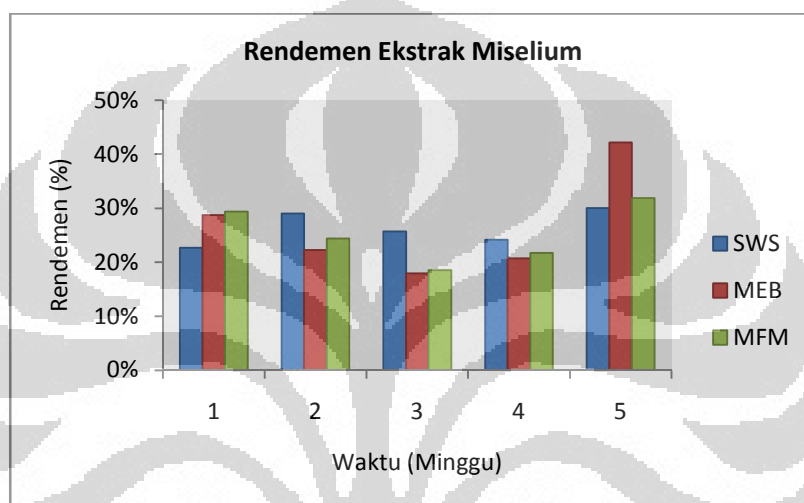
Medium fermentasi MFM adalah penghasil biomasa terkecil dari ketiga medium fermentasi kapang laut *Emericella nidulans*. Biomasa kapang laut *Emericella nidulans* di medium fermentasi MFM terus mengalami penurunan di setiap minggunya. Berat rata-rata biomasa di medium fermentasi MFM adalah 33.9 mg minggu pertama, 23.6 mg minggu kedua, 22.8 minggu ketiga dan 16.5 serta 16.2 pada minggu keempat dan kelima.

Medium MEB memiliki komposisi yang beragam, sehingga menyebabkan kandungan nutrisi MEB menjadi lebih kaya dibandingkan medium MFM. Medium MEB mengandung 0,3% *extrach malt*; 0,3 *extrach khamir*; dan 0,5% *pepton* yang kaya akan unsur C, H, O dan N sebagai nutrisi utama kapang. Sebaliknya, medium MFM memiliki komposisi yang terdiri dari 0,02% *extrach khamir* dan 0,1% *soluble starch* yang mengandung nutrisi yang lebih rendah. Sebagian besar kapang dapat berkembang baik pada medium yang mengandung karbohidrat tinggi. Glukosa merupakan sumber karbon yang banyak digunakan dalam fermentasi kapang diikuti oleh fruktosa, manosa dan galaktosa. Sumber karbon digunakan oleh kapang untuk pertumbuhannya, selain gula sumber karbon juga berasal dari asam-asam organik, alkohol, makromolekul seperti protein, polisakarida dan lemak (Gadd, 1988).

Unsur lain yang sangat diperlukan dalam fermentasi kapang adalah nitrogen. Nitrogen digunakan dalam metabolisme untuk biosintesis berbagai komponen selular, seperti asam nukleat, asam amino, protein dan vitamin (Madigan *et al.*, 2000). Sumber nitrogen yang digunakan kapang dapat dibedakan sebagai sumber nitrogen organik dan anorganik. Sumber nitrogen organik merupakan nutrisi kompleks seperti yeast ekstrak, pepton dan asam amino. Sumber nitrogen anorganik diantaranya adalah  $\text{NaNO}_3$ /  $\text{KNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

#### 4.3.2 Rendemen ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans*

Profil rendemen (*yield*) ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* dari minggu pertama hingga minggu kelima dengan menggunakan medium fermentasi yang berbeda secara ringkas dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Rendemen ekstrak miselium kapang *Emericella nidullans*

Rendemen ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* yang difermentasi dengan medium SWS, MEB dan MFM (Gambar 19), diketahui pada minggu pertama, rendemen terbanyak dihasilkan oleh medium fermentasi MFM dan MEB sebanyak 29 % dan terkecil 23 % oleh medium fermentasi SWS. Rendemen ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* pada medium fermentasi SWS di minggu ke-2 meningkat menjadi 29% dan menurun pada minggu ke-3 dan ke-4 menjadi 26% dan 24%, namun pada minggu ke-5 meningkat menjadi 30%.

Rendemen ekstrak yang dihasilkan di medium fermentasi MEB pada minggu ke-2 sebanyak 22%, menurun pada minggu ke-3 menjadi 18%. Sedangkan pada minggu ke-4 dan ke-5 rendemen ekstrak miselium di medium fermentasi MEB meningkat menjadi 21% dan 42%. Rendemen ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* yang difermentasi dengan medium MFM mampu menghasilkan rendemen ekstrak miselium dari minggu ke 2, 3, 4 dan 5 sebanyak 24, 19, 22 dan 32%.

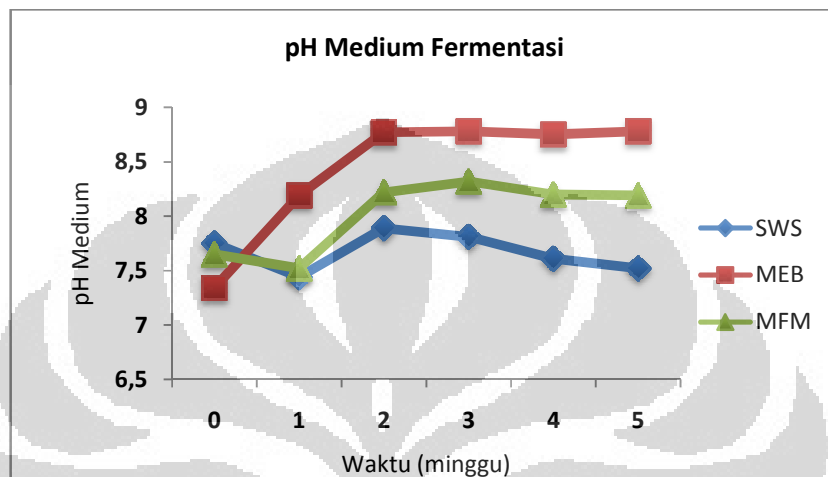
Miselium kering hasil optimasi diekstrak dengan menggunakan campuran diklorometan (DCM) : metanol (MeOH) 1 : 1. Campuran kedua pelarut ini dipilih karena diklorometan bersifat non polar sedangkan metanol bersifat polar sehingga campuran keduanya diharapkan dapat menarik atau melarutkan semua metabolit sekunder yang terdapat pada miselium (Nursid *et al.*, 2012). Ekstraksi miselium kapang menggunakan DCM : MeOH dengan perbandingan 1 : 1 juga dilakukan oleh Hikmah (2011), dalam mengekstrak kapang laut *Trichoderma* yang diisolasi dari spons.

#### **4.3.3 Pengukuran pH dan salinitas medium fermentasi**

Pengukuran pH dan salinitas medium fermentasi yang sudah di pisahkan dari miselium kapang laut *Emericella nidulans* berguna untuk mengetahui kondisi pH dan salinitas medium fermentasi sebelum ditumbuhi kapang, selama proses fermentasi dan akhir proses fermentasi. Profil hasil pengukuran pH medium fermentasi sebelum ditumbuhi dan setelah ditumbuhi kapang laut *Emericella*



*nidulans* dari minggu pertama sampai dengan minggu kelima dengan menggunakan medium fermentasi yang berbeda (SWS, MEB dan MFM) diringkas sebagaimana pada Gambar 20.



Gambar 20. Hasil pengukuran pH medium fermentasi sebelum ditumbuhi dan setelah ditumbuhi kapang *Emericella nidulans* dari minggu pertama hingga minggu ke 5

pH medium fermentasi kapang laut *Emericella nidulans* di medium SWS, MEB dan MFM sebelum ditumbuhi kapang memiliki pH dengan kisaran netral. Setelah ditumbuhi kapang ketiga medium fermentasi tersebut terjadi perubahan pH. pH medium fermentasi SWS dari kapang laut *Emericella nidulans* selama proses fermentasi dari minggu pertama hingga minggu kelima menunjukkan pH dengan kisaran netral. Hasil pengukuran pH di medium MEB, menunjukkan pH naik terus ke basa. pH tertinggi di medium MEB terjadi di minggu ke 3 dan ke 5, dengan pH 8.78. Perubahan pH yang berbeda juga ditunjukkan oleh medium fermentasi MFM. pH medium MFM di minggu pertama masih dikisaran netral 7.52. pH di minggu kedua

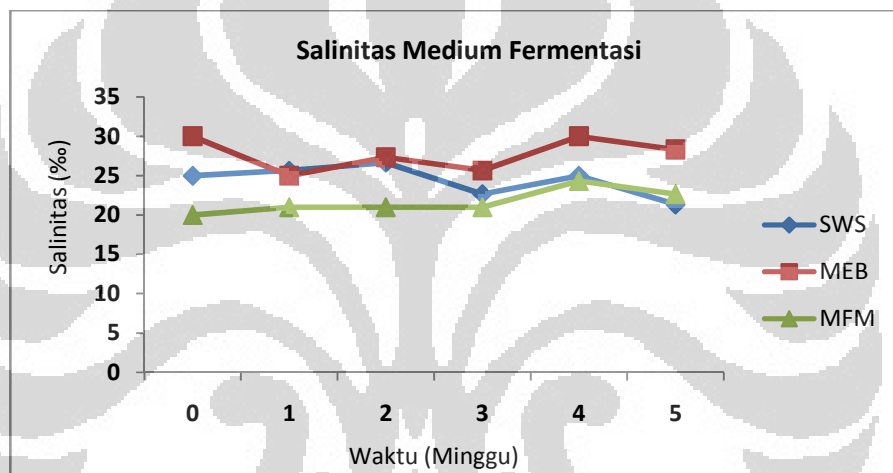
dan ketiga terjadi kenaikan yaitu 8.32. Selanjutnya pH pada minggu keempat dan kelima turun kembali mendekati pH netral yaitu 8.19.

Selama proses fermentasi, pH pada medium fermentasi kapang dapat berubah-ubah. Hal tersebut diduga karena terjadinya pertukaran antara kation dan anion selama proses metabolisme kapang, dapat juga disebabkan oleh akumulasi senyawa organik yang dihasilkan selama proses metabolisme glukosa sehingga terjadi penurunan pH medium kearah asam selama proses fermentasi kapang (Griffin, 1984). Penelitian yang mempelajari perubahan pH medium fermentasi kapang *Aspergillus awamori* dilakukan oleh Lasmaria (2011) diketahui dari hasil pengukuran pH pada medium fermentasi kapang *Aspergillus awamori* tidak terlalu besar yaitu pada pH 6,8 menjadi 7,0 sehingga menyebabkan aktifitas antioksidan maksimal.

Medium fermentasi kapang laut *Emericella nidulans* dipengaruhi oleh kadar garam (salinitas). Medium fermentasi memiliki salinitas awal yang berbeda yaitu 25 ‰ pada media SWS, 30 ‰ dan 20‰ pada media MEB dan MFM. Ketiga medium fermentasi tersebut dilarutkan dalam pelarut yang sama yaitu *artificial seawater* (ASW) dengan salinitas 20‰. Perbedaan salinitas awal sebelum proses fermentasi dari ketiga medium fermentasi tersebut, diduga karena mineral yang terkandung dalam tiap medium tersebut berbeda. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh kandungan medium MEB dan SWS yang kaya akan nutrisi dalam bentuk karbon, nitrogen, sulfur, fosfor, kalium, magnesium, natrium, kalsium, nutrisi mikro (besi, mangan, *zinc*, kobalt, molibdenum) dan vitamin. Sedangkan medium

fermentasi MFM adalah medium yang miskin akan nutrisi dengan komposisi media adalah 0,02% ekstrak khamir dan 0,1% soluble starch

Profil hasil pengukuran salinitas pada medium fermentasi SWS, MEB dan MFM sebelum ditumbuhi kapang dan setelah ditumbuhi kapang laut *Emericella nidulans* dari minggu pertama hingga minggu kelima diringkas sebagaimana pada Gambar 21.



Gambar 21. Hasil pengukuran salinitas medium fermentasi sebelum ditumbuhi dan setelah ditumbuhi kapang *Emericella nidulans* dari minggu pertama hingga minggu ke 5

Perubahan pH dan salinitas yang terjadi selama proses fermentasi (Gambar 20 dan 21) diduga selama proses fermentasi, ketika kapang melakukan metabolisme maka nutrisi dalam medium fermentasi akan diubah dalam bentuk materi sel, energi dan produk buangan.

#### 4.3.4 KCKT senyawa target

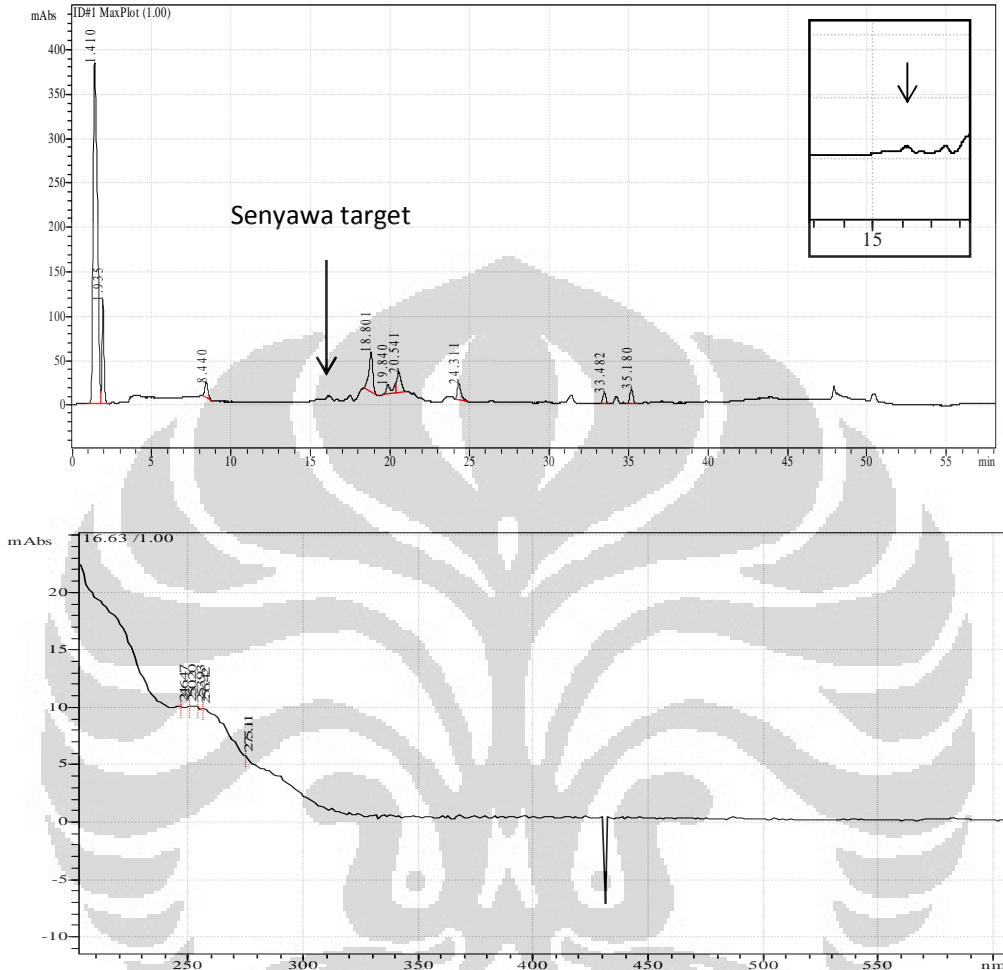
Profil metabolit sekunder ekstrak miselium hasil produksi senyawa target dimonitor dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Penggunaan KCKT untuk memonitor senyawa target dari ekstrak miselium hasil produksi bertujuan untuk mengetahui jenis media dan waktu fermentasi paling optimal memproduksi senyawa target. Standar pembacaan senyawa target dalam ekstrak miselium hasil produksi pada medium fermentasi yang berbeda (SWS, MEB dan MFM) adalah hasil karakterisi senyawa target yaitu diwaktu retensi 16 dan serapan UV maksimum pada 250-254 nm.

