

## ISOLASI SENYAWA SITOTOKSIK DARI KAPANG *Emericella nidulans*

Muhammad Nursid<sup>1)</sup>, Ekowati Chasanah<sup>2)</sup>, Murwantoko<sup>3)</sup>, dan Subagus Wahyuono<sup>4)</sup>

### ABSTRAK

Kapang laut dikenal sebagai sumber penting metabolit farmakologi aktif. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa sitotoksik dari kapang laut *Emericella nidulans* yang diisolasi dari ascidia *Aplidium longithorax* dari Taman Nasional Laut Wakatobi, Sulawesi Tenggara. Kapang dikultivasi pada labu 3 L sebanyak 20 labu, masing-masing mengandung 1 L media SWS (mengandung 1% pati dapat larut, 0,2% pepton soya, dan 1 L air laut) dan diinkubasi dalam kondisi statis pada suhu 27–28°C selama 5 minggu. Miselium kapang diekstraksi dengan campuran pelarut diklorometan–metanol (1 : 1 v/v) sebanyak 3 kali. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan kolom vakum SiO<sub>2</sub> 2 x 12 cm dan isolasi dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif. Uji sitotoksik dengan metode MTT (3-(4,4-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) terhadap pertumbuhan sel T47D, digunakan sebagai panduan dalam proses isolasi. Senyawa sitotoksik berhasil diisolasi dari ekstrak miselium, terelusi pada menit ke-15 pada kromatogram kromatografi cair kinerja tinggi. Senyawa ini memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 6,3 µg/mL.

**KATA KUNCI:** isolat, komponen sitotoksik, kapang, *Emericella nidulans*

**ABSTRACT:** *Isolation of cytotoxic compound from fungus Emericella nidulans. By: Muhammad Nursid, Ekowati Chasanah, Murwantoko and Subagus Wahyuono*

Marine-derived fungi are recognized as important sources of pharmacologically active metabolites. This research was aimed to isolate cytotoxic compound from marine fungi *Emericella nidulans*. The fungal strain was obtained from ascidian *Aplidium longithorax* collected from Wakatobi Marine National Park, South East Sulawesi. The fungal strain was cultivated in flask (3 L) for 20 flasks, each contain 1 L of SWS medium (containing soluble starch 1%, soya peptone 0.2% and 1 L sea water), incubated in static condition at 27–28°C for 5 weeks. Mycelium was extracted three times with mixture of dichloromethane–methanol (1 : 1 v/v). Fractination was performed by using 2 x 12 cm SiO<sub>2</sub> vacuum column chromatography and purification was done by preparative thin layer chromatography. Cytotoxic test using MTT (3-(4,4-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) method against T47D cell was used to guide the isolation process. The result of study showed that the cytotoxic compound was isolated successfully from mycelium extract. This compound eluted at minute 15 on the high performance liquid chromatography chromatogram. The compound performed cytotoxic activity on the growth of T47D cell with IC<sub>50</sub> at 6.3 µg/mL.

**KEYWORDS:** *isolation, cytotoxic compound, fungi, Emericella nidulans*

### PENDAHULUAN

Mikroorganisme laut merupakan sumber senyawa metabolit sekunder aktif yang sangat penting. Salah satu mikroorganisme yang potensial sebagai sumber senyawa aktif adalah kapang yang berasal dari lingkungan laut (*marine-derived fungi*) (Holler *et al.*, 2000). Senyawa metabolit sekunder dari kapang memiliki bioaktivitas yang beragam (Holler *et al.*, 2000, Kralj *et al.*, 2006). Antara tahun 2002–2006, lebih dari 330 senyawa baru (*novel compound*) berhasil ditemukan dari kapang laut (Kjer *et al.*, 2010). Senyawa bioaktif ini termasuk dalam golongan

poliketida, alkaloid, terpen, steroid, dan peptida (Bugni & Ireland, 2004; Saleem *et al.*, 2007). Beberapa metabolit dari kapang seperti fumagilin dan illudin S sedang dalam tahap uji klinis sebagai senyawa antitumor (Kralj *et al.*, 2006). Banyak ulasan yang sudah dipublikasikan menunjukkan pentingnya mikroorganisme laut sebagai sumber senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai penuntun penemuan senyawa-senyawa bioaktif baru (Bugni & Ireland, 2004).

Karena mikroorganisme laut mampu bertahan di bawah kondisi lingkungan yang ekstrim maka diperkirakan bahwa mikroorganisme tersebut memiliki

<sup>1)</sup> Peneliti pada Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Balitbang KP, KKP; Jl. KS. Tubun Petamburan VI, Slipi, Jakarta Pusat; E-mail: muhammadnursid@gmail.com

<sup>2)</sup> Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada; Jl. Flora Bulaksumur Gedung A-4, Jogyakarta

<sup>3)</sup> Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada; Sekip Utara, Jogyakarta

kemampuan untuk mensintesis senyawa kimia tertentu untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungan yang ekstrim tersebut. Kondisi lingkungan yang ekstrim ini misalnya salinitas yang tinggi, tekanan tinggi, variasi suhu, kompetisi dengan bakteri, virus dan kapang lain, barangkali menyebabkan kapang laut mampu mengembangkan senyawa metabolit spesifik yang berbeda dengan kapang terestrial (Liberra & Lindequist, 1995 dalam Mabrouk *et al.*, 2008).

Dalam kegiatan pencarian senyawa bioaktif dari mikroba laut, telah dilakukan skrining aktivitas sitotoksik terhadap 46 isolat kapang laut yang diisolasi dari beberapa wilayah perairan di Indonesia (Nursid *et al.*, 2011). Hasil penelitian tersebut memperlihatkan bahwa kapang dengan kode isolat MFW39 yang diisolasi dari ascidia *Aplidium longithorax* yang diambil dari perairan Taman Nasional Laut Wakatobi, Sulawesi Tenggara, menunjukkan aktivitas sitotoksik yang menjanjikan. Hasil penelitian tersebut memperlihatkan bahwa ekstrak miselium memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih kuat terhadap sel T47D ( $IC_{50}$  21,9  $\mu\text{g/mL}$ ) dibanding dengan ekstrak broth ( $IC_{50}$  169,3  $\mu\text{g/mL}$ ). Berdasarkan sekuens gen ITS1-5.8S-ITS2, kapang MFW39 diidentifikasi sebagai kapang *Emericella nidulans* (Nursid *et al.*, 2011). Isolasi senyawa sitotoksik yang terdapat dalam ekstrak miselium kapang ini belum dilakukan. Berdasarkan hasil penelitian ini maka penelitian ditujukan untuk mengisolasi senyawa sitotoksik yang terdapat pada ekstrak miselium kapang *Emericella nidulans*.

## BAHAN DAN METODE

### Kultivasi Kapang *Emericella nidulans* dalam Media Padat

Biakan beku dari spora *Emericella nidulans* diambil dari freezer bersuhu  $-73^{\circ}\text{C}$  lalu didiamkan beberapa saat dalam suhu kamar hingga media dan gliserol yang ada dalam tabung mencair. Secara aseptis, spora yang terdapat dalam biakan dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi media MEA yang mengandung 0,3% ekstrak malt, 0,3% ekstrak yeast, 0,5% pepton, dan 1,5% agar dengan menggunakan jarum ose. Cawan petri dibungkus dengan kertas parafilm kemudian diinkubasikan selama 3–7 hari pada suhu  $27\text{--}28^{\circ}\text{C}$  hingga biakan spora tumbuh dengan baik dan membentuk koloni tunggal.

### Kultivasi Fungi *Emericella nidulans* dalam Media Cair

Kultivasi kapang dalam media cair SWS yang mengandung soluble starch 1%, soya peptone 0,2%, dan air laut alami dengan salinitas 32 ‰ dilakukan

dalam 20 labu bervolume 3 L masing-masing berisi 1 L media SWS. Spora *Emericella nidulans* yang berasal dari koloni yang terdapat dalam cawan petri diambil dengan jarum ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang mengandung media cair *malt extract broth* (MEB) 10 mL. Komposisi media MEB sama dengan dengan media MEA tetapi media MEB tidak mengandung agar. Biakan diinkubasikan selama 2–3 hari, lalu dipindahkan ke dalam labu yang berisi media SWS 0,5 L (biakan dalam labu ini digunakan sebagai starter). Starter yang berumur 2 hari selanjutnya dipindahkan ke dalam labu baru yang berisi media SWS 1 L sebanyak 20 labu. Inkubasi dilakukan selama 5 minggu pada suhu  $27\text{--}28^{\circ}\text{C}$  dalam kondisi statis.

### Ekstraksi Metabolit

Ekstraksi terhadap metabolit yang terdapat dalam miselium dilakukan mengikuti metode Xifeng *et al.* (2006). Miselium diekstraksi dengan campuran diklorometan (DCM) : metanol (MeOH) = 1 : 1. Miselium kapang (200 g) ditempatkan dalam kain kasa bersih lalu pelan-pelan sisa *broth* yang masih terdapat dalam miselium diperas, miselium selanjutnya dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambah campuran DCM : MeOH = 1 : 1 sebanyak 300 mL, disonikasi selama 2 jam, lalu disaring dengan kertas saring whatman nomor 42. Proses ekstraksi diulang sebanyak 3 kali. Pelarut yang terdapat dalam ekstrak miselium selanjutnya dievaporasi dengan Buchi evaporator hingga diperoleh ekstrak pekat miselium. Sisa pelarut yang masih terdapat pada ekstrak diuapkan dengan bantuan gas nitrogen.

### Fraksinasi dan Isolasi

Fraksinasi dan isolasi senyawa sitotoksik secara garis besar dilakukan sesuai dengan metode Kjer *et al.* (2010) dengan beberapa modifikasi. Fraksinasi terhadap ekstrak kasar miselium dilakukan dengan kolom vakum  $\text{SiO}_2$  2 x 12 cm. Ekstrak kering dilarutkan dalam campuran n-heksana : etil asetat = 1 : 1 lalu dimasukkan dalam gelas beker yang mengandung sekitar 1 g serbuk  $\text{SiO}_2$ . Pelarut dalam gelas beker diuapkan dengan bantuan gas nitrogen. Campuran ekstrak dan  $\text{SiO}_2$  dimasukkan ke dalam kolom, dielus 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 penampak bercak asam fosfomolibdat (PMA).

Fraksi aktif selanjutnya difraksinasi kembali dengan kolom vakum  $\text{SiO}_2$  2 x 12 cm. Pelarut 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) dan etil asetat : metanol = 8 : 1 (100 mL). Hasil fraksinasi dilihat pola pemisahannya dengan KLT yang dikembangkan dengan n-heksana : etil asetat = 1 : 2. Hasil KLT diamati dengan UV 254 nm dan penampak bercak PMA.

Isolasi senyawa sitotoksik yang terdapat pada fraksi yang paling aktif dilakukan dengan KLT preparatif. KLT dilakukan dengan plat kaca (10 x 20 cm) yang mengandung matriks SiO<sub>2</sub>. Eluen yang digunakan adalah n-heksana : etil asetat = 1 : 1. Bercak-bercak yang menjadi target isolasi lalu diamati di bawah lampu UV 254 nm, kemudian dikerok dan dimasukkan ke dalam gelas beker yang sudah berisi pelarut etil asetat 20 mL. Campuran etil asetat dan SiO<sub>2</sub> yang terdapat dalam gelas beker kemudian digoyang-goyang untuk melarutkan senyawa sitotoksik yang terdapat di dalamnya, kemudian disaring dengan kertas whatman. Cara ini dilakukan berulang-ulang hingga semua senyawa yang masih mengandung SiO<sub>2</sub> larut dalam etil asetat. Pelarut etil asetat dievaporasi dengan Buchi evaporator, etil asetat yang masih tersisa kemudian dikeringkan dengan bantuan gas nitrogen. Hasil isolasi kemudian dilihat kemurniannya dengan KLT dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). KCKT dalam penelitian ini menggunakan instrumen LC-MS Shimadzu, kolom ODS 20 x 150 mm, detektor photo diode array (PDA), sistem elusi H<sub>2</sub>O 20% – asetonitril 90% secara gradien.

### Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT menggunakan sel lestari T47D. Sel tersebut dikultur

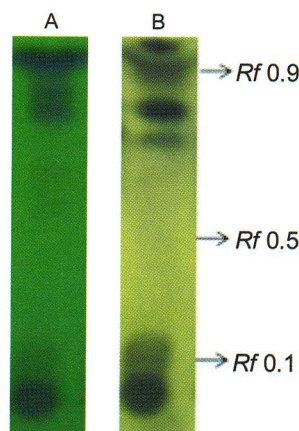
dalam medium *Roswell Park Memorial Institut* 1640 (RPMI) (Sigma), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% (Gibco), fungison 0,5% (Gibco) dan penisilin-streptomisin 2% (Gibco). Sel ditumbuhkan dalam inkubator dengan aliran CO<sub>2</sub> sebesar 5 mL/menit pada suhu 37°C. Jumlah sel yang digunakan dalam uji sebesar 20,000 sel/sumuran. Secara umum uji sitotoksik yang digunakan dalam penelitian dilakukan menurut Freshney (2005). Persentase kematian sel tumor dihitung berdasarkan rumus  $\frac{[(A-D)-(B-C)]}{(A-D)} \times 100\%$  dimana A = absorbansi kontrol sel, B = absorbansi sampel, C = absorbansi kontrol sampel dan D = absorbansi kontrol media. Nilai IC<sub>50</sub> ditentukan dengan menggunakan analisis probit dengan bantuan program statistik MINITAB 14.0.