Kromatografi cair kinerja tinggi yang digunakan untuk pemantauan ekstrak miselium hasil produksi senyawa target menggunakan instrumen LC shimadzu, kolom Waters Xselect CSH<sup>Tm</sup> C18 5  $\mu$ m, 2,1 x 100 mm, sistem elusi menggunakan asetonitril dalam H<sub>2</sub>O 10 % – asetonitril 90% secara gradien.

Publikasi pencarian senyawa aktif dari kapang dengan menggunakan KCKT diantaranya dilakukan oleh Nielsen *et al.* (2003) dalam pencarian metabolit sekunder dari 474 senyawa aktif kapang diketahui bahwa senyawa emestrin dan emestrin B masing-masing dapat terelusi di waktu retensi 16,05 dan 15.50. Serapan maksimum ( $\lambda_{max}$ ) dari senyawa tersebut adalah 230, 260 dan 282 sh pada senyawa emestrin dan 218, 255 dan 284 sh pada senyawa emestrin B.

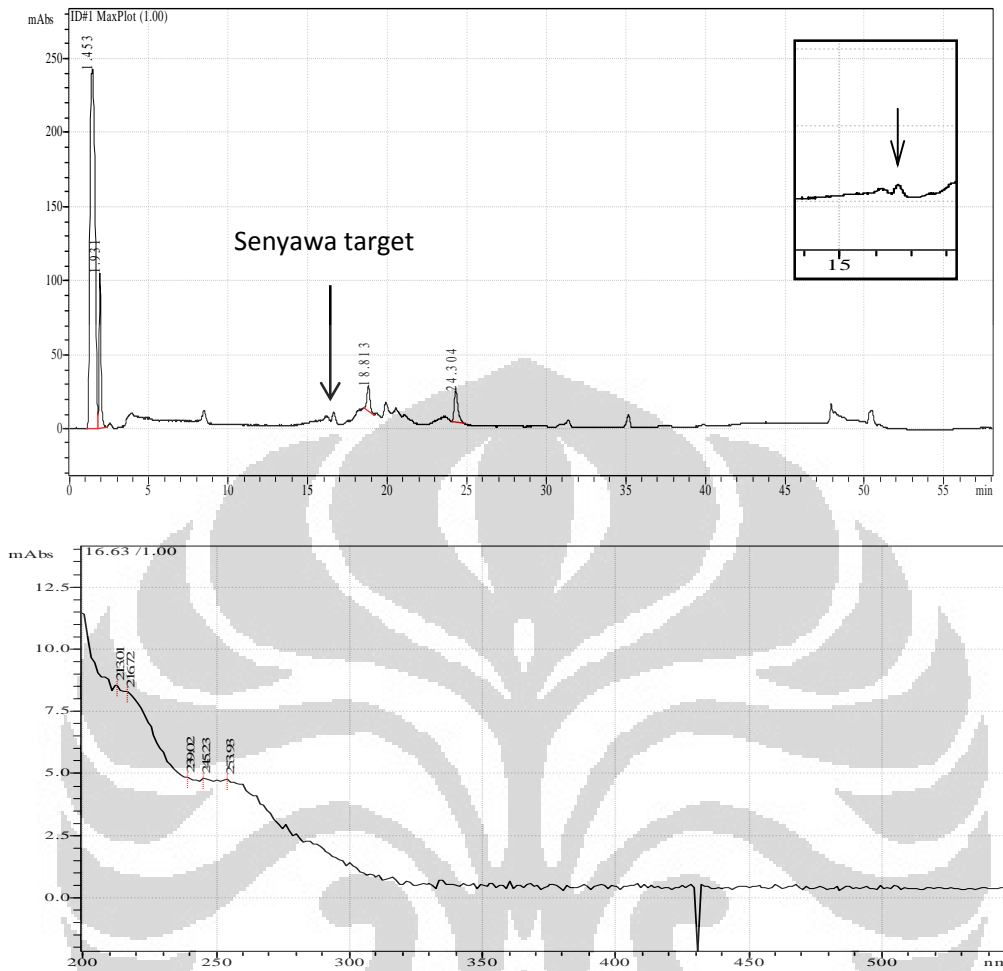
Profil kromatogram KCKT dan serapan UV ekstrak miselium kapang hasil produksi minggu 1 – 5 medium SWS disajikan pada Gambar 22 – 26, Gambar 27 – 31 pada medium MEB dan pada medium MFM disajikan pada Lampiran 4.

## Kromatogram KCKT Produksi Senyawa Target pada Medium SWS



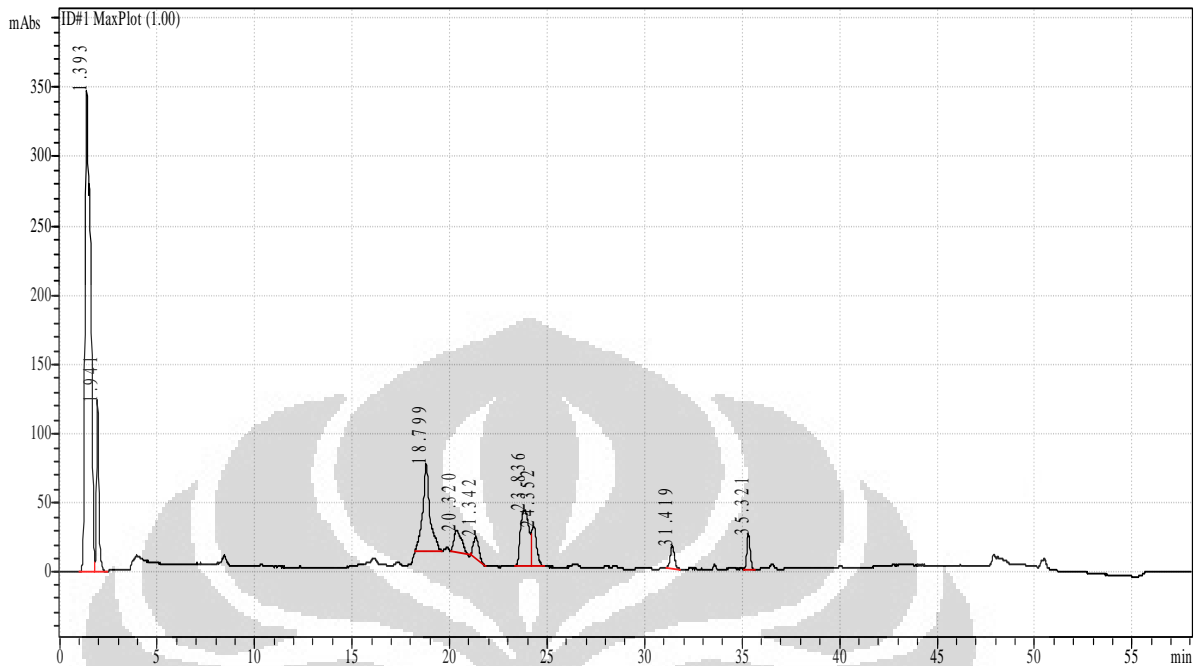
Gambar 22. Profil kromatogram KCKT dan serapan UV ekstrak miselium dari medium fermentasi SWS diwaktu fermentasi 1 minggu

Hasil pemantauan senyawa target dalam ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* pada minggu pertama dengan metode KCKT diketahui bahwa senyawa target sudah dapat terdeteksi, namun kadar dari senyawa target masih sangat kecil. Serapan UV yang sama dengan senyawa target dapat mengindikasikan bahwa senyawa target telah diproduksi diekstrak miselium kapang tersebut.



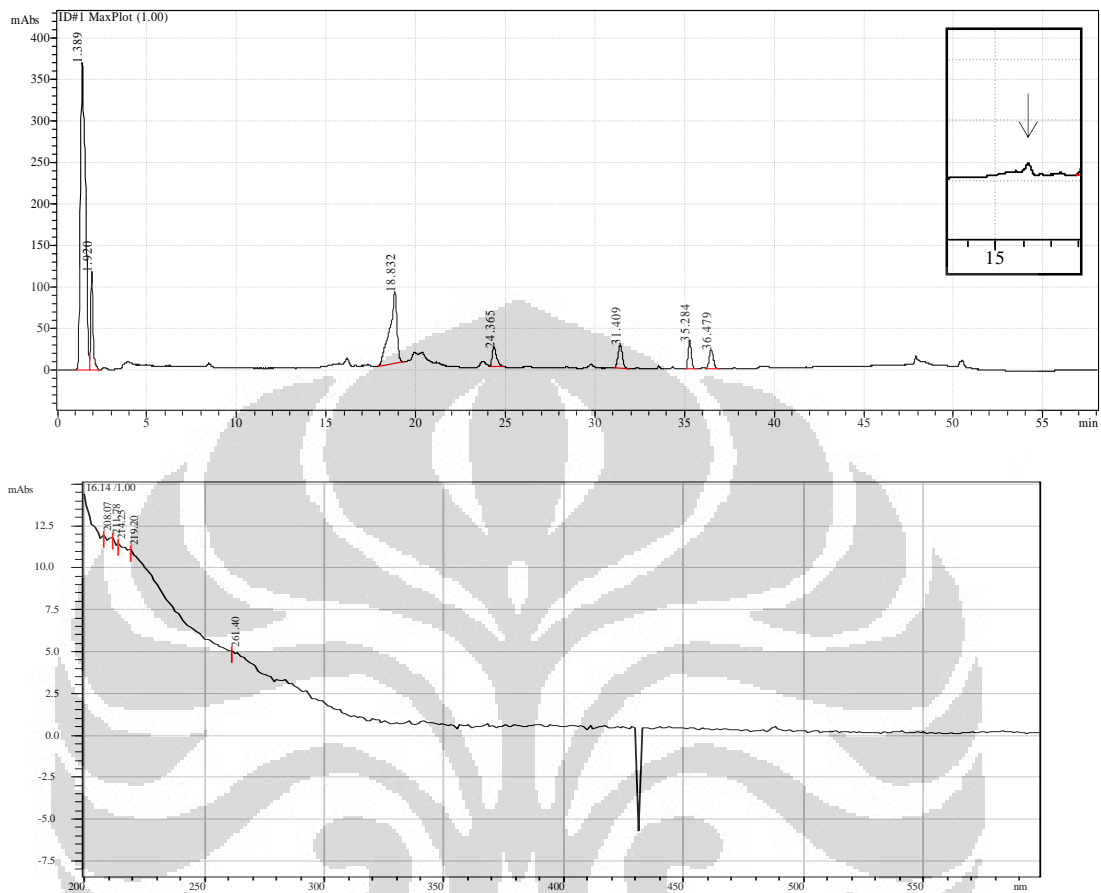
Gambar 23. Profil kromatogram KCKT dan serapan UV ekstrak miselium dari medium fermentasi SWS diwaktu fermentasi 2 minggu

Hasil pemantauan senyawa target dalam ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* pada minggu kedua dengan metode KCKT diketahui bahwa senyawa target sudah dapat terdeteksi, namun kadar dari senyawa target masih sangat kecil. Serapan UV yang sama dengan senyawa target dapat mengindikasikan bahwa senyawa target sudah diproduksi diekstrak miselium kapang tersebut.



Gambar 24. Profil kromatogram KCKT ekstrak miselium dari medium fermentasi SWS diwaktu fermentasi 3 minggu

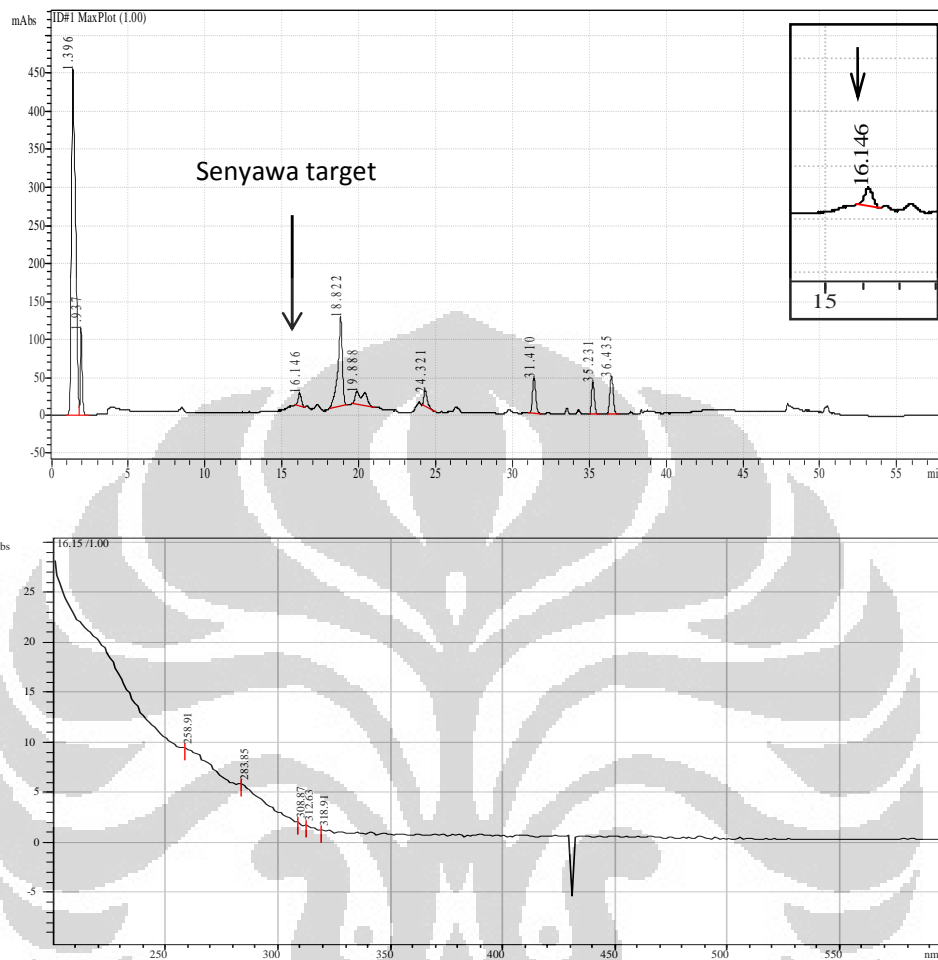
Serapan UV Ekstrak miselium dari medium fermentasi SWS dengan waktu fermentasi 3 minggu tidak terdeteksi serapan UV yang sama dengan senyawa target, sehingga diduga pada minggu ke 3 fermentasi senyawa target tidak diproduksi dalam miselium kapang *Emericella nidulans*.



Gambar 25. Profil kromatogram KCKT dan serapan UV ekstrak miselium dari medium fermentasi SWS diwaktu fermentasi 4 minggu

Hasil pemantauan senyawa target dalam ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* pada minggu keempat dengan metode KCKT diketahui bahwa senyawa target sudah dapat terdeteksi, namun kadar dari senyawa target masih sangat kecil. Serapan UV yang sama dengan senyawa target dapat mengindikasikan bahwa senyawa target sudah diproduksi diekstrak miselium kapang tersebut.