## HASIL DAN BAHASAN

### Fraksinasi Ekstrak Miselium

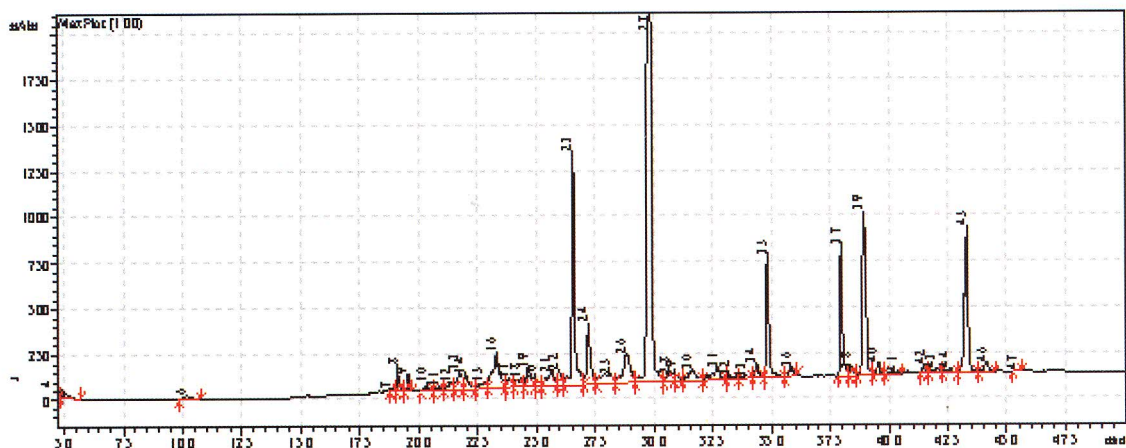
Jumlah ekstrak kasar miselium yang diperoleh dari kultivasi 1 L x 20 sebanyak 37,03 g. Ekstrak miselium masih banyak mengandung garam-garam yang berasal dari media kultur sehingga dari 37 g tersebut sekitar 40–60% berupa garam. Ekstraksi metabolit dari miselium kapang dilakukan dengan campuran diklorometan : metanol = 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. Proses ekstraksi metabolit dari miselium dilakukan dengan sonikasi selama 2 jam untuk memecah dinding sel dari miselium sehingga proses ekstraksi berjalan dengan lebih sempurna.

Profil metabolit yang terdapat dalam ekstrak miselium dilihat dengan KLT (Gambar 1) dan KCKT



Gambar 1. Kromatogram KLT ekstrak miselium dibawah UV 254 nm (A) dan divisualisasikan dengan PMA (B).

Figure 1. TLC chromatogram of mycelium extract under 254 nm UV (A) and visualized with PMA (B).

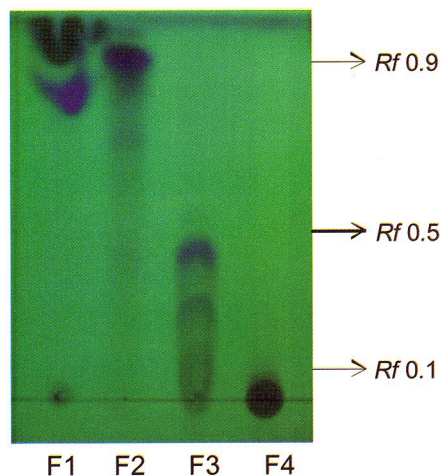


Gambar 2. Kromatogram KCKT ekstrak miselium.  
 Figure 2. HPLC chromatogram of mycelium extract.

(Gambar 2). Kromatogram KLT memperlihatkan bahwa bercak-bercak yang dihasilkan terdapat pada nilai *R<sub>f</sub>* yang rendah (0,1) dan pada nilai nilai *R<sub>f</sub>* yang tinggi (0,7–0,8). Kromatogram KCKT memperlihatkan adanya 7 puncak utama yaitu puncak nomor 23, 24, 27, 35, 37, 39, dan 45 yang terelusi pada menit ke-27 sampai 43. Secara keseluruhan, jumlah puncak yang terdapat pada ekstrak miselium berjumlah sekitar 47 puncak, hal ini berarti bahwa sekitar 47 jenis senyawa terkandung dalam ekstrak miselium.

Tahap berikutnya adalah melakukan fraksinasi untuk memisahkan ke-47 jenis senyawa yang terdapat pada ekstrak miselium tersebut. Fraksinasi terhadap ekstrak kasar *Emericella nidulans* mula-mula dilakukan dengan kolom vakum SiO<sub>2</sub> dengan ukuran kolom 2 x 12 cm. Elusi pertama dilakukan dengan campuran pelarut n-heksana : etil asetat = 8 : 1 (150 mL), elusi kedua kemudian ditingkatkan polaritasnya

dengan perbandingan pelarut n-heksana : etil asetat = 1 : 1 (150 mL). Kedua sistem pelarut ini diharapkan dapat mengelusi senyawa-senyawa yang bersifat non polar termasuk asam-asam lemak yang banyak terdapat dalam metabolit kapang. Elusi ketiga dilakukan dengan pelarut yang bersifat semipolar yaitu etil asetat (150 mL), fraksi F3 yang dihasilkan diharapkan berisi senyawa-senyawa dengan tingkat polaritas pertengahan (semipolar). Elusi terakhir (F4) dilakukan dengan pelarut polar metanol, pelarut ini digunakan karena mampu mengelusi hampir semua senyawa-senyawa yang masih tertahan dalam matriks SiO<sub>2</sub>. Secara umum fraksi F4 berisi senyawa-senyawa yang bersifat polar. Garam-garam yang terdapat dalam ekstrak miselium sebagian besar tertahan di dalam kolom sehingga fraksi-fraksi yang dihasilkan relatif sudah bebas dari garam. Dari fraksinasi ekstrak miselium ini dihasilkan 4 buah fraksi yaitu fraksi F1, F2, F3, dan F4 (Gambar 3).



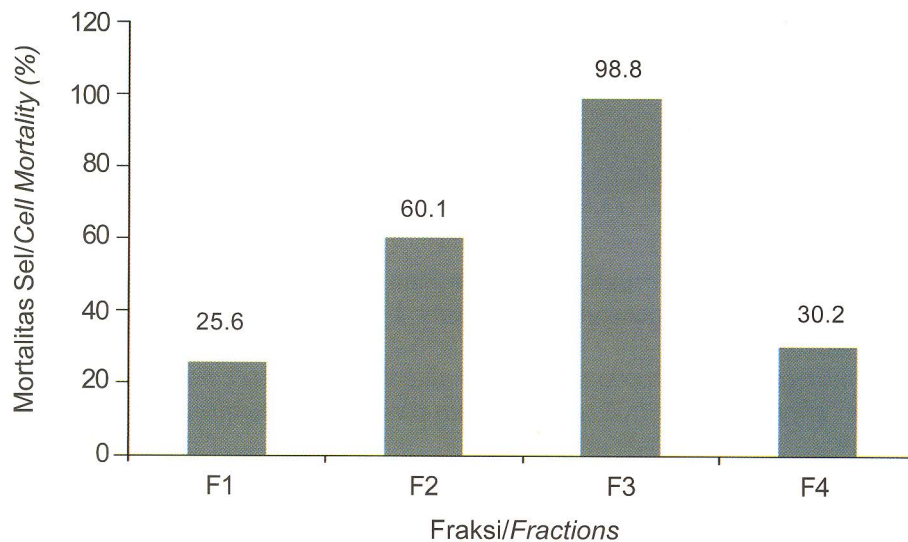
Gambar 3. Kromatogram KLT F1, F2, F3, dan F4 dikembangkan dengan n-heksana : etil asetat = 1 : 1.  
 Figure 3. TLC chromatogram of F1, F2, F3 and F4 developed with n-hexane : ethyl acetate = 1 : 1.