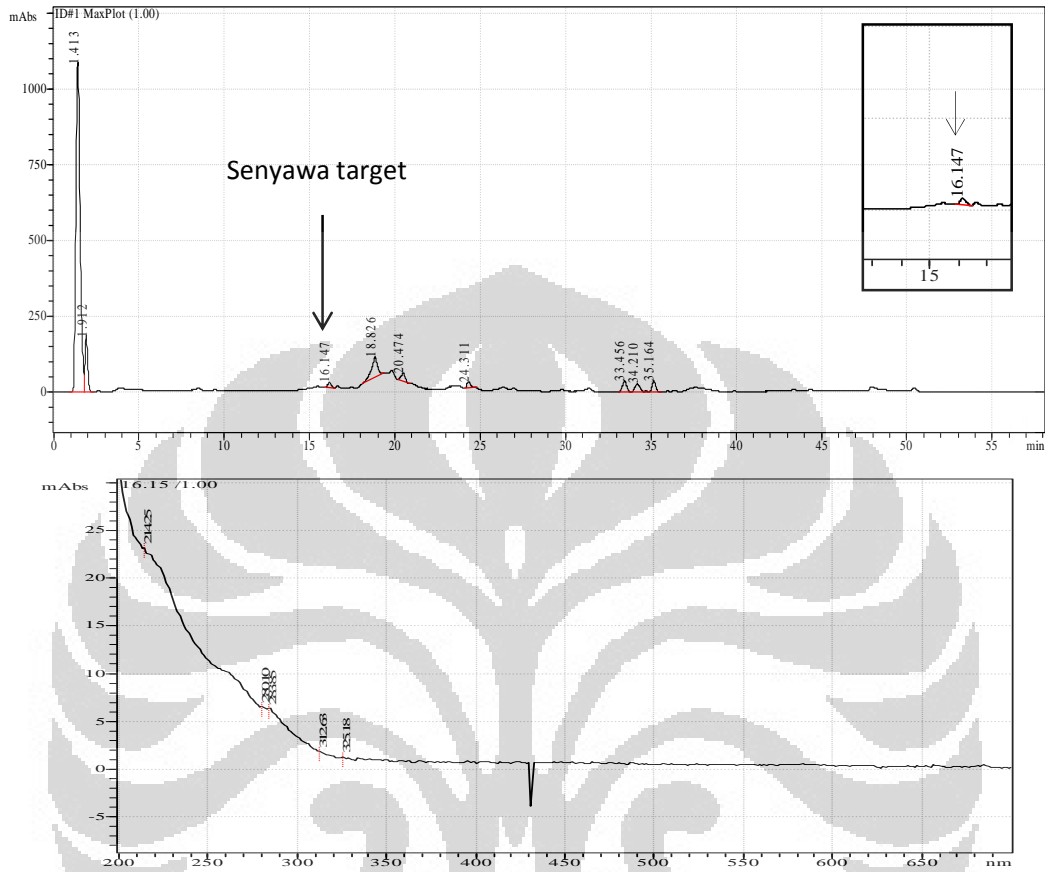




Gambar 26. Profil kromatogram KCKT dan serapan UV ekstrak miselium dari medium fermentasi SWS di waktu fermentasi 5 minggu

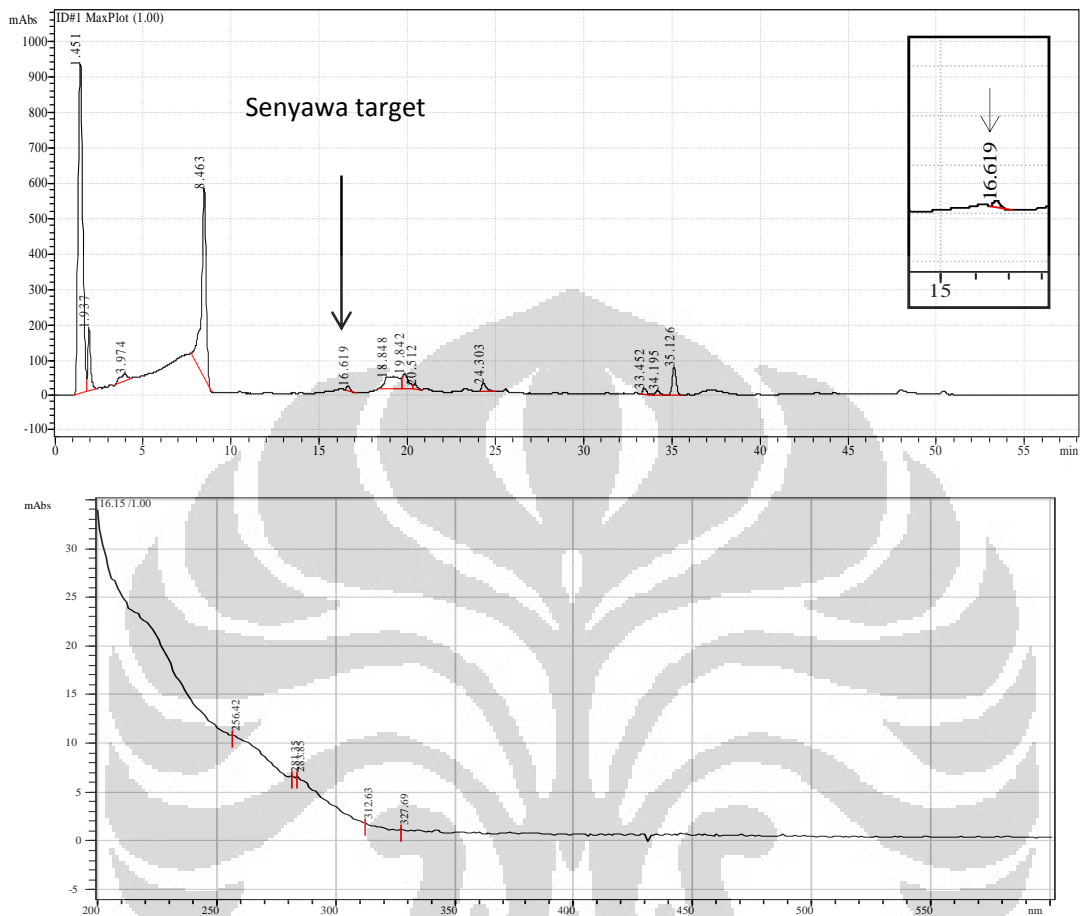
Hasil pemantauan senyawa target dalam ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* pada minggu kelima dalam medium SWS, dengan menggunakan metode KCKT diketahui bahwa senyawa target dapat terdeteksi dengan waktu retensi 16.146. Serapan UV yang dihasilkan sama dengan senyawa target. Sehingga dapat diduga bahwa pada minggu kelima senyawa target dapat diproduksi di miselium kapang dengan medium fermentasi SWS di waktu fermentasi 5 minggu.

## Kromatogram KCKT Produksi Senyawa Target pada Medium MEB



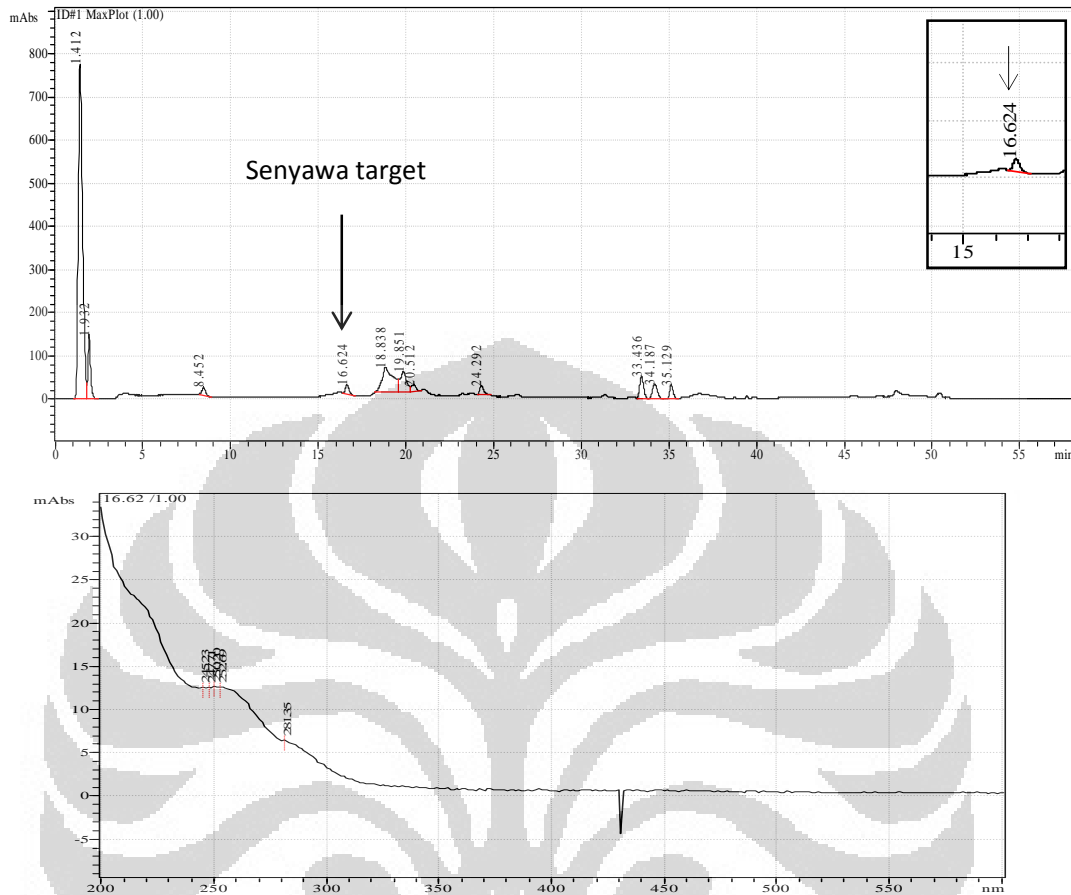
Gambar 27. Profil kromatogram KCKT dan serapan UV ekstrak miselium dari medium fermentasi MEB di waktu fermentasi 1 minggu

Hasil pemantauan senyawa target dalam ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* pada minggu pertama dengan medium MEB, dengan menggunakan metode KCKT diketahui bahwa senyawa target dapat terdeteksi dengan waktu retensi 16.147. Serapan UV yang dihasilkan sama dengan senyawa target. Sehingga dapat diduga bahwa pada minggu pertama senyawa target dapat diproduksi pada miselium kapang dengan medium fermentasi MEB di waktu fermentasi 1 minggu.



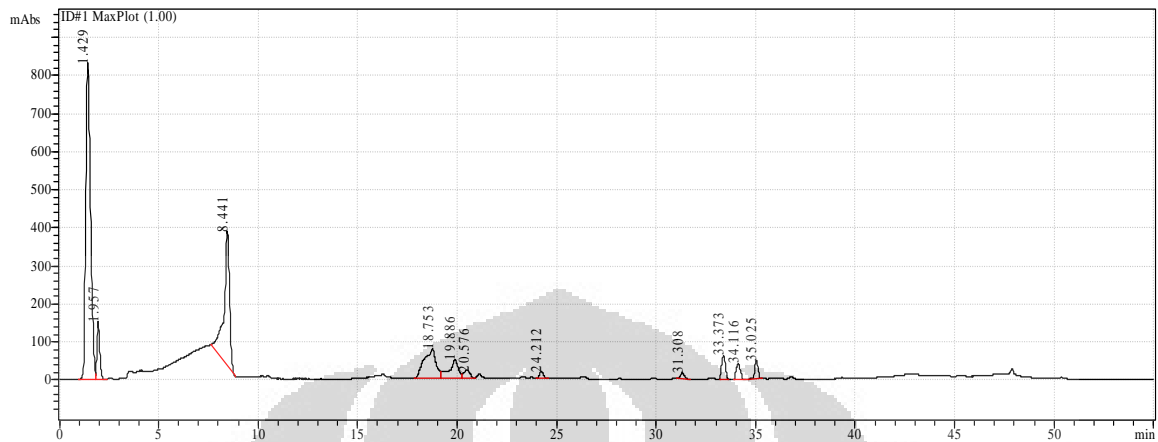
Gambar 28. Profil kromatogram KCKT dan serapan UV ekstrak miselium dari medium fermentasi MEB diwaktu fermentasi 2 minggu

Hasil pemantauan senyawa target dalam ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* pada minggu kedua dalam medium MEB, dengan menggunakan metode KCKT diketahui bahwa senyawa target dapat terdeteksi dengan waktu retensi 16.619. Serapan UV yang dihasilkan sama dengan senyawa target. Sehingga dapat diduga bahwa pada minggu kedua senyawa target dapat diproduksi pada miselium kapang dengan medium fermentasi MEB.

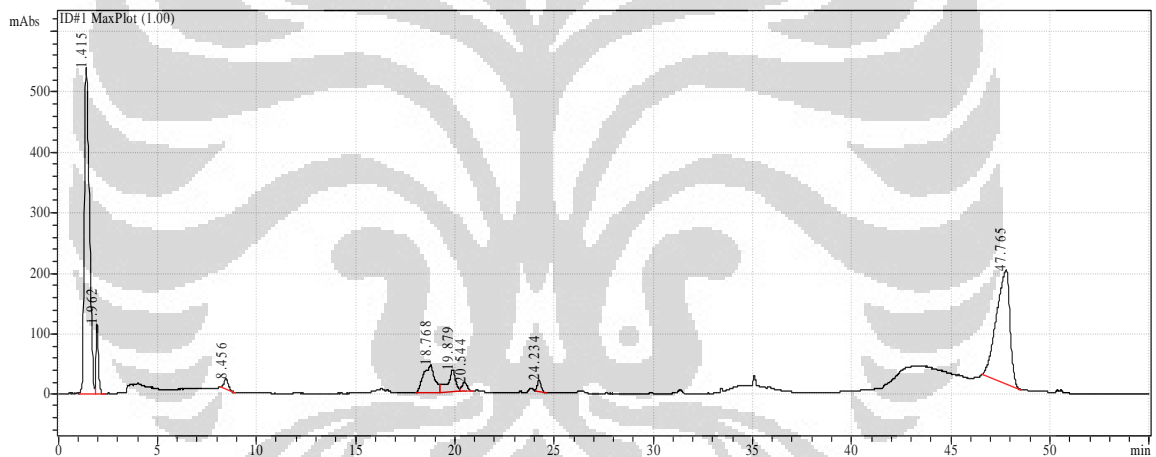


Gambar 29. Profil kromatogram KCKT dan serapan UV ekstrak miselium dari medium fermentasi MEB diwaktu fermentasi 3 minggu

Hasil pemantauan senyawa target dalam ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* pada minggu ketiga dalam medium MEB, dengan menggunakan metode KCKT diketahui bahwa senyawa target dapat terdeteksi di waktu retensi 16.624. Serapan UV yang dihasilkan sama dengan senyawa target. Sehingga dapat diduga bahwa pada minggu ketiga senyawa target dapat diproduksi pada miselium kapang dengan medium fermentasi MEB diwaktu fermentasi 3 minggu.



Gambar 30. Profil Kromatogram KCKT Ekstrak miselium dari medium fermentasi MEB diwaktu fermentasi 4 minggu

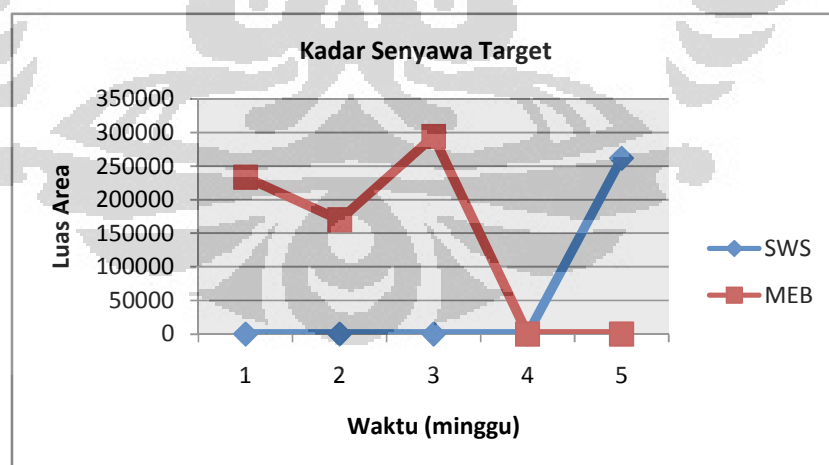


Gambar 31. Profil Kromatogram KCKT Ekstrak miselium dari medium fermentasi MEB diwaktu fermentasi 5 minggu

Profil kromatogram ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* pada minggu ke-4 dan 5 pada medium fermentasi MEB tidak dihasilkan peak senyawa target diwaktu retensi 16. Serapan UV Ekstrak miselium dari medium fermentasi MEB dengan waktu fermentasi 4 dan 5 minggu juga tidak terdeteksi serapan UV yang sama dengan senyawa target, sehingga diperkirakan pada minggu ke 4 dan 5

medium MEB, senyawa target tidak diproduksi pada miselium kapang *Emericella nidulans*.