Berdasarkan Gambar 4 terlihat bahwa pemisahan metabolit yang terdapat dalam ekstrak kasar miselium berjalan dengan baik. Bercak-bercak yang terdapat dalam masing-masing fraksi memiliki nilai *R<sub>f</sub>* yang berbeda. Fraksi F1 didominasi oleh senyawa-senyawa non polar dengan nilai *R<sub>f</sub>* sekitar 0,8–0,9, fraksi F2 didominasi oleh senyawa-senyawa non polar dan sedikit senyawa-senyawa semi polar, fraksi F3 didominasi oleh senyawa-senyawa semi polar dengan nilai *R<sub>f</sub>* sekitar 0,1–0,4 dan terakhir fraksi F4 yang hanya memiliki 1 bercak dengan nilai *R<sub>f</sub>* sekitar 0,0–0,1.

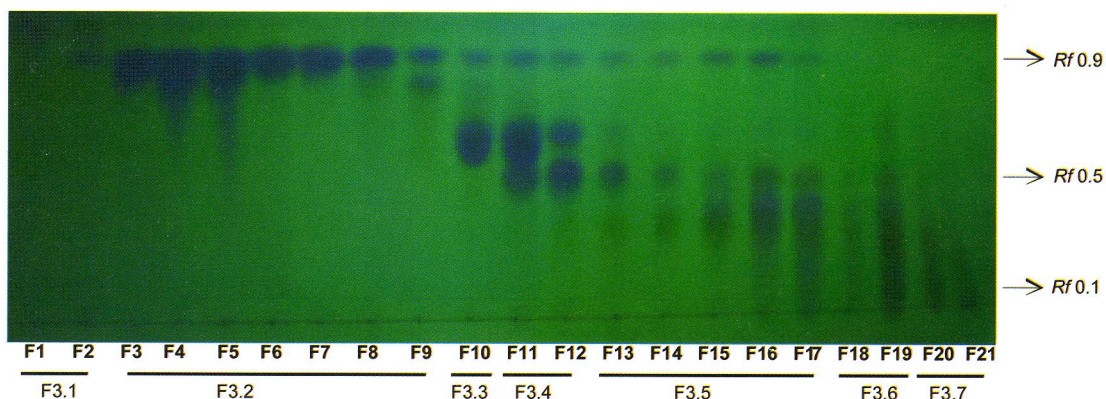
Uji sitotoksik dengan menggunakan sel T47D pada dosis 30 µg/mL memperlihatkan bahwa fraksi yang paling aktif adalah fraksi F3 karena mampu menghambat proliferasi sel T47D hingga 98,8% diikuti

oleh fraksi F2 (60,1%), fraksi F4 (30,2%) dan terakhir fraksi F1 (25,6%) (Gambar 4). Berdasarkan hasil uji tersebut terlihat bahwa senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak miselium merupakan senyawa semipolar karena terelusi oleh etil asetat yang merupakan pelarut semi polar.

Fraksi F3 selanjutnya difraksinasi lagi untuk memisahkan ketiga bercak seperti yang terlihat pada Gambar 4. Fraksinasi dilakukan dengan kolom vakum SiO<sub>2</sub> berdimensi 2 x 12 cm. Elusi dimulai dengan campuran pelarut n-heksana : etil asetat = 8 : 1 (100 mL), dilanjutkan dengan n-heksana : etil asetat = 5 : 1 (100 mL), n-heksana : etil asetat = 1 : 1 (200 mL), etil asetat 100% (240 mL) dan terakhir dielusi dengan etil asetat : metanol = 5 : 1 (100 mL). Jumlah fraksi yang terkumpul sebanyak 21 fraksi. Ke-21 fraksi ini



Gambar 4. Mortalitas sel T47D setelah diberi perlakuan fraksi F1, F2, F3, dan F4 pada dosis 30 µg/mL.  
 Figure 4. Mortality of T47D cell after being treated with F1, F2, F3 and F4 fractions at 30 µg/mL dose.



Gambar 5. Kromatogram KLT hasil fraksinasi F3 yang dikembangkan dengan n-heksana : etil asetat = 1 : 2 di bawah UV 254 nm.  
 Figure 5. TLC chromatogram of F3 fractionation result developed with n-hexane : ethyl acetate = 1 : 2 under 254 nm UV.

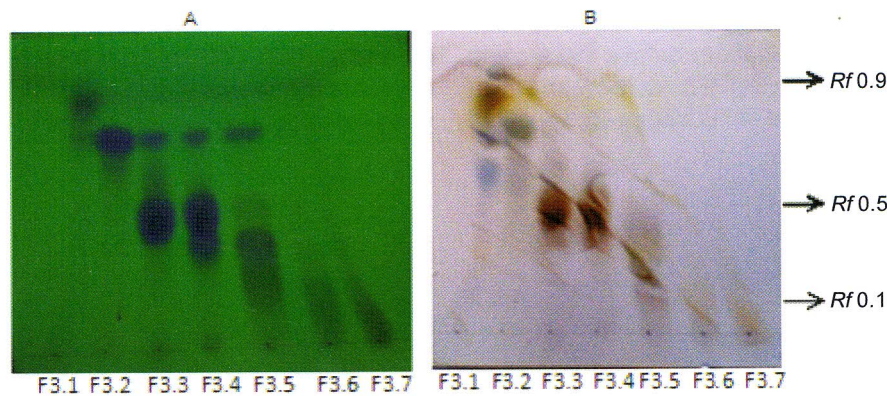
lalu dilihat profil kromatogramnya dengan KLT (Gambar 5). Beberapa fraksi memiliki bercak dengan *Rf* yang sama, bercak-bercak dengan *Rf* yang sama kemudian digabung sehingga pada akhirnya dihasilkan 7 buah fraksi yaitu fraksi F3.1, F3.2, F3.3, F3.4, F3.5, F3.6 dan F3.7 (Gambar 6). Kromatogram KLT setelah penggabungan disajikan pada Gambar 6.

Ketujuh fraksi tersebut selanjutnya diuji aktivitas sitotoksiknya dengan sel T47D pada dosis 30 µg/mL. Hasil uji memperlihatkan bahwa fraksi F3.3, F3.4, dan

F3.5 merupakan fraksi yang paling aktif dengan mortalitas sel T47D masing-masing sebesar 100; 99,2; dan 100% (Gambar 7).

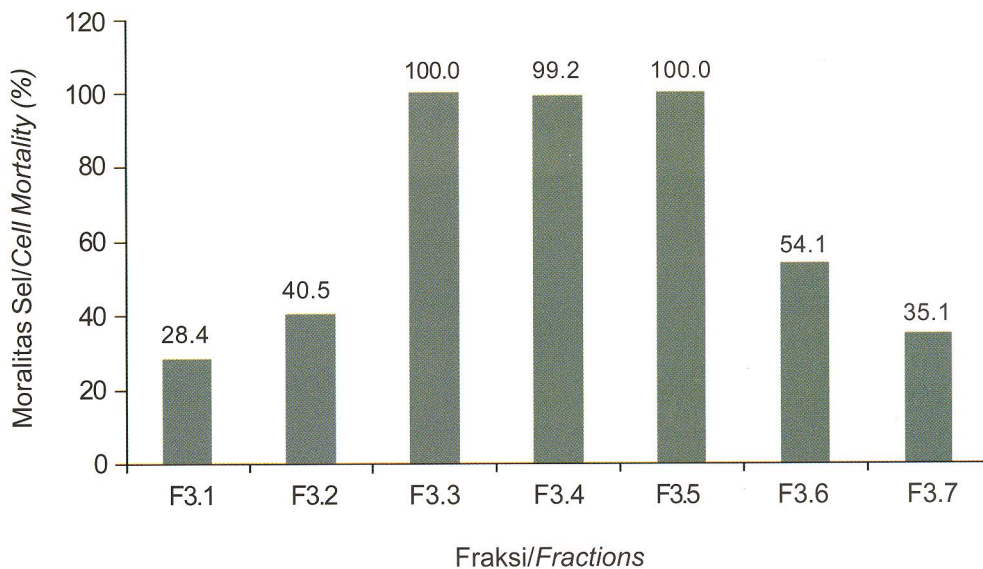
### Isolasi Senyawa Sitotoksik

Berdasarkan kromatogram KLT pada Gambar 6, fraksi F3.3 dan F3.4 terlihat memiliki bercak berwarna biru dengan nilai *Rf* sekitar 0,5, kemungkinan besar bercak inilah yang memiliki aktivitas sitotoksik. Fraksi F3.5 juga memiliki aktivitas sitotoksik, tetapi masih



Gambar 6. Kromatogram KLT hasil fraksinasi F3 setelah spot-spot yang sama digabungkan yang dikembangkan dengan n-heksana : etil asetat = 1 : 2 di bawah UV 254 nm (A), dan divisualisasi dengan PMA (B).

Figure 6. TLC chromatogram of F3 fractionation result after the same spots were combined developed with n-hexane : ethyl acetate = 1 : 2 under 254 nm UV (A) and visualized with PMA (B).



Gambar 7. Mortalitas sel T47D setelah diberi perlakuan fraksi F3.1, F3.2, F3.3, F3.4, F3.5, F3.6, dan F3.7 pada dosis 30 µg/mL.

Figure 7. Mortality of T47D cell after being treated with F3.1, F3.2, F3.3, F3.4, F3.5, F3.6 and F3.7 fractions at dose 30 µg/mL.

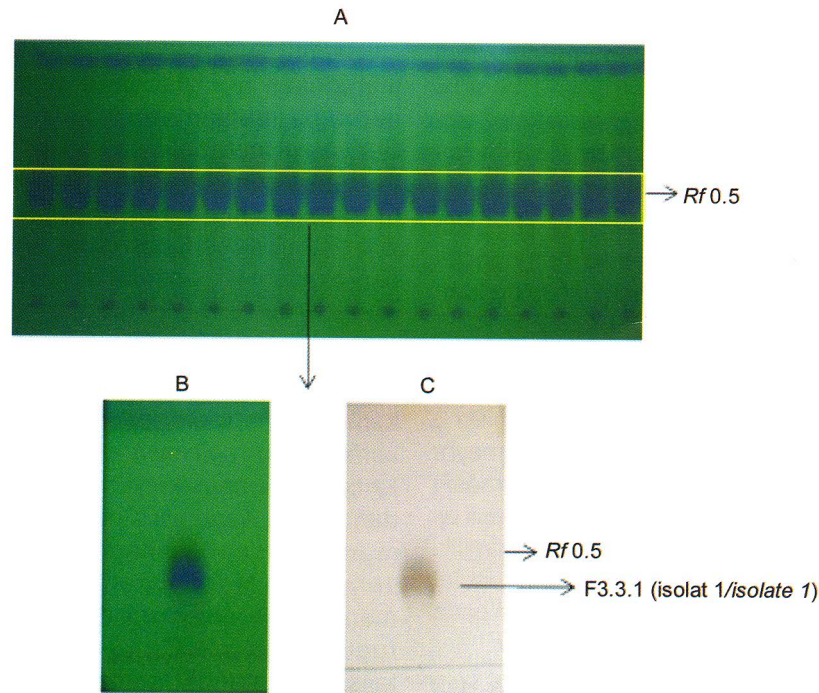
memiliki bercak yang relatif banyak sehingga purifikasi senyawa sitotoksik difokuskan pada fraksi F3.3 dan F3.4.

Langkah berikutnya adalah melakukan purifikasi senyawa sitotoksik yang terdapat pada fraksi F3.3 dan F3.4. Purifikasi terhadap fraksi F3.3 dilakukan dengan KLT preparatif  $\text{SiO}_2$  berdimensi 10 x 20 cm dan dikembangkan dengan larutan n-heksana : etil asetat = 1 : 1 dengan pengembangan sebanyak 1 kali. Purifikasi terhadap fraksi F3.4 dilakukan dengan metode yang sama dengan purifikasi terhadap fraksi F3.3 tetapi dengan pengembangan sebanyak 3 kali. Hal ini disebabkan karena fraksi F3.4 memiliki 2 bercak menonjol yang saling menempel sehingga diperlukan 3 kali pengembangan untuk memisahkan kedua bercak yang saling menempel tersebut.

Hasil KLT preparatif terhadap fraksi F3.3 disajikan pada Gambar 8 A. Dari Gambar 8 A terlihat bahwa bercak utama ( $R_f$  0,5) dapat dipisahkan dengan baik dari bercak-bercak lain yang berada di atasnya ( $R_f$  0,6–0,9). Bercak utama yang diperoleh kemudian dicek kemurniannya secara KLT (Gambar 8 B dan 8 C) dan dari hasil KLT terlihat bahwa bercak utama tersebut sudah berupa bercak tunggal. Bercak tunggal ini untuk selanjutnya disebut dengan F3.3.1 (isolat 1).