Kromatogram KCKT ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* dari berbagai media (SWS, MEB dan MFM) diketahui bahwa ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* dari medium SWS dan MEB mampu menghasilkan senyawa target. Medium fermentasi SWS menghasilkan senyawa target diwaktu fermentasi 5 minggu menghasilkan senyawa target dengan kadar (luas area dibawah peak) 261.959, sedangkan medium MEB menghasilkan senyawa target diwaktu fermentasi 1, 2 dan 3 dengan kadar masing-masing 233.271 ; 170.007 dan 294.196. Secara ringkas kadar senyawa target dari ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* hasil produksi senyawa target pada medium SWS dan MEB disajikan pada Gambar 32.



Gambar 32. Kadar senyawa target dari ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* hasil produksi senyawa target pada medium SWS dan MEB.

Kadar senyawa target dengan metode KCKT terhadap ekstrak miselium kapang laut *Emericella nidulans* hasil produksi di medium SWS, diketahui bahwa senyawa target dapat dihasilkan di minggu kelima. Diperkirakan senyawa target juga terbentuk di minggu pertama, kedua dan keempat, namun, konsentrasi dari senyawa tersebut kecil sehingga tidak terbaca oleh KCKT di waktu retensi 16.

Medium fermentasi MEB adalah medium yang kaya akan nutrisi dengan komposisi 0,3% *extrach malt*; 0,3 *extrach khamir*; dan 0,5% *pepton* yang kaya akan unsur karbon (C), hydrogen (H) dan oksigen (O) sebagai nutrisi utama dari kapang. karbon, hydrogen dan oksigen merupakan penyusun utama senyawa metabolit sekunder. Medium fermentasi MEB adalah medium yang kaya akan nutrisi dan bahan dasar bagi kapang untuk mensintesis senyawa metabolit sekunder. Medium fermentasi MEB adalah penghasil senyawa target terbanyak dengan waktu fermentasi yang lebih singkat.

Kadar senyawa target dengan menggunakan metode KCKT terhadap ekstrak kasar miselium dari kapang laut *Emericella nidulans* pada medium fermentasi MFM, tidak dihasilkan senyawa target di waktu retensi 16. Tidak diperolehnya senyawa target dari medium fermentasi MFM dari minggu pertama hingga minggu kelima disebabkan, medium fermentasi MFM adalah medium yang minim akan nutrisi. Komposisi medium fermentasi MFM adalah 0,02% *extrach khamir* dan 0,1% *soluble starch*. Minimnya nutrisi yang terkandung di medium MFM, diperkirakan merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kemampuan kapang *Emericella nidulans* mensintesis senyawa target.

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

1. Senyawa aktif selain emestrin berhasil diisolasi dari ekstrak miselium *Emericella nidulans*. Senyawa aktif tersebut memiliki profil <sup>1</sup>H-NMR dan serapan UV yang berbeda dengan senyawa emestrin.
2. Senyawa target memiliki aktifitas sitotoksik yang kuat terhadap dan sel kanker leher rahim (HeLa) sel kanker payudara (T47D) dengan IC<sub>50</sub> berturut-turut sebesar 21,2 dan 20,9 µg/ml.
3. Optimasi produksi senyawa target dari kapang laut *Emericella nidulans* paling baik dihasilkan di medium *Malt Ekstract Broth* (MEB) pada minggu ke-3.

#### **5.2 Saran**

1. Karakterisasi senyawa target perlu dilakukan penelitian lebih lanjut, untuk mengetahui jenis dan struktur senyawa target tersebut.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang mekanisme penghambatan senyawa target terhadap sel kanker HeLa dan T47D.
3. Optimasi senyawa target dengan medium MEB perlu dilakukan penelitian lebih lanjut guna mengetahui pengaruh salinitas, pH, cahaya dan suhu dalam memproduksi senyawa aktif dari kapang laut *Emericella nidulans*.



## DAFTAR PUSTAKA

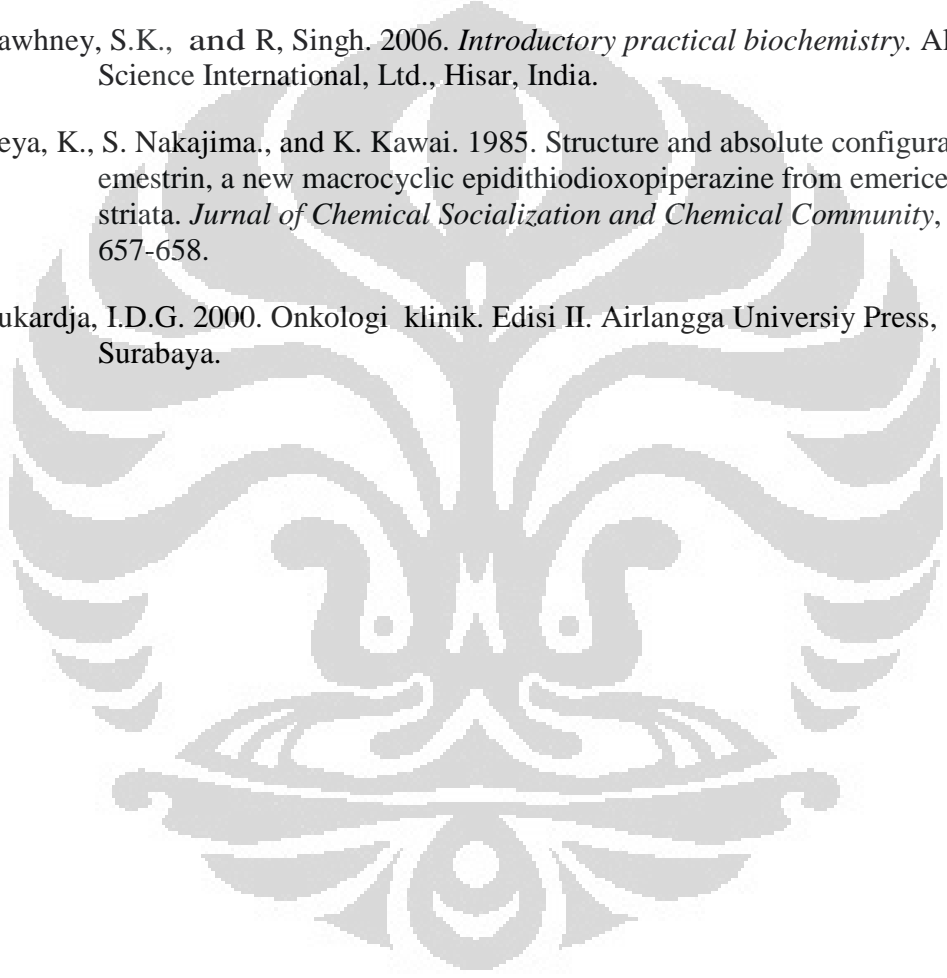
- Agusta, K.L. 2009. *Biologi dan kimia jamur endofitik*. Institut Teknologi Bandung (ITB), Bandung.
- Anonim, 2012. Kanker <http://yayasankankerindonesia.org/tentang-kanker/>. (diakses tanggal 4 Juli 2012).
- Bhilabutra, W., T. Techhowisan, J.F. Peberdy., and S. Lumyong. 2007. Antimicrobial activity of bioactive compounds from *Periconia siamensis* CMUGE015. *Journal of Antibiotics*, 2 (10) : 749-755.
- Bilgrami, K.S., and R.N. Verma. 1994. *Physiology of fungi*. 2<sup>nd</sup> ed. Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- Black, J.G. 1999. *Mikrobiologi: Principles end exploration*. 5<sup>th</sup> ed. John Wiley, New York.
- Broker, K. 1999. *Biological aspect of the production of secondary metabolites in sponge-microorganisms symbiosis: function and origin of natural products and difficultsies in studying them*. Thesis, Institute of Taxonomix Zoology University of Amsterdam, Amsterdam.
- Bugni, S., and C.M. Ireland. 2004. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganism, *Jaurnal of Natural Products*, 21: 143-163.
- Burdall, E.S., M.A Hanby., Landsdown., and V. Speirs. 2003. Breast cancer cell line. *Breast Cancer Researches*, 5(2): 89-95.
- Burkhardt, K., H. Fiedler, and Zeeck. 1996. Metabolite pattern analysis of *Streptomyces griseoviridis*. *Journal of Antibiotics*, 49: 432-437.
- Calvo, A.M., R.A. Wilson, J.W. Bok., and N.P. Keller. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, September :447-438.
- Cannell, R.J.P. 1998. *Natural products isolation*. Humania Press, New Jersey.
- Carlile, M.J., and S.C. Watkinson. 1994. *The fungus*. Academic Press, London.
- Cinquina, A.I., F. Longo., G. Anastasi., L. Gianetti., and R. Cozzani. 2003. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline. *Journal of Chromatography*, 987: 227-233.

- Debbab, A., A.H. Aly., W.H. Lin., and P. Proksch. 2010. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. *Microbiology and Biotechnology*, 3 (5): 544-563.
- Dharmaputra, O.K., A.W Gunawan., dan Nampian . 1989. *Penuntun mikrobiologi dasar*. Bogor: Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat, Institut Pertanian Bogor.
- Effendi, H. 2004. *Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites of sponge -derived fungi collected from the Mediterranean sea (Italy) and Bali (Indonesia)*. Dissertationsi, Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultat, Heinrich Heine Universitat Dusseldorf,
- 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 Microbiology* : 3727-3729.
- Frederick, C.A., L.D.Wiliams., and J.H. Rich. 1990. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes. *Biochemia*, 29: 2538-2549.
- Gadd, G.M. 1988. Physiology of fungal growth, carbon nutrition and metabolism. In *Physiology of industrial fungi*, Edited by D.R. Berry, Oxford: Blackwell Scientific Publication.
- Gandjar, I., I.R. Koentjoro., W. Mangunwardoyo., dan L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. Jurusan Biologi FMIPA UI, Depok
- Gandjar, I., R.A. Samson., K.V. Tweel-Vermeulen., A. Oetari., dan I. Santoso. 1999. *Pengenalan kapang tropik umum*. Yayasan Obor Indonesia.
- Ganjar, I., W. Sjamsuridjal., dan A. Oetary. 2006. *Mikologi dasar dan terapan* . Jakarta: Yayasan Obor Indonesia
- Glazer, A.N., and H. Nikaido. 1998. *Microbial biotechnology : fundamentals of applied microbiology*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Griffin, D.H. 1984. *Fungal Physiology*. John Wiley and Sons.
- Hanahan, Y.A., and R.A.Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer . *Cell*, 100: 57-70.
- Herath, K.B., H. Jayasuriya., J.G. Ondeyka., J.D. Polishook., G.F. Bills., A.W. Dombrowski., A. Cabello., P.P. Vicaria., H. Zweerink., Z. Guan., and S.BSingh. 2005. Isolation and structures of novel fungal metabolites as chemokine eceptor (CCR2) antagonists. *Journal of Antibiotics*, 58 (11): 686-694.

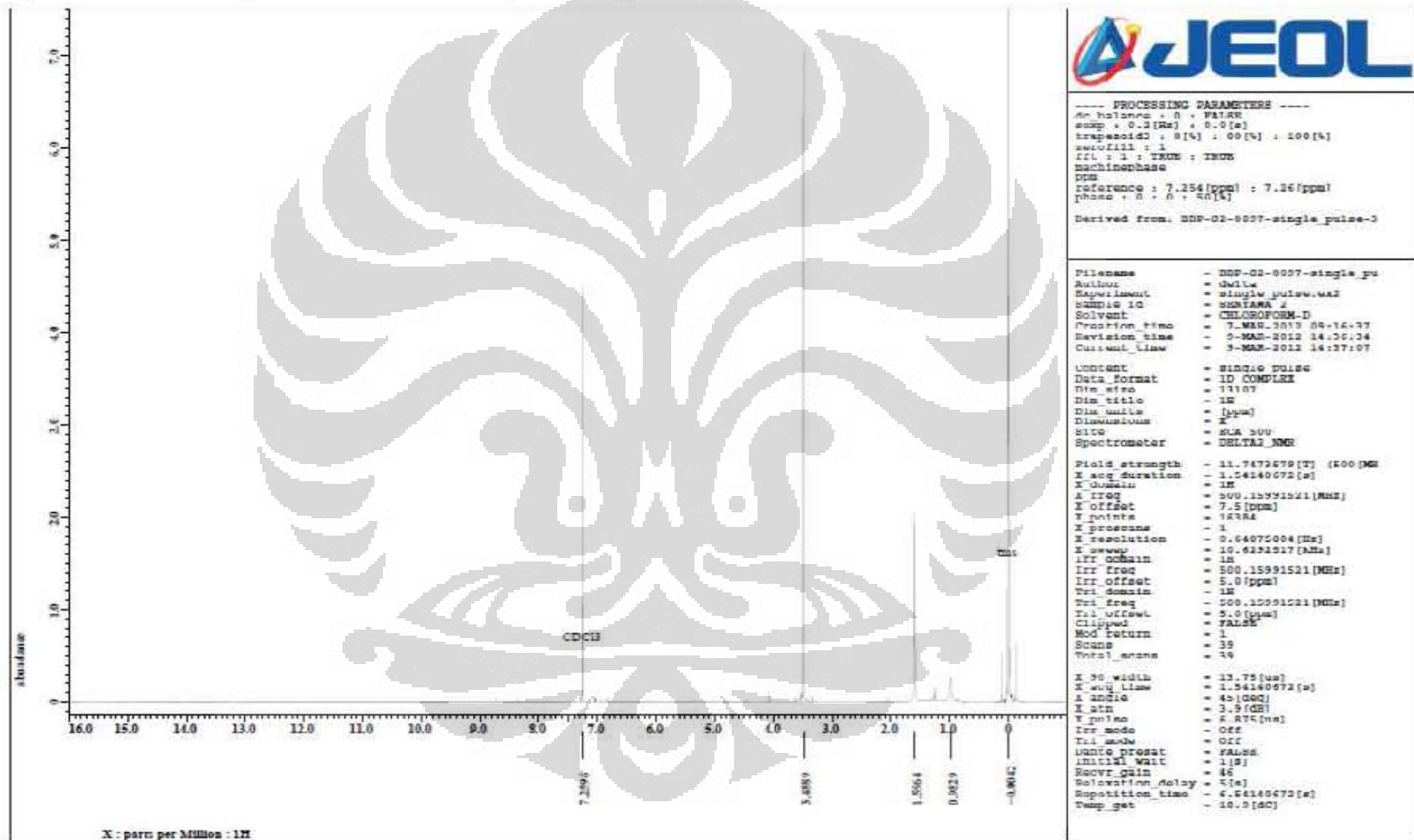
- Hikmah, F. 2011. *Uji sitotoksik ekstrak kapang MFK-25-10 dari spons PR-17-IV-10 perairan pulau rote terhadap sel kanker payudara T47D*. Skripsi Departemen Biologi, FMIPA Universitas Indonesia
- Holler, U. 1999. *Isolation, biological activity and secondary metabolite investigation of marine derived fungi and selected host sponge*. Dissertation. Facultat der Technischen Universitat Corolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Holler,U., A.D. Wright., G.F. Matthee., G.M Koning., S. Draeger., H.J. Aust., and B. Schulz. 2000. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycology Research*. 104 (11): 1354-1365.
- Hiort, J., K. Maksimenka., M. Reichert., S.P. Ottstadt., W.H. Lin., V. Wray., K. Steube., K. Schaumann, K., H. Weber., P. Proksck., R. Ebel., W.E.G Muller., and G. Bringmann. 2004. New natural products from the sponge-derived fungus *Aspergillus niger*. *Journal of Natural Products*,67: 1532-1543.
- Jong S.C 1981. Isolation, Cultivation and Maintenance of Conidial Fungi In *Biologi Of Conidial Fungal*, Vol 2., Editing by G.T Coke and B. Kendrick, New York: Academic Press.
- Lasmaria, C. 2011. *Antioksidan yang dihasilkan kapang Aspergillus spp dengan pengaruhnya Terhadap Perbaikan Jaringan Hati Tikus Putih (Rottus norvegicus L) Galur Sprague Dawley*. Tesis, Departemen Biologi, FMIPA Universitas Indonesia
- Kralj, A., S. Kehraus., A. Krick., A. Eguereva., G. Kelter., M. Maurer., A. Wortmann., H.H. Fiebig., and M. Konig. 2006. Arugosin G and H: Prenylated Polyketides from Marine-Derived Fungi *Emericella nidulans* var. *acristata*. *Journal of Natural Products*, 69: 995-2000 .
- Kito, K., R. Ookura., S. Yoshida., M. Namikoshi., T. Ooi., and T. Kusumi. 2008. New Cytotoxic 14-Membered Macrolides from Marine-Derived Fungus *Aspergillus ostianus*. *Organic Letters*, 10 (2): 225-228.
- Kohlmeyer, J., and E. Kohlmeyer. 1979. *Marine mycology the higher fungi*. Academic Press., Inc., London.
- Liu, H., R.A. Edrada-Ebel., R. Ebel., Y. Wang., B. Schulz., S. Draeger., W.E.G. Muller., V. Wray., W. Lin., and P. Proksch. 2009. Drimane Sesquiterpenoids from the Fungus *Aspergillus ustus* Isolated from the Marine Sponge *Suberites domuncula*. *Journal of Natural Products*, 72: 1585-1588.

- Mabrouk, M.A., H.K. Zeinab., R.H. Eman., A.Y. Amani., and A.A.E.A. Abeer. 2008. Production of some biologically active secondary metabolites from marine-derived fungus *Varicosporina ramulosa*. *Malaysian Jurnal of Microbiol4* (1): 14 - 24.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko., and J. Parker. 2000. *Brock biology of microorganisms*. 9th ed. Prentice Hall International, Inc., London.
- Manitto, P. 1992. *Biosynthesis Of natural products*. Ellis Horwood Limited.
- Miller, J. M. 2005. *Chromatography: concepts and contrasts*. John Wiley & Sons, Inc., Canada.
- Nielsen, F.K., and J. Smedsgaard. 2003. Fungal metabolites screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography – UV–mass spectrometry methodology. *Jurnal Of Chromatography A*, 1002 : 111-136.
- Nursid, M., A. Pratitis., dan 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.
- Nursid, M., E. Chasanah., Murwantoko., dan S. Wahyuono. 2011. *Penapisan kapang laut penghasil senyawa sitotoksik dari beberapa perairan Indonesia*. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Vol. 6 No1: 45-56.
- Nursid, M. 2012. *Isolasi dan indentifikasi senyawa berpotensi antitumor dari kapang yang berasosiasi dengan organisme laut*. Disertasi Pascasarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Onodera, H., H. Hasegawa., N. Tsumagari., R. Nakai., T. Ogawa., and Y. Kanda. 2004. MPC1001 and Its analogues: new antitumor agents from the fungus cladorrhinum species. *Organic letters*, 6 (22): 4101-4104.
- Pairet, L., I. Chetland., and W. Katzer. 1995. Azaphilones with endoteline receptor binding activity produced by *Penicillium sclerotiorum*: taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. *Journal of Antibiotics* 48: 913-918.
- Pretsch, E., P. Buhlmann., and C. Affolter. 2000. *Struktur determination of organic compounds*. Berlin: Springer-Verlag.

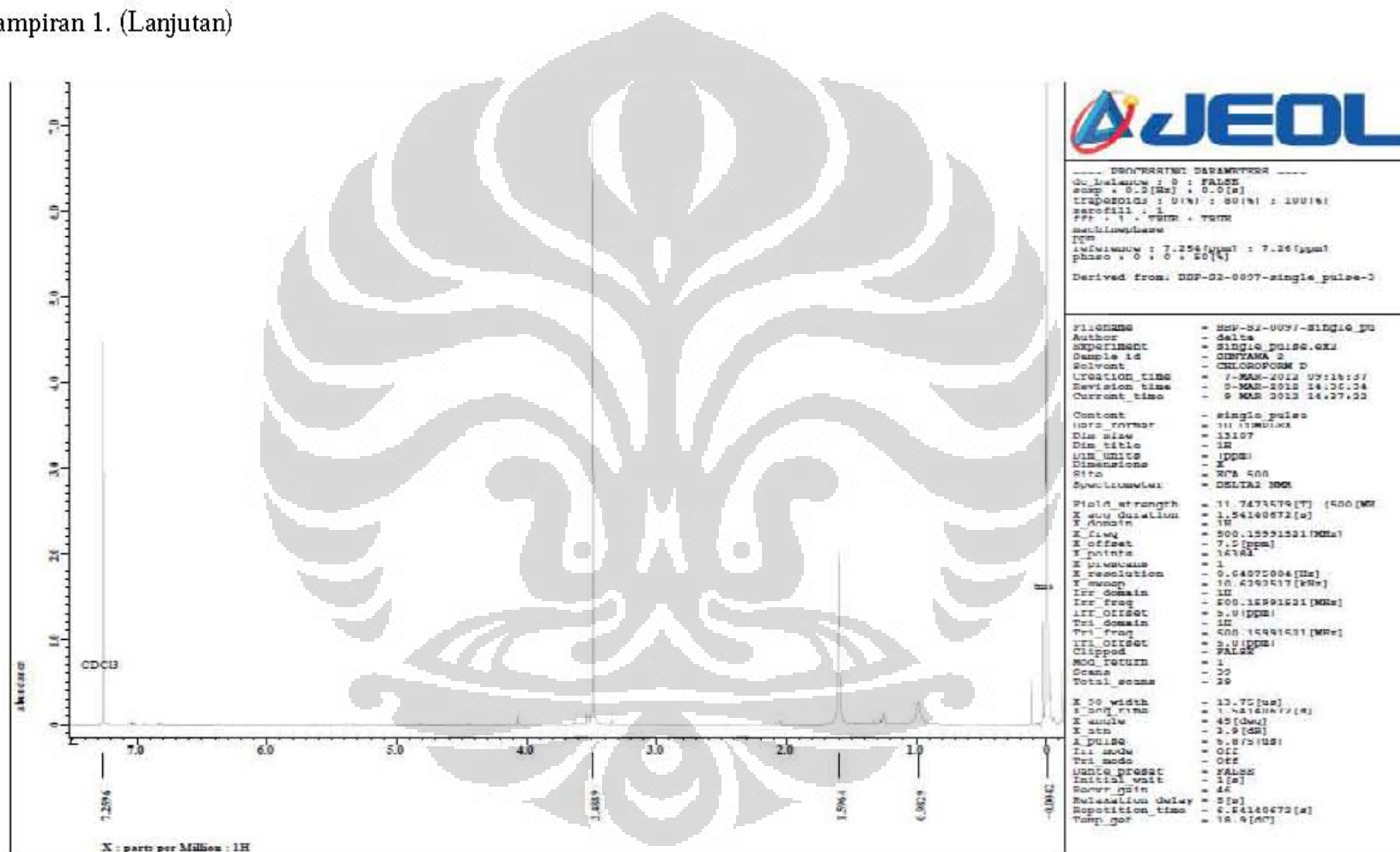
- Pratitis, A., G. Patantis., W. Mangunwardoyo., and E. Chasanah. 2010. *Produksi senyawa bioaktif dari aspergillus ustus MFW 26-08 yang berasosiasi dengan spons laut dalam berbagai media*. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Vol 5. No. 2: 93-102.
- Rosita, T.A., T.R. Wijayanti., E. Widayanti., dan A. Hermawan. 2012. <http://www.ccrf.farmasi.ugm.ac.id>. (diakses tanggal 4 Juli 2012).
- Sawhney, S.K., and R, Singh. 2006. *Introductory practical biochemistry*. Alpha Science International, Ltd., Hisar, India.
- Seya, K., S. Nakajima., and K. Kawai. 1985. Structure and absolute configuration of emestrin, a new macrocyclic epidithiodioxopiperazine from *emericella striata*. *Jurnal of Chemical Socialization and Chemical Community*, 117: 657-658.
- Sukardja, I.D.G. 2000. *Onkologi klinik*. Edisi II. Airlangga University Press, Surabaya.



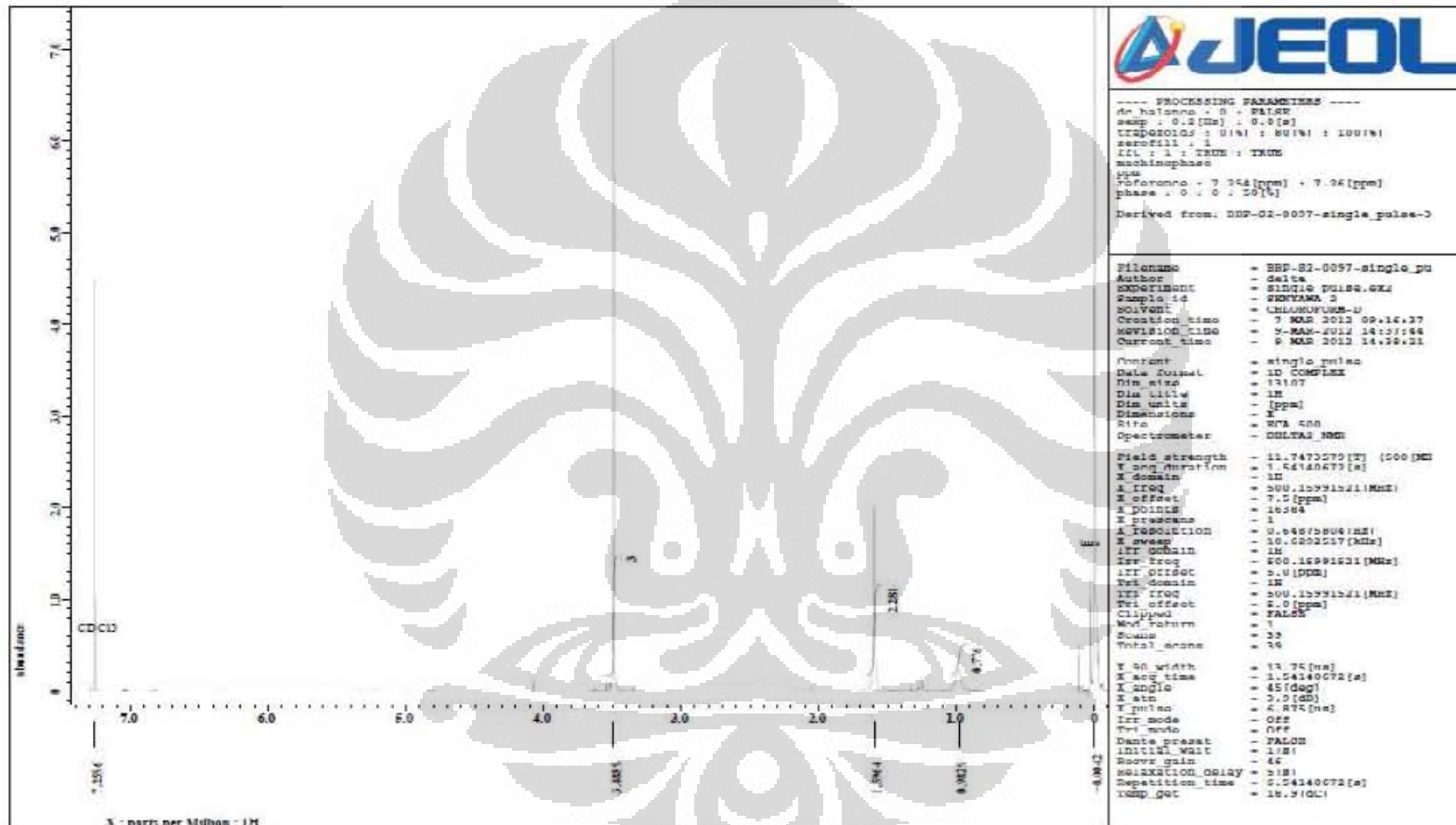
### Lampiran 1. Hasil Pengukuran $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Target



Lampiran 1. (Lanjutan)

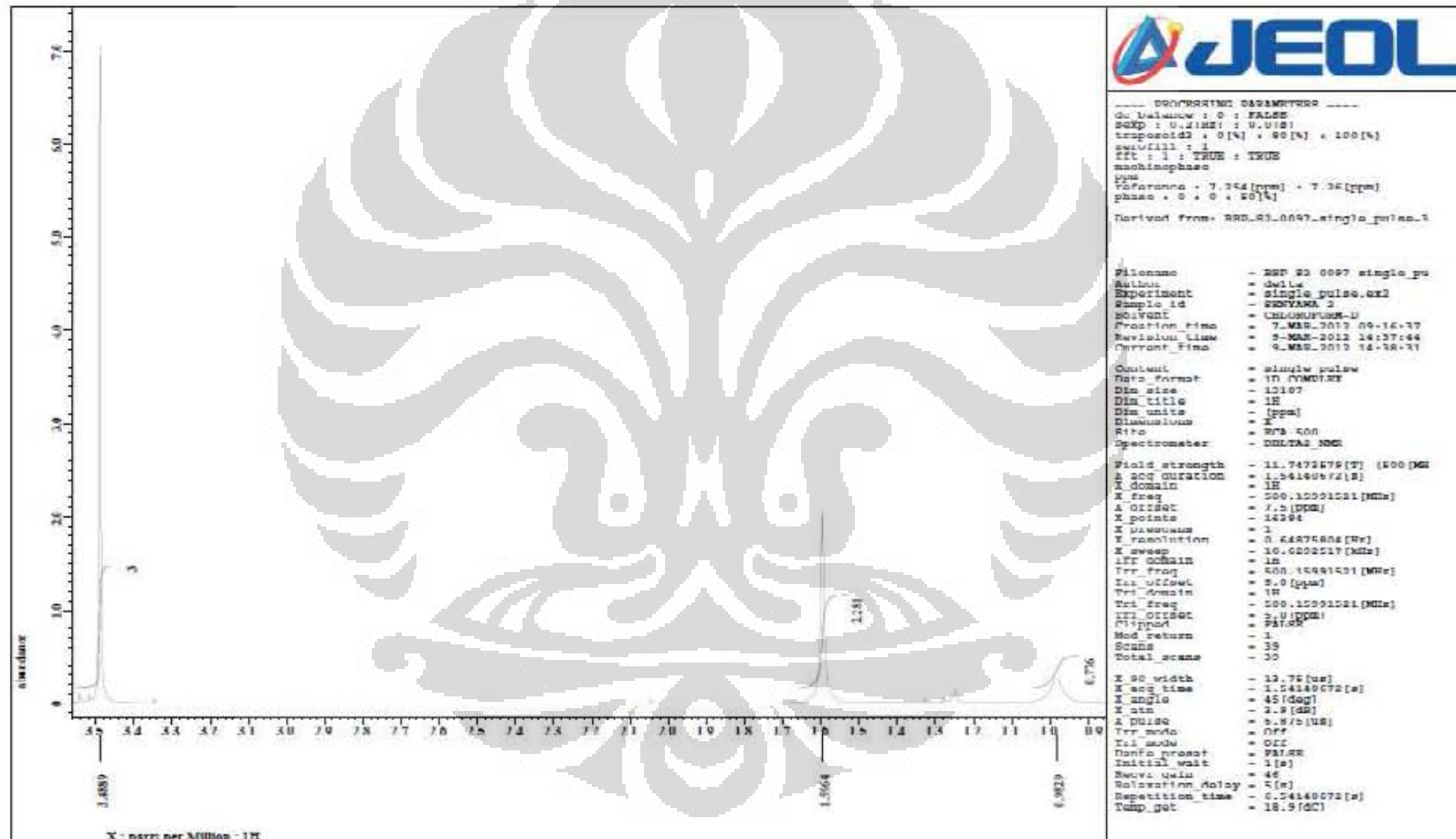


Lampiran 1. (Lanjutan)