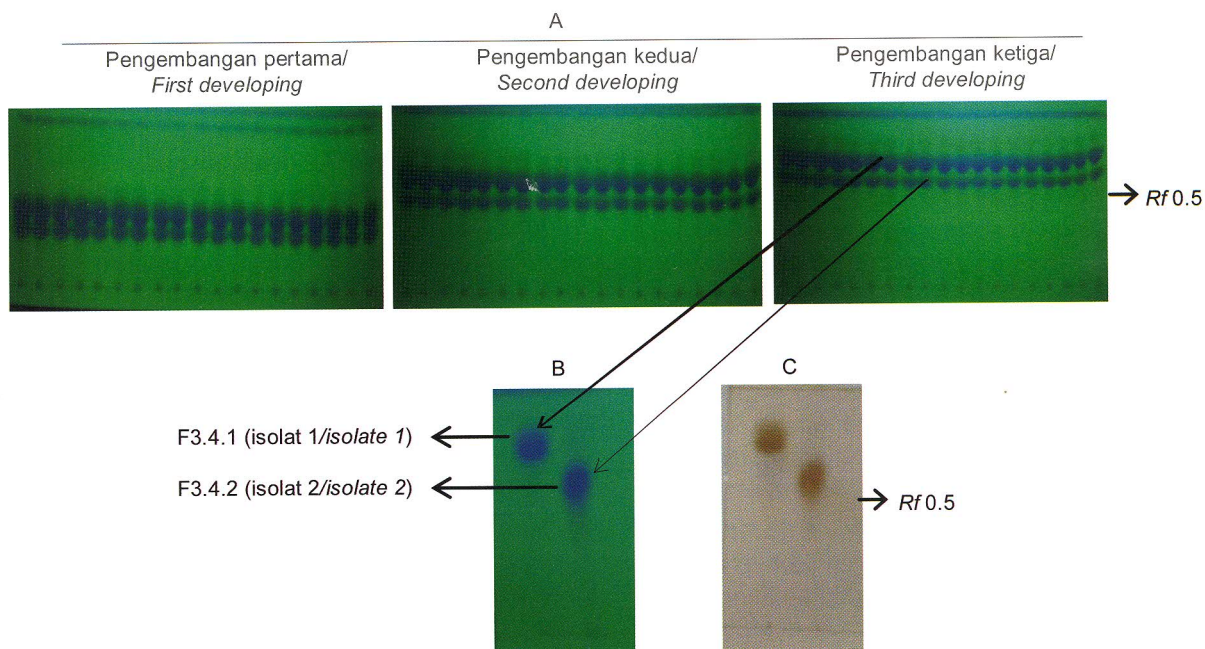
Purifikasi selanjutnya dilakukan terhadap fraksi F3.4. Dua bercak yang saling menempel pada fraksi F3.4 dipisahkan dengan jumlah pengembangan sebanyak 3 kali karena jika hanya dikembangkan 1 kali, kedua bercak tersebut belum terpisah dengan baik. Hasil purifikasi F3.4 disajikan pada Gambar 9. Purifikasi F3.4 menghasilkan 2 bercak utama, bercak pertama (atas) selanjutnya disebut dengan F3.4.1 dan bercak kedua (bawah) disebut dengan F3.4.2. Purifikasi dengan KLT preparatif ini berhasil memisahkan dua bercak yang saling menempel. Berdasarkan kromatogram KCKT, F3.3.1 dan F3.4.1 (Gambar 10) merupakan senyawa yang sama karena memiliki puncak mayor dengan waktu retensi yang sama yaitu menit ke 15. Selain itu, isolat F3.3.1 dan F3.4.1 memiliki bercak dan  $R_f$  yang sama dalam KLT (data tidak ditampilkan).

Isolat F3.3.1 dan F3.4.1 selanjutnya disebut isolat 1 sedangkan isolat F3.4.2 disebut dengan isolat 2. Isolat 1 dan isolat 2 berbentuk padat dan berwarna kuning cerah. Keduanya larut dengan sempurna dalam pelarut semipolar etil asetat dan kloroform tetapi tidak larut dengan sempurna pada pelarut yang lebih polar misalnya metanol. Hal ini memberi informasi bahwa isolat 1 dan 2 merupakan golongan senyawa semipolar. Kedua isolat tersebut selanjutnya diuji



Gambar 8. Kromatogram KLT preparatif (A), spot isolat 1 di bawah UV 254 nm (B), dan divisualisasikan dengan *phosphomolybdic acid* (C). KLT diatas dikembangkan dengan n-heksana : etil asetat = 1 : 1.

Figure 8. Preparative TLC chromatogram (A), spot of isolate 1 under 254 nm UV (B) and visualized with *phosphomolybdic acid* (C). These TLC were developed using n-hexane : ethyl acetate = 1 : 1.



Gambar 9. KLT preparatif F3.4 yang dikembangkan sebanyak 3 kali dengan n-heksana : etil asetat = 1 : 1 (A). Isolat 1 dan 2 di bawah UV 254 nm (B), dan divisualisasi dengan *phosphomolybdic acid* (C). KLT pada gambar B dan C dikembangkan dengan larutan n-heksana : etil asetat = 1 : 1.

Figure 9. F3.4 preparative TLC developed three times using n-hexane : ethyl acetate = 1 : 1 (A). Isolate 1 and 2 under 254 nm UV (B) and visualized with *phosphomolybdic acid* (C). TLC on figure B and C were developed with n-hexane : ethyl acetate = 1 : 1.

aktivitas sitotoksiknya dengan menggunakan sel T47D. Hasil uji memperlihatkan bahwa isolat 1 memiliki aktivitas yang lebih kuat dengan  $IC_{50}$  sebesar 6,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dibanding dengan isolat 2 yang memiliki aktivitas nilai  $IC_{50}$  sebesar 36,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