Lampiran 1. (Lanjutan)



## Lampiran 2 Analisis Probit Senyawa Target vs HeLa

### Response Information

Variable	Value	Count
HeLa	Event	181
	Non-event	319
trial	Total	500

Estimation Method: Maximum Likelihood

### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-3.01996	0.239705	-12.60	0.000
dosis	0.987361	0.0814778	12.12	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -229.153

### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	7.19701	3	0.066
Deviance	9.72457	3	0.021

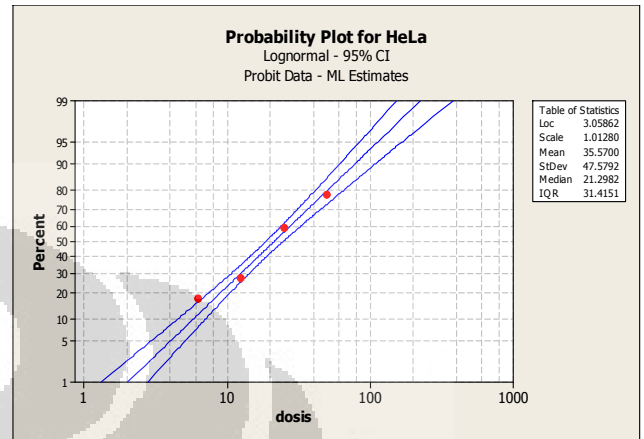
### Tolerance Distribution

#### Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Location	3.05862	0.0706004	2.92025	3.19700
Scale	1.01280	0.0835771	0.861554	1.19060

#### Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	2.01878	0.379165	1.30752	2.78111
2	2.66068	0.443749	1.81133	3.53931
3	3.17006	0.487208	2.22630	4.12638
4	3.61656	0.520842	2.59914	4.63292
5	4.02575	0.548627	2.94723	5.09182
6	4.41031	0.572485	3.27927	5.51927
7	4.77760	0.593513	3.60035	5.92464
8	5.13235	0.612406	3.91374	6.31391
9	5.47780	0.629637	4.22169	6.69120
10	5.81630	0.645549	4.52584	7.05947
20	9.08138	0.771368	7.53909	10.5818
30	12.5223	0.904043	10.7609	14.3412
40	16.4781	1.11939	14.3896	18.8469
50	21.2982	1.50366	18.6258	24.6622
60	27.5282	2.17643	23.8269	32.6541
70	36.2244	3.35903	30.7219	44.5050
80	49.9497	5.61787	41.0554	64.4235
90	77.9898	11.1922	60.9316	108.387
91	82.8092	12.2463	64.2312	116.293
92	88.3829	13.4944	68.0132	125.547
93	94.9455	15.0010	72.4231	136.586
94	102.853	16.8659	77.6797	150.081
95	112.678	19.2524	84.1330	167.124
96	125.426	22.4530	92.3908	189.661
97	143.092	27.0616	103.644	221.612
98	170.487	34.5539	120.724	272.635
99	224.696	50.3934	153.468	378.100



### Lampiran 3 Analisis Probit Senyawa Target vs T47D

#### Response Information

Variable	Value	Count
T47D	Event	191
	Non-event	309
trial	Total	500

Estimation Method: Maximum Likelihood

#### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2.12900	0.188665	-11.28	0.000
dosis	0.699997	0.0671095	10.43	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -271.081

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	18.3446	3	0.000
Deviance	17.7148	3	0.001

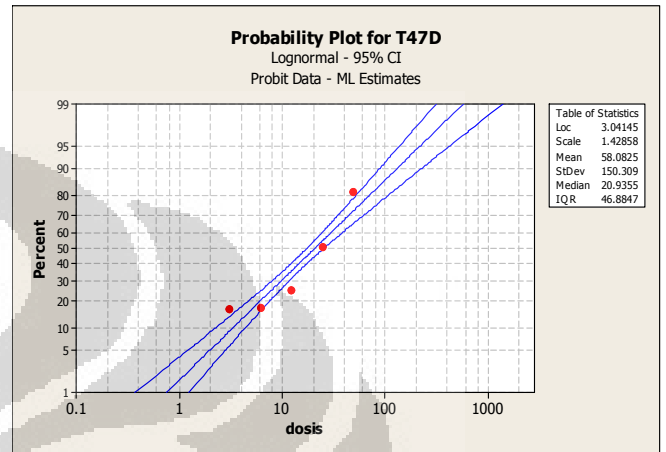
#### Tolerance Distribution

##### Parameter Estimates

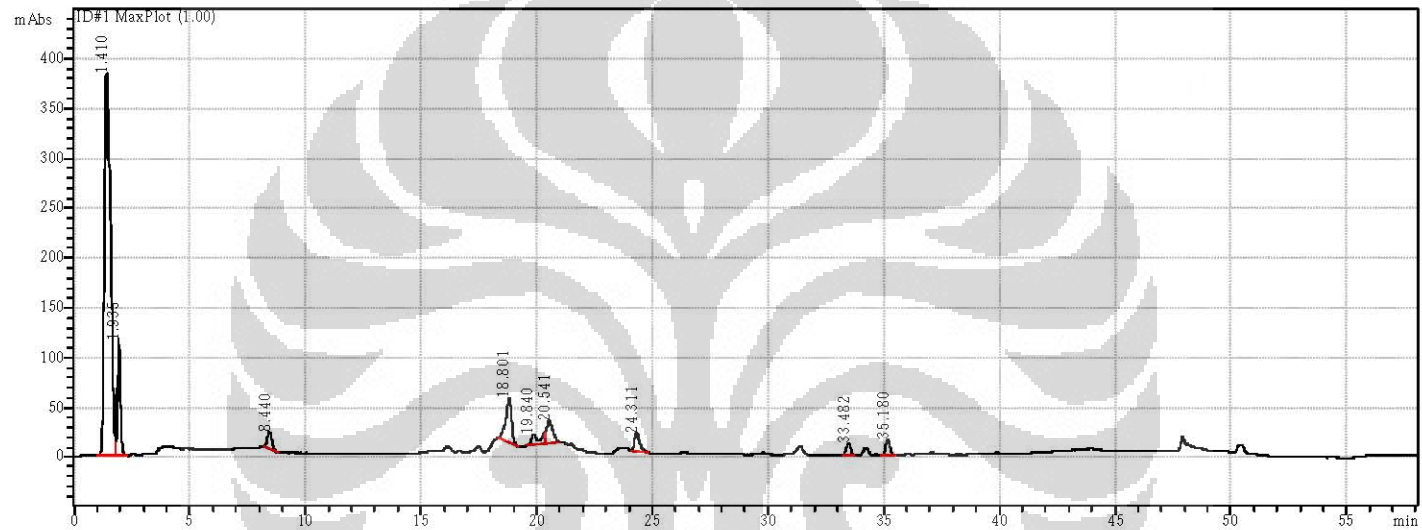
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Location	3.04145	0.0960282	2.85323	3.22966
Scale	1.42858	0.136959	1.18385	1.72389

##### Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	0.754332	0.222666	0.372252	1.23288
2	1.11350	0.289299	0.598991	1.71779
3	1.42559	0.338835	0.809515	2.12144
4	1.71679	0.379830	1.01494	2.48752
5	1.99700	0.415463	1.21952	2.83236
6	2.27125	0.447326	1.42542	3.16418
7	2.54254	0.476354	1.63395	3.48784
8	2.81283	0.503153	1.84600	3.80652
9	3.08353	0.528149	2.06219	4.12248
10	3.35567	0.551654	2.28302	4.43740
20	6.29103	0.743530	4.81401	7.74457
30	9.89767	0.942045	8.07384	11.8155
40	14.5781	1.29202	12.2259	17.4140
50	20.9355	2.01040	17.5217	25.7320
60	30.0653	3.42744	24.5725	38.8571
70	44.2827	6.21546	34.7785	61.2711
80	69.6699	12.2761	51.7034	105.457
90	130.614	30.0786	88.8315	225.889
91	142.141	33.8000	95.5001	250.385
92	155.820	38.3299	103.304	280.041
93	172.385	43.9664	112.613	316.749
94	192.975	51.1806	123.992	363.499
95	219.477	60.7683	138.363	425.348
96	255.300	74.2021	157.366	511.657
97	307.448	94.5916	184.310	642.237
98	393.620	130.061	227.340	869.028
99	581.038	212.966	316.300	1400.37



**Lampiran 4. Kromatogram KCKT Hasil Optimasi Ekstrak Miselium Kapang Laut *Emericella nidulans***  
 Kromatogram HPLC ekstrak miselium *Emerricella nidulans*. Medium SWS minggu ke-1 (39W1SWS)

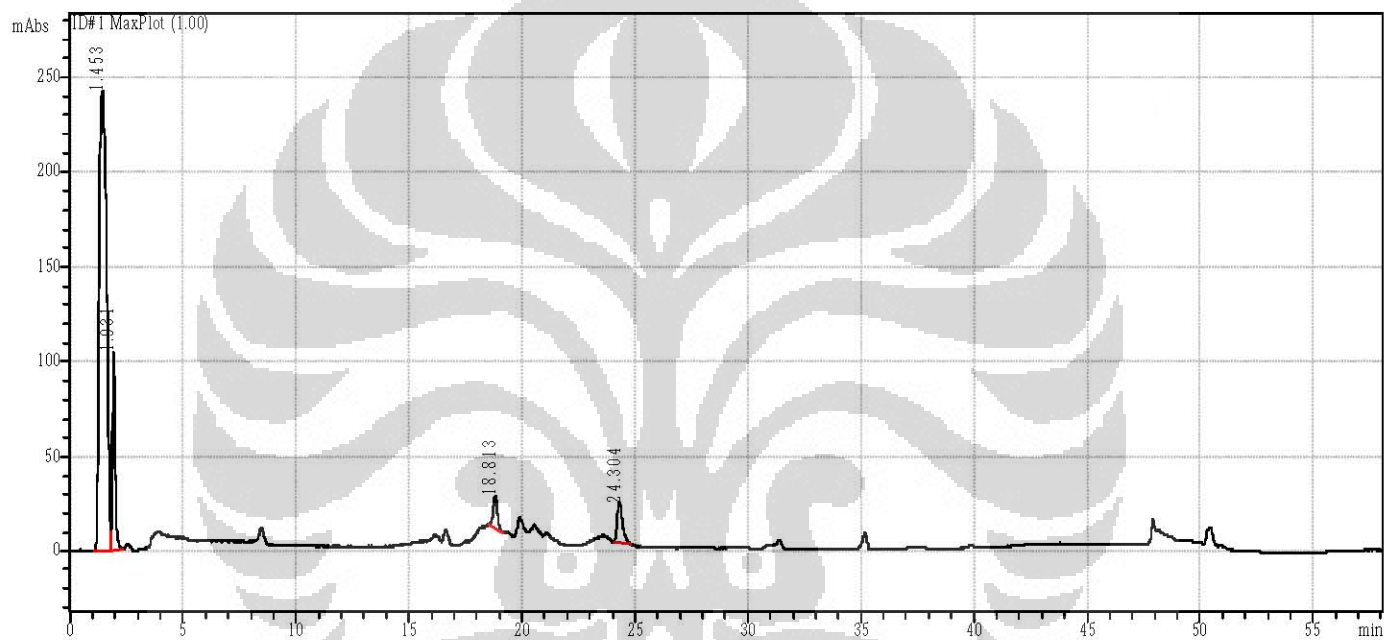


39W1SWS

Peak	Ret. Time	Start time	End Time	Area	Height	Area %	Height %	A/H	Mark
1	1.41	0.992	1.824	7,270,315	380,144	68.97746	59.98849	19.12	
2	1.935	1.824	2.304	955,513	115,403	9.06547	18.21117	8.27	V
3	8.44	8.224	8.832	221,819	16,941	2.10452	2.67338	13.09	
4	18.801	18.368	19.232	749,388	43,842	7.10986	6.91841	17.09	
5	19.84	19.584	20.352	259,237	9,655	2.45952	1.52355	26.85	
6	20.541	20.352	20.992	433,660	22,140	4.11437	3.4938	19.58	V
7	24.311	24.096	24.832	316,256	19,124	3.00049	3.0179	16.53	
8	33.482	33.216	33.728	147,936	11,464	1.40355	1.80907	12.9	
9	35.18	34.88	35.52	186,009	14,982	1.76477	2.36423	12.41	

Lampiran 4. (Lanjutan)

Kromatogram HPLC ekstrak miselium *Emerricella nidulans*. Medium SWS minggu ke-2 (39W2SWS)

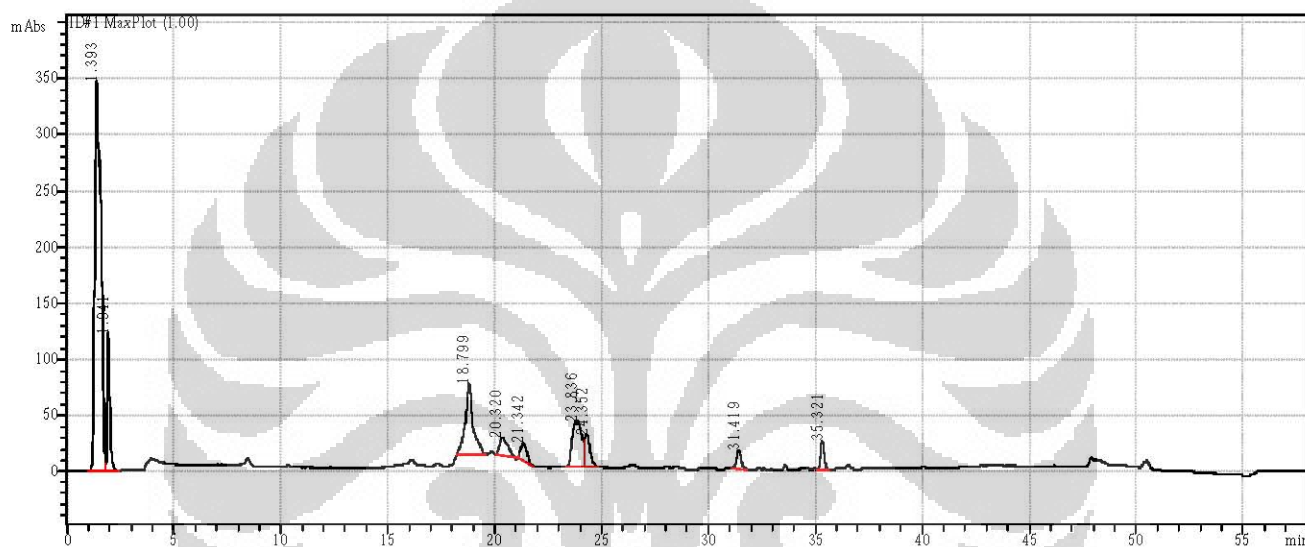


39W2SWS

Peak	Ret. Time	Start time	End Time	Area	Height	Area %	Height %	A/H	Mark
1	1.453	1.088	1.824	5,476,655	242,110	79.75356	63.468	22.62	
2	1.931	1.824	2.336	827,023	102,000	12.04349	26.73873	8.1	V
3	18.813	18.56	19.168	210,235	16,175	3.06154	4.24022	12.99	
4	24.304	24.064	24.832	353,059	21,183	5.14141	5.55306	16.66	

Lampiran 4. (Lanjutan)

Kromatogram HPLC ekstrak miselium *Emerricella nidulans*. Medium SWS minggu ke-3 (39W3SWS)

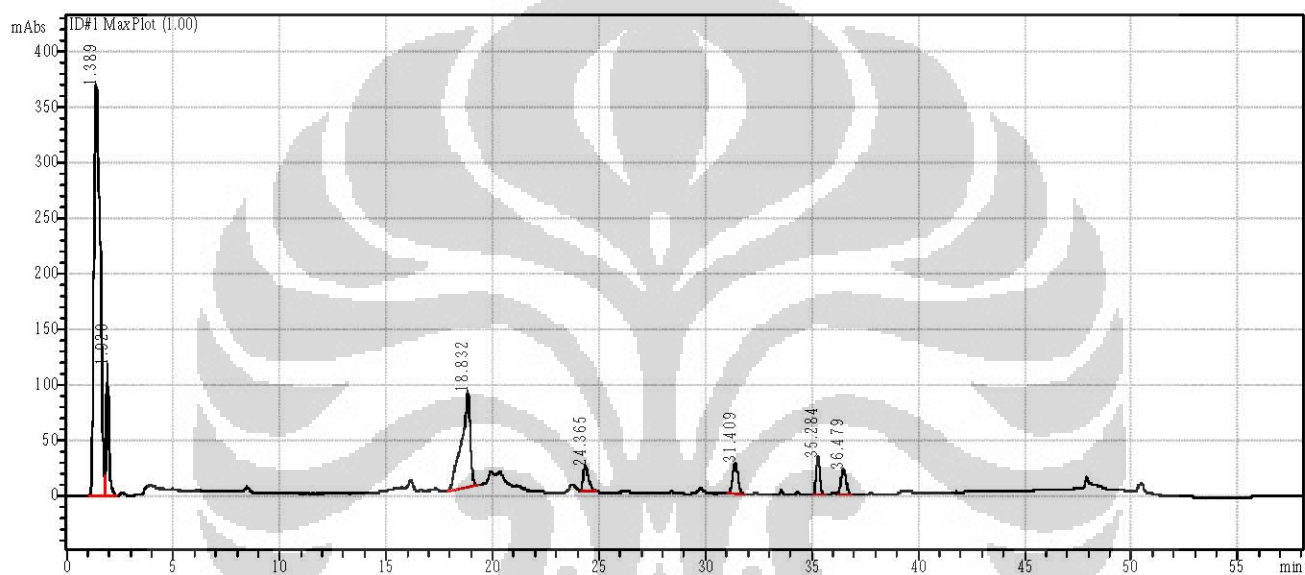


39W3SWS

Peak	Ret. Time	Start time	End Time	Area	Height	Area %	Height %	A/H	Mark
1	1.393	1.024	1.824	6,941,721	346,278	55.17614	51.69034	20.04	
2	1.941	1.824	2.4	1,052,490	122,376	8.3657	18.26749	8.6	V
3	18.8	18.24	19.584	1,633,572	62,798	12.98442	9.37413	26.01	
4	20.32	20.032	21.12	387,638	14,384	3.08113	2.14722	26.94	
5	21.342	21.12	21.824	274,969	14,666	2.18559	2.18922	18.74	
6	23.836	23.36	24.192	1,254,370	40,206	9.97034	6.00169	31.19	
7	24.352	24.192	24.832	503,639	28,339	4.00317	4.23031	17.77	V
8	31.419	31.136	31.808	243,464	16,056	1.93517	2.39676	15.16	
9	35.321	35.104	35.648	289,156	24,806	2.29835	3.70283	11.65	

Lampiran 4. (Lanjutan)

Kromatogram HPLC ekstrak miselium *Emerricella nidulans*. Medium SWS minggu ke-4 (39W4SWS)

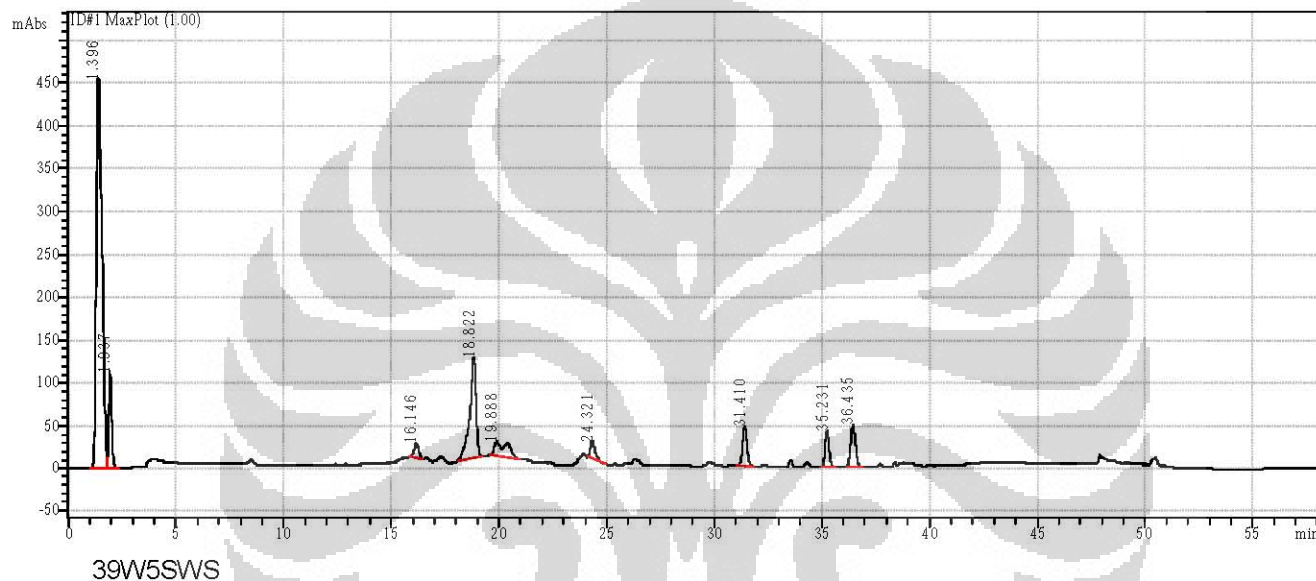


39W4SWS

Peak	Ret. Time	Start time	End Time	Area	Height	Area %	Height %	A/H	Mark
1	1.389	1.056	1.824	7,275,847	369,261	58.74342	54.75917	19.7	
2	1.92	1.824	2.368	1,048,576	113,888	8.46595	16.88898	9.2	V
3	18.832	17.92	19.296	2,439,326	85,556	19.69453	12.68748	28.51	
4	24.365	24.128	24.896	391,570	22,469	3.16144	3.332	17.42	
5	31.409	31.072	31.84	456,501	27,291	3.68568	4.04714	16.72	
6	35.284	35.072	35.648	414,879	33,199	3.34963	4.92322	12.49	
7	36.479	36.224	36.864	359,108	22,671	2.89935	3.36201	15.83	

Lampiran 4. (Lanjutan)

Kromatogram HPLC ekstrak miselium *Emerricella nidulans*. Medium SWS minggu ke-5 (39W5SWS)

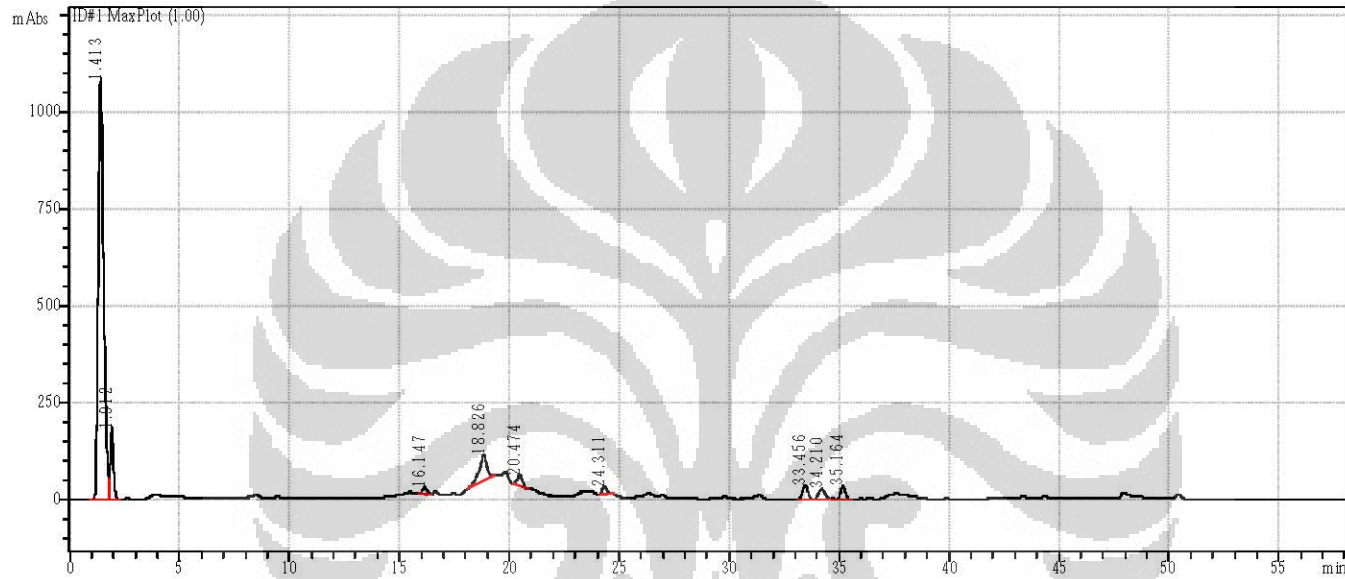


Peak	Ret. Time	Start time	End Time	Area	Height	Area %	Height %	A/H	Mark
1	1.396	1.024	1.824	8,266,085	453,487	55.17753	51.96818	18.22	
2	1.937	1.824	2.336	976,438	112,779	6.51789	12.92416	8.65	V
3	16.146	15.872	16.48	261,959	16,973	1.74862	1.94508	15.43	
4	18.822	18.08	19.2	2,437,981	116,933	16.27394	13.40013	20.84	
5	19.888	19.584	20.96	741,709	17,012	4.95103	1.94957	43.59	
6	24.321	24.128	24.928	334,647	20,331	2.23382	2.32981	16.46	
7	31.41	31.072	31.84	679,736	45,779	4.53735	5.24617	14.84	
8	35.231	35.04	35.616	507,260	40,521	3.38605	4.64361	12.51	
9	36.435	36.16	36.864	775,075	48,808	5.17376	5.59327	15.87	



Lampiran 4. (Lanjutan)

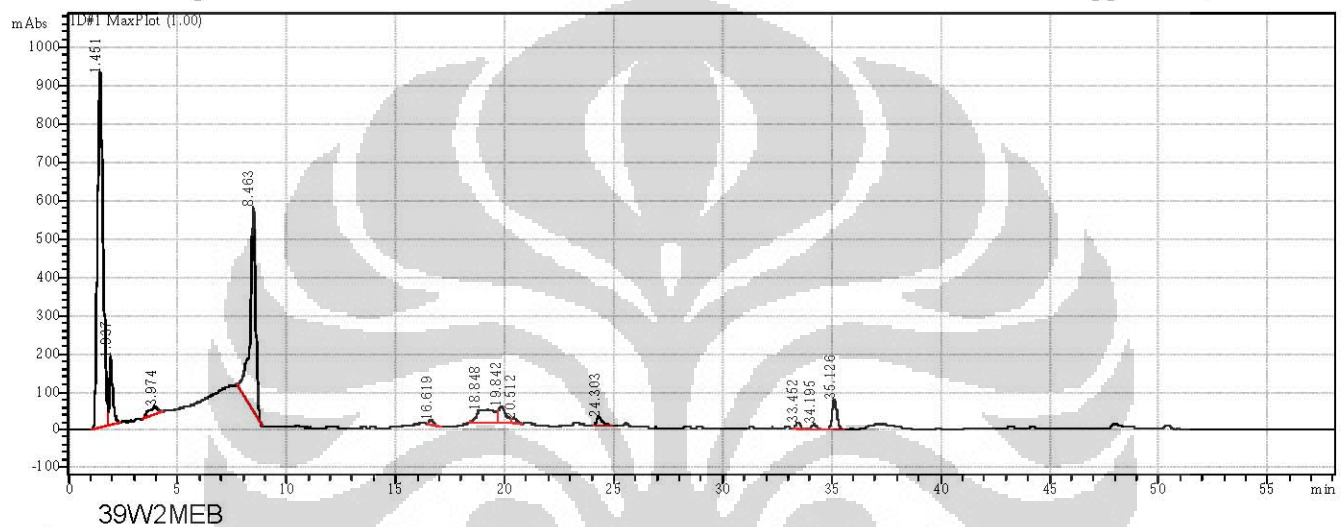
Kromatogram HPLC ekstrak miselium *Emerricella nidulans*. Medium MEB minggu ke-1 (39W1MEB)



Peak	Ret. Time	Start time	End Time	Area	Height	Area %	Height %	A/H	Mark
1	1.413	0.96	1.792	18,960,107	1,079,070	75.27492	72.2685	17.57	
2	1.912	1.792	2.304	1,945,449	185,562	7.72377	12.42763	10.48	V
3	16.147	15.904	16.48	233,271	16,210	0.92613	1.0856	14.39	
4	18.826	18.112	19.328	1,662,675	66,765	6.60111	4.47143	24.9	
5	20.474	20.192	20.864	410,453	27,454	1.62957	1.83868	14.95	
6	24.311	24.096	24.736	331,532	21,553	1.31624	1.4435	15.38	
7	33.456	33.152	33.792	597,029	35,659	2.37031	2.38817	16.74	
8	34.21	33.792	34.592	520,323	26,428	2.06577	1.76994	19.68	
9	35.164	34.592	35.552	526,976	34,440	2.09219	2.30655	15.3	V

Lampiran 4. (Lanjutan)

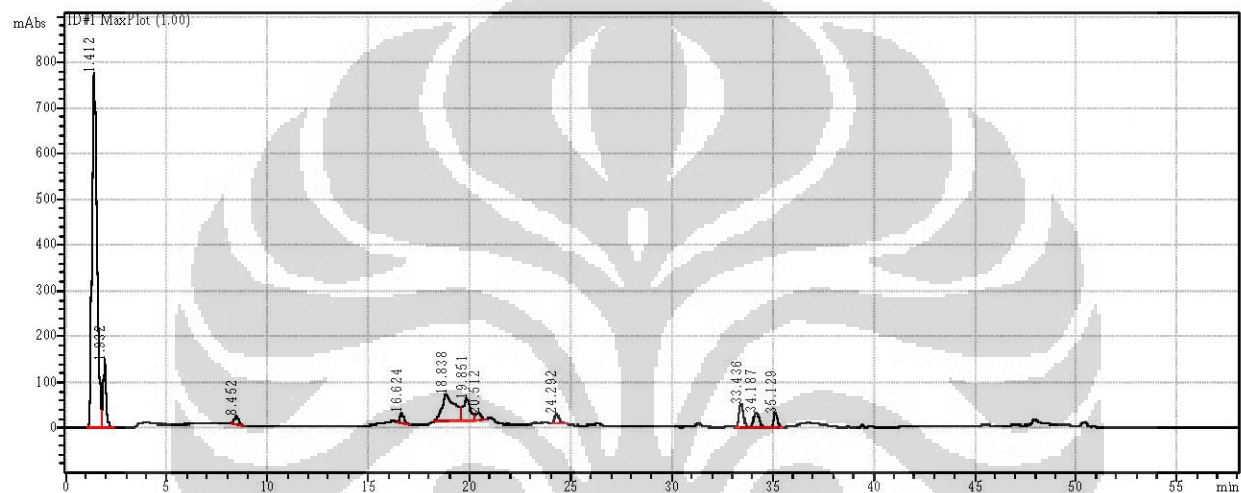
Kromatogram HPLC ekstrak miselium *Emerricella nidulans*. Medium MEB minggu ke-2(39W2MEB)