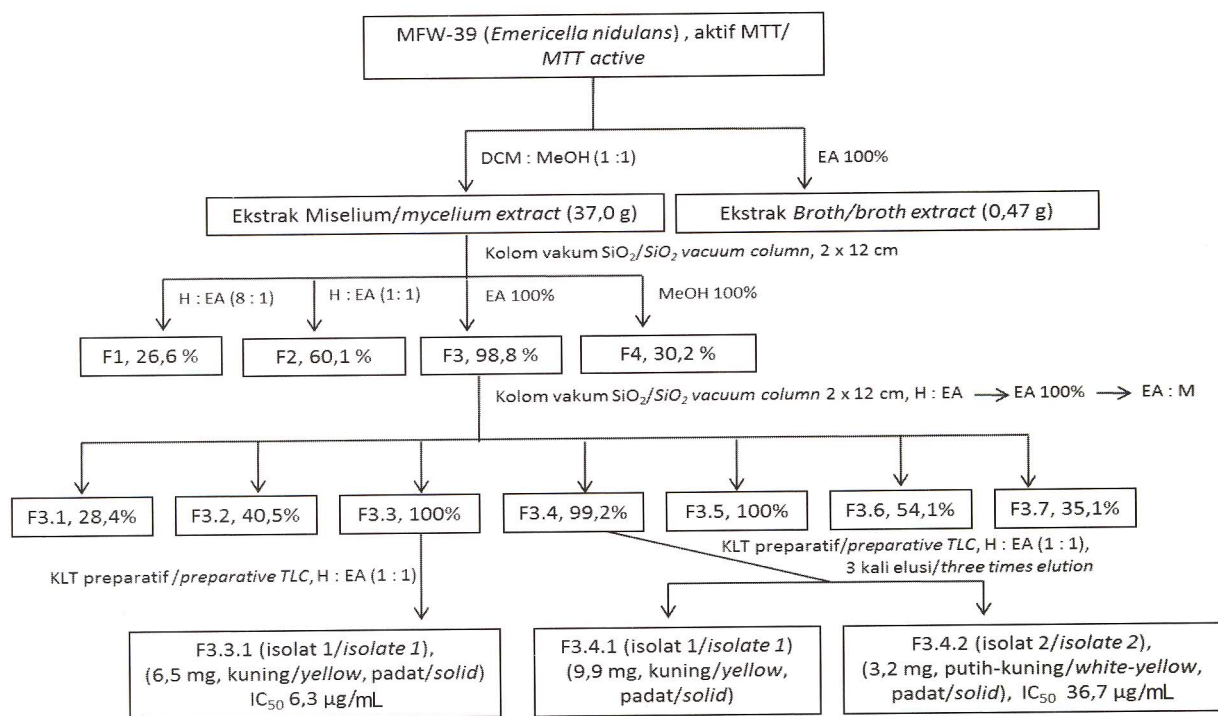
Meskipun masih terlihat beberapa puncak lain pada isolat 1 (Gambar 10) tetapi ukuran puncak-puncak tersebut relatif sangat kecil bila dibandingkan dengan puncak utama. Berdasarkan hal ini maka isolat 1 sudah relatif murni sehingga bisa dilanjutkan ke pengukuran data spektroskopik seperti infra merah, spektra massa dan NMR. Isolat 2 masih memiliki 3 puncak yang tinggi meskipun terdapat 1 puncak mayor (puncak nomor 9). Dengan demikian isolat 2 masih perlu dipurifikasi lebih lanjut. Namun karena hasil uji sitotoksik memperlihatkan bahwa isolat 1 memiliki aktivitas sitotoksik yang lebih kuat dibanding isolat 2, maka penelitian selanjutnya hanya difokuskan pada isolat 1 saja.

Seluruh proses isolasi senyawa sitotoksik dari miselium kapang *E. nidulans* diringkas pada Gambar 11. Bagan dalam Gambar 11 menjelaskan diagram alir isolasi senyawa sitotoksik mulai dari ekstrak kasar miselium hingga diperoleh isolat 1. Kematian sel dinyatakan dalam % dengan menggunakan dosis 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Seperti sudah disinggung sebelumnya, kapang merupakan mikroba yang mampu menghasilkan berbagai macam senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder ini secara umum berhubungan dengan proses sporulasi pada mikroorganisme termasuk kapang. Senyawa yang dihasilkan bisa berfungsi untuk mengaktifasi sporulasi dan pigmentasi, pertahanan diri, perlindungan dari sinar UV dan lain-lain (Calvo *et al.*, 2002).

Hasil investigasi pendahuluan yang kami lakukan terhadap senyawa aktif yang dihasilkan oleh miselium kapang *Emericella nidulans* menunjukkan bahwa kemungkinan senyawa tersebut mengandung gugus karbonil dan memiliki cincin aromatis. Kapang-kapang dari genus *Aspergillus* maupun *Emericella* dikenal mampu menghasilkan berbagai macam kelas senyawa. Moosophon *et al.* (2009) berhasil mengisolasi senyawa baru derivat santon yaitu rugulusanton A-C, 14-metoksitajisanton, dan tajisanton etanoat serta senyawa rugulosen dari kapang *Emericella rugulosa*. Rugulosen memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat terhadap sel BC1, KB dan NCI-H187 dengan  $IC_{50}$  berturut-turut sebesar 1,3; 2,6 dan 1,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Kralj *et al.* (2006), juga telah mengisolasi arugosin dari kapang *E. nidulans* yang diperoleh dari alga hijau. Arugosin merupakan derivatif





Keterangan/Note: DCM (diklorometan), MeOH (metanol), EA (etil asetat), H (n-heksana)

Gambar 11. Pohon isolasi senyawa sitotoksik dari ekstrak miselium kapang *Emericella nidulans*.  
Figure 11. Isolation tree of cytotoxic compound from *Emericella nidulans* fungi mycelium extract.

(Takahashi *et al.*, 1999; Trigoso *et al.*, 2005). Dalam kasus lain, senyawa emericellamida A dan B diproduksi oleh kapang *E. nidulans* yang dikultivasi bersama (*co-culture*) dengan actinomycetes *Salinispora arenicola* (Oh *et al.*, 2007). Contoh-contoh tersebut memperlihatkan bahwa beragam senyawa kimia dapat dihasilkan oleh kapang meskipun kapang-kapang tersebut berasal dari dari spesies atau genus yang sama.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa senyawa aktif yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D telah berhasil diisolasi dari miselium kapang *E. nidulans* yang dikultivasi pada media cair SWS. Nilai  $IC_{50}$  isolat 1 sebesar 6,3  $\mu\text{g/mL}$  terhadap sel T47D. Senyawa sitotoksik ini (isolat 1) merupakan golongan senyawa semipolar yang terelusi pada menit ke-15 pada KCKT. Elusidasi struktur terhadap isolat 1 dan evaluasi lebih lanjut aktivitas antitumor dari isolat 1 saat ini sedang dilakukan.

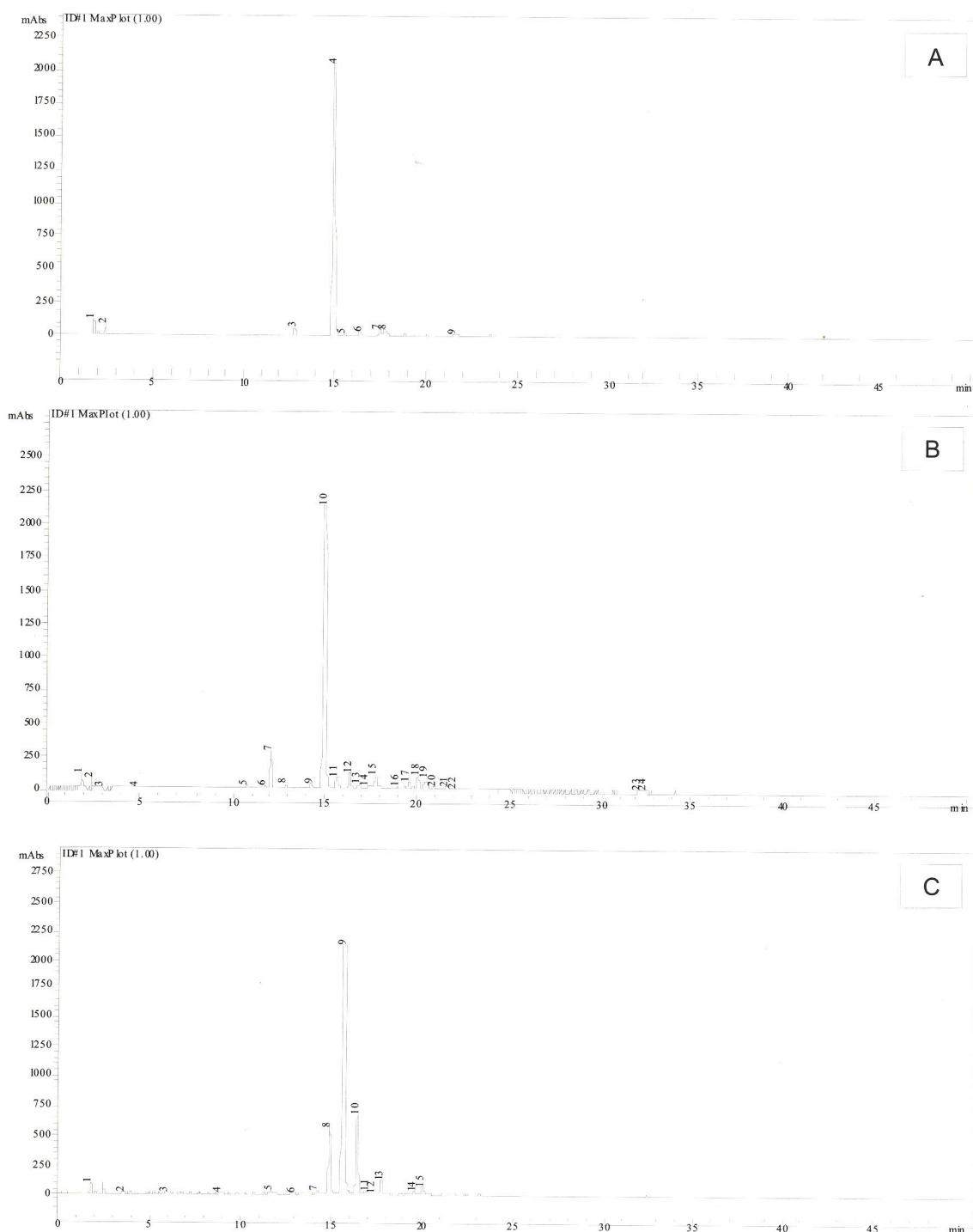
## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Asri Pratitis, S.Pi atas bantuannya dalam mengisolasi

kapang *E. nidulans*. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Hedi Indra Januar, S.Si, M.Si atas bantuannya dalam analisis KCKT serta Sri Iswani, A.Md atas bantuannya selama bekerja di laboratorium.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bugni, T.S. and Ireland, C.M. 2004. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* 21: 143–163.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., and Keller, N.P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 66(3): 447–459.
- Freshney, R.I. 2005. *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*, Fifth Edition. John Wiley and Son, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Holler, U., Wrigth, A.T., Matthee, G.F., Konig, G.M., Draeger, S., Aust, H.J., and Schulz, B. 2000. Fungi from marine sponges : diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycol. Res.* 104(11): 1354–1365.
- Kjer, J., Debbab, A., Aly, A.H., and Proksch, P. 2010. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nature Protocols.* 5(3): 479–490.
- Kralj, A., Kehraus, S., Krick, A., Eguereva, A., Kelter, G., Maurer, M., Wortmann, A., Fiebig, H.H., and Konig, M. 2006. Arugosin G and H: Prenylated polyketodes from marine-derived fungi *Emericella nidulans* var. *acristata*. *J. Nat. Prod.* 69(7): 995–1000.



Gambar 10. Kromatogram KCKT isolat F3.3.1 (A), F3.4.1 (B), dan F3.4.2 (C).  
Figure 10. HPLC chromatogram of F3.3.1(A), F3.4.1 (B) and F3.4.2 isolates (C).

dari benzophenone yang secara biosintesis berhubungan dengan senyawa santon. Senyawa golongan santon juga dihasilkan oleh kapang *Emericella varicolor* (Pornpakakul *et al.*, 2006).

Namun kapang dari genus yang sama bisa menghasilkan senyawa yang berbeda jika dikultivasi

dalam kondisi yang berbeda. Hal ini sesuai dengan konsep "one strain, many compounds" (OSMAC) (Kjer *et al.*, 2010). Contoh dalam kasus ini adalah kapang *E.purpurea* yang menghasilkan senyawa terpen variecolol dan variekolakton serta kapang *E.rugulosa* yang menghasilkan senyawa diketopiperazin

- Mabrouk, A.M., Kheiralla, Z.H., Hamed, E.R., Youssry, A.A., and Aty, A.E. 2008. Production of some biologically active secondary metabolites from marine-derived. *Malaysian Journal of Microbiology*. 4(1): 14–24.
- Moosophon, P., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., and Soyong, K. 2009. prenylxanthenes and a Bicyclo[3.3.1]nona-2,6-diene derivative from the fungus *Emericella rugulosa*. *J. Nat. Prod.* 72: 1442–1446.
- Nursid, M., Chasanah, E., Murwantoko., dan Wahyuono, S. 2011. Penapisan kapang laut penghasil senyawa sitotoksik dari beberapa perairan di Indonesia. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 6(1): 45–56
- Oh, D.C., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., and Fenical, W. 2007. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. in competing co-culture. *J. Nat. Prod.* 70: 515–502.
- Pornpakakul, S., Liangsakul, J., Ngamrojanavanich, N., Roengsumran, S., Sihanonth, P., Piapukiew, J., Sangvichien, E., Puthong, S., and Petsom, A. 2006. Cytotoxic activity of four xanthenes from *Emericella varicolor*, an endophytic fungus isolated from *Croton oblongifolius*. *Arch. Pharm. Res.* 29(2): 140–144.
- Saleem, M., Ali, M.S, Hussain, S., Jabbar, A., Ashraf, M., and Lee, Y.S. 2007. Marine natural products of fungal origin. *Nat. Prod. Rep.* 24: 1142–1152.
- Takahashi, H., Hosoe, T., Nozawa, K., and Kawai, K. 1999. Two new sesterterpenes from the ascomycetous fungus *Emericella purpurea*. *J. Nat. Prod.* 62: 1712–1713.
- Trigos, A., Martinez, L.C., and Reyes, E.E.L. 2005. Diketopiperazines from cultures of the fungus *Emericella rugulosa*. *Micologia Aplicada International*. 13(1): 1–4.
- Xifeng, L., Kim, S.K., Kang, J.S., Choi, H.D., and Son, B.W. 2006. Radical scavenging hydroxyphenyl ethanoic acid derivatives from a marine-derived fungus. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16(4): 637–638.