Peak	Ret. Time	Start time	End Time	Area	Height	Area %	Height %	A/H	Mark
1	1.451	1.056	1.824	16,964,944	923,847	48.94012	49.13742	18.36	
2	1.937	1.824	2.336	1,829,551	174,912	5.27785	9.30321	10.45	V
3	3.974	3.392	4.32	616,830	19,912	1.77942	1.05906	30.97	
4	8.463	7.712	8.864	9,820,711	532,158	28.33059	28.30435	18.45	
5	16.619	16.448	17.056	170,007	13,220	0.49043	0.70313	12.86	
6	18.848	18.432	19.712	1,983,157	31,477	5.72097	1.67421	63	
7	19.842	19.712	20.32	997,684	43,177	2.8781	2.2965	23.1	V
8	20.512	20.32	20.8	222,366	12,212	0.64148	0.64952	18.2	V
9	24.303	24.064	24.96	471,854	23,829	1.36119	1.26741	19.8	
10	33.452	33.216	33.76	259,177	17,406	0.74767	0.92577	14.89	
11	34.195	33.76	34.56	186,807	11,493	0.5389	0.6113	16.25	V
12	35.126	34.56	35.552	1,141,605	76,486	3.29328	4.06812	14.92	

Lampiran 4. (Lanjutan)

Kromatogram HPLC ekstrak miselium *Emerricella nidulans*. Medium MEB minggu ke-3 (39W3MEB)

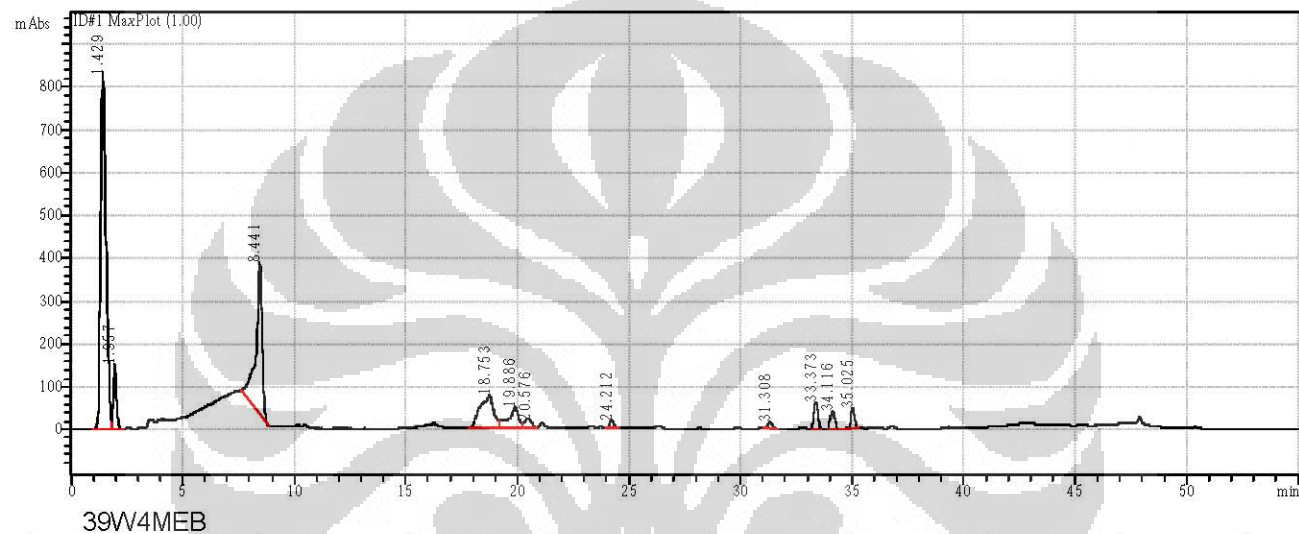


39W3MEB

Peak	Ret. Time	Start time	End Time	Area	Height	Area %	Height %	A/H	Mark
1	1.412	1.056	1.824	13,254,986	768,605	61.97673	63.69501	17.24	
2	1.932	1.824	2.4	1,444,857	146,581	6.75576	12.1473	9.85	V
3	8.452	8.192	8.864	245,499	17,998	1.14788	1.49149	13.64	
4	16.624	16.416	17.088	294,196	21,462	1.37558	1.77861	13.7	
5	18.838	18.24	19.552	2,495,467	56,749	11.66813	4.70282	43.97	
6	19.851	19.552	20.256	1,254,187	48,255	5.86424	3.99892	25.99	V
7	20.512	20.256	20.832	301,576	14,615	1.41009	1.21118	20.63	V
8	24.292	24.064	24.8	352,346	21,158	1.64748	1.75337	16.65	
9	33.436	33.184	33.792	745,706	48,589	3.48672	4.0266	15.34	
10	34.187	33.792	34.624	599,536	32,637	2.80327	2.70465	18.36	
11	35.129	34.656	35.52	398,681	30,047	1.86412	2.49004	13.26	

Lampiran 4. (Lanjutan)

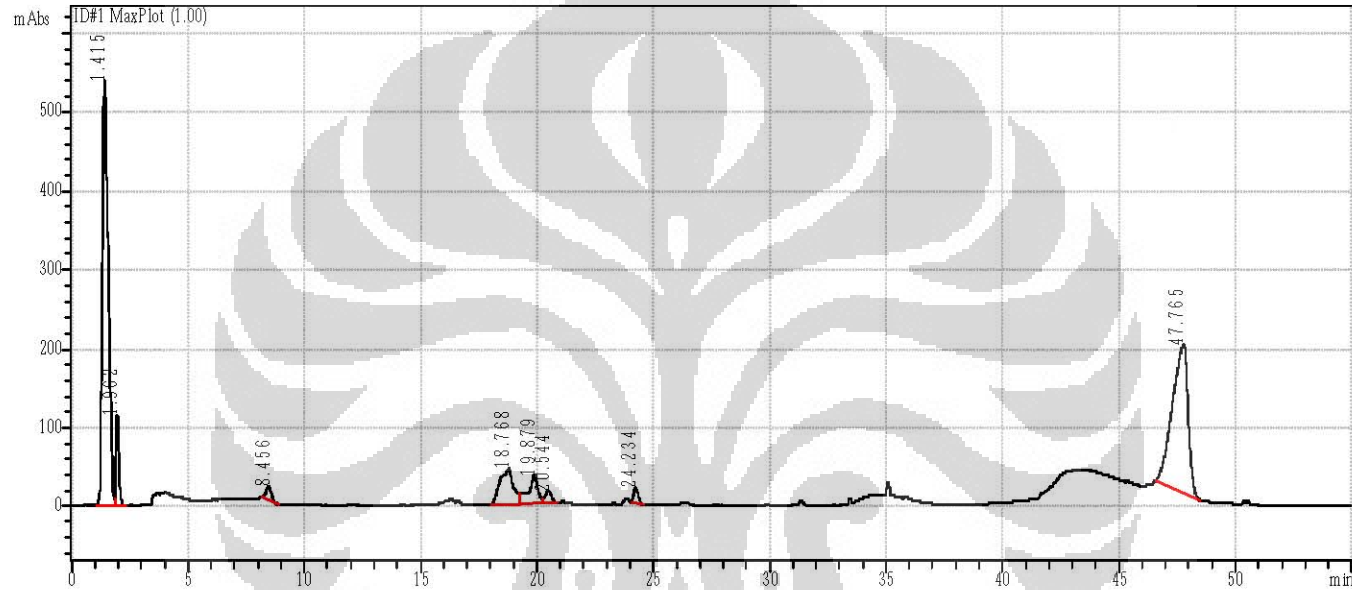
Kromatogram HPLC ekstrak miselium *Emerricella nidulans*. Medium MEB minggu ke-4 (39W4MEB)



Peak	Ret. Time	Start time	End Time	Area	Height	Area %	Height %	A/H	Mark
1	1.429	0.96	1.824	14,246,347	826,392	47.16085	50.13466	17.23	
2	1.957	1.824	2.336	1,450,087	147,131	4.80034	8.92601	9.85	V
3	8.441	7.648	8.832	6,943,374	349,906	22.98522	21.22772	19.84	
4	18.753	17.824	19.2	3,224,292	76,055	10.67364	4.61405	42.39	
5	19.886	19.2	20.256	1,531,876	47,964	5.07109	2.90981	31.93	V
6	20.576	20.256	20.896	412,632	18,328	1.36597	1.11192	22.51	V
7	24.212	24	24.576	236,929	18,238	0.78433	1.10647	12.99	
8	31.308	31.008	31.68	218,394	14,539	0.72297	0.88202	15.02	
9	33.373	33.184	33.632	808,545	63,026	2.67659	3.82358	12.82	
10	34.116	33.92	34.496	591,606	39,363	1.95844	2.38806	15.02	
11	35.025	34.592	35.296	543,910	47,402	1.80055	2.8757	11.47	

Lampiran 4. (Lanjutan)

Kromatogram HPLC ekstrak miselium *Emerricella nidulans*. Medium MEB minggu ke-5 (39W5MEB)

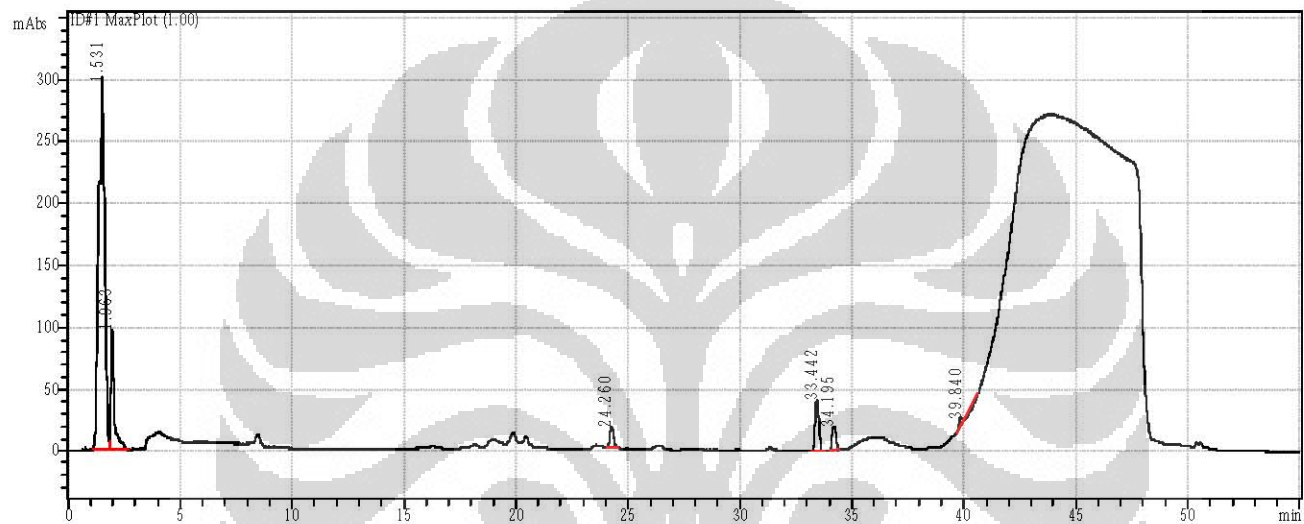


39W5MEB

Peak	Ret. Time	Start time	End Time	Area	Height	Area %	Height %	A/H	Mark
1	1.415	1.056	1.856	9,571,324	534,256	41.75506	55.36996	17.91	
2	1.962	1.856	2.336	967,129	112,632	4.21912	11.67309	8.58	V
3	8.456	8.192	8.864	239,668	17,506	1.04556	1.81432	13.69	
4	18.768	18.016	19.264	1,752,134	44,500	7.64371	4.61195	39.37	
5	19.879	19.264	20.256	1,025,629	36,525	4.47433	3.78541	28.08	V
6	20.544	20.256	20.896	290,255	14,736	1.26624	1.52725	19.69	V
7	24.234	24.032	24.608	234,189	18,022	1.02165	1.86776	12.99	
8	47.765	46.56	48.512	8,842,219	186,707	38.57433	19.35026	47.35	

Lampiran 4. (Lanjutan)

Kromatogram HPLC ekstrak miselium *Emerricella nidulans*. Medium MFM minggu ke-4 (39W4MFM)

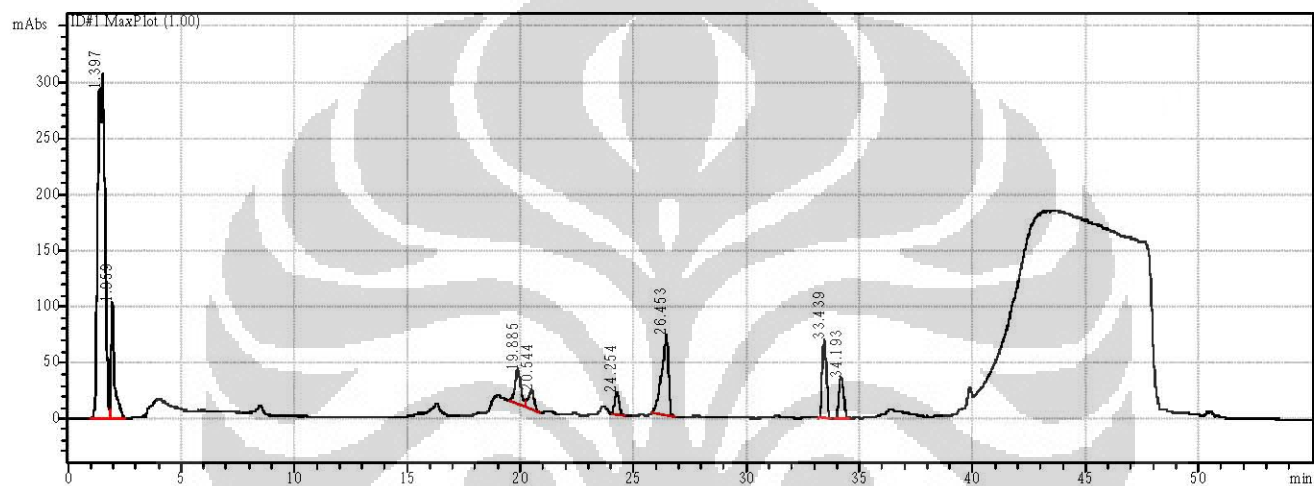


39W4MFM

Peak	Ret. Time	Start time	End Time	Area	Height	Area %	Height %	A/H	Mark
1	1.531	1.12	1.856	5,587,768	288,006	74.79056	62.01432	19.4	
2	1.963	1.856	2.688	933,014	94,345	12.4881	20.31457	9.88	V
3	24.26	24.064	24.608	208,206	16,558	2.78677	3.56528	12.57	
4	33.442	33.216	33.76	490,739	40,435	6.56839	8.7065	12.13	
5	34.195	34.016	34.4	241,755	19,323	3.23581	4.1607	12.51	
6	39.84	39.68	40.64	9,740	5,752	0.13036	1.23863	1.69	

Lampiran 4. (Lanjutan)

Kromatogram HPLC ekstrak miselium *Emerricella nidulans*. Medium MFM minggu ke-5 (39W5MFM)



39W5MFM

Peak	Ret. Time	Start time	End Time	Area	Height	Area %	Height %	A/H	Mark
1	1.397	1.024	1.856	6,524,919	292,309	55.70752	46.02262	22.32	
2	1.959	1.856	2.528	1,100,570	100,998	9.39629	15.9016	10.89	V
3	19.885	19.552	20.224	550,401	30,493	4.69914	4.80094	18.05	
4	20.544	20.224	20.896	295,398	16,406	2.52201	2.58307	18	V
5	24.254	24.032	24.64	255,085	18,785	2.17783	2.95754	13.57	
6	26.453	25.824	26.848	1,531,584	71,107	13.07614	11.19552	21.53	
7	33.439	33.216	33.696	924,784	69,046	7.89549	10.87091	13.39	
8	34.193	33.92	34.56	530,074	35,999	4.52559	5.66779	14.72	