

PENAPISAN KAPANG LAUT PENGHASIL SENYAWA SITOTOKSIK DARI BEBERAPA PERAIRAN DI INDONESIA

Muhammad Nursid¹⁾, Ekowati Chasanah²⁾, Murwantoko³⁾, dan Subagus Wahyuono⁴⁾

ABSTRAK

Kapang yang berasal dari laut merupakan sumber senyawa sitotoksik yang dapat dikembangkan sebagai bahan obat antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk : 1) menapis kapang laut penghasil senyawa sitotoksik dari beberapa wilayah perairan di Indonesia, 2) mengidentifikasi kapang penghasil senyawa sitotoksik paling kuat, dan 3) mengetahui nilai *inhibition concentration* 50 (IC_{50}) dari senyawa sitotoksik yang dihasilkan. Kapang diisolasi dari organisme laut yang diambil dari Taman Nasional Laut Wakatobi-Sulawesi Tenggara, Pantai Binuangeun-Banten, dan perairan sekitar kota Manado-Sulawesi Utara, dan Taman Nasional Laut Kepulauan Seribu. Kultivasi cair dilakukan pada media *Malt Extract Broth* (MEB) dan *Soluble Starch-Soytone* (SWS) selama 4 minggu pada suhu 27–28°C dalam kondisi statis. Identifikasi kapang secara molekular dilakukan secara PCR dengan menggunakan primer ITS1 dan ITS4. Aktivitas sitotoksik dari ekstrak yang dihasilkan diuji dengan metode MTT (3-(4,4-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide). Hasil uji MTT terhadap 46 strain kapang menunjukkan bahwa kapang MFW39 memiliki aktivitas sitotoksik yang paling kuat (35,4%) terhadap sel T47D. Hasil identifikasi secara molekular menunjukkan bahwa kapang tersebut memiliki similaritas sebesar 99% dengan kapang *Emericella nidulans*. Ekstrak miselium dan *broth* kapang MFW39 dapat menghambat pertumbuhan sel T47D dengan nilai IC_{50} berturut-turut sebesar 21,9 dan 169,3 $\mu\text{g/mL}$. Riset selanjutnya akan difokuskan untuk meneliti kapang laut strain MFW39.

ABSTRACT: *Screening of marine fungi producing cytotoxic compound from Indonesian waters. By: Muhammad Nursid, Ekowati Chasanah, Murwantoko, and Subagus Wahyuono*

*Marine-derived fungi have proven to be a rich source of cytotoxic compounds for the development of new anti cancer drugs. The aims of this research were to: 1) screen cytotoxic activity of marine fungi from Indonesian waters, 2) identify marine fungus that produced that produced the most active cytotoxic compound, and 3) investigate inhibition concentration 50 (IC_{50}) value of cytotoxic compound. The fungi were isolated from marine organism collected from Wakatobi Marine National Park-South East Sulawesi, Binuangeun Beach-Banten, Manado waters-North Sulawesi and Kepulauan Seribu Marine National Park-Jakarta. Liquid cultures of the fungi were carried out in Malt Extract Broth and Soluble Starch Soytone medium for 4 weeks at 27–28°C without shaking. Molecular identification of fungus was conducted through PCR amplification using primers of ITS1 and ITS4 primer. Cytotoxic activity of the extract was tested by using MTT (3-(4,4-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) method. The MTT test showed that MFW39 strain exhibited the strongest cytotoxic activity. Molecular identification revealed that MFW39 marine fungus was similar to *Emericella nidulans* with percent identity of 99%. Mycelium and broth extract of MFW39 fungus inhibited the growth of T47D cell with IC_{50} values of 21.9 and 169.3 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Further research will be focus on to the strain of MFW39 marine fungi.*

KEYWORDS: *screening, cytotoxic activity, marine fungi, Emericella nidulans*

PENDAHULUAN

Spesies kapang di dunia ini diperkirakan berjumlah sekitar 1,5 juta spesies tetapi yang sudah dideskripsikan baru sekitar 5–10%. Keanekaragaman kapang di daerah tropik diperkirakan lebih tinggi dibandingkan di daerah sub-tropik (Hawksworth, 2001; Hyde, 1998). Indonesia memiliki perairan laut yang sangat luas yaitu sekitar 2/3 dari luas wilayahnya.

Keanekaragaman hayati yang terkandung di dalamnya merupakan salah satu yang tertinggi di dunia termasuk keanekaragaman mikroba khususnya kapang. Menurut Gandjar *et al.* (2006), tingginya keanekaragaman kapang di Indonesia karena lingkungannya yang lembab dan suhu di daerah tropis yang mendukung pertumbuhan kapang. Menurut Rifai (1995), sekitar 200.000 spesies kapang diperkirakan terdapat di Indonesia.

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

²⁾ Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada; Jl. Flora Bulaksumur Gedung A-4, Yogyakarta

³⁾ Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada; Sekip Utara, Yogyakarta

Penelitian mengenai bioprospeksi kapang yang diisolasi dari lingkungan laut di Indonesia bisa dikatakan masih terbatas baik biodiversitas maupun kemodiversitasnya. Beberapa penelitian dalam bidang ini misalnya dilakukan oleh Namikoshi *et al.* (2001); Proksch *et al.* (2003); Chasanah *et al.* (2009); dan Pratitis *et al.* (2009). Dengan mempertimbangkan tingginya biodiversitas kapang yang ada di Indonesia serta potensinya sebagai penghasil senyawa aktif maka penelitian tentang senyawa metabolit sekunder dari kapang yang berasal dari perairan Indonesia penting untuk dilakukan.

Di negara maju yang telah berhasil mengatasi penyakit infeksi, kanker menjadi penyebab kematian kedua setelah penyakit kardiovaskular. Kanker ialah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostasis lainnya pada organisme multiselular (Nafrialdi & Gan, 2007). Salah satu kanker yang banyak menyerang kaum wanita adalah kanker payudara. Kanker payudara merupakan jenis kanker yang memiliki keganasan tertinggi setelah kanker leher rahim. Jenis kanker ini di Indonesia cenderung terus meningkat dari tahun ke tahun (Tjindarbumi & Mangunkusumo, 2002).

Berbagai upaya dilakukan untuk mencari bahan obat antikanker, salah satunya dengan memanfaatkan senyawa bahan alam. Senyawa bahan alam untuk obat anti kanker secara umum ditapis berdasarkan aktivitas sitotoksik atau anti proliferasif yang dimiliki dengan menggunakan sel lestari kanker (*cancer cell lines*). Penggunaan sel lestari kanker dalam *biodiscovery* obat antikanker memiliki beberapa keuntungan diantaranya mudah cara penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, homogen, bersifat *repeatable* (dapat diulang), serta secara *in vitro* dapat diketahui mekanisme molekular suatu senyawa antikanker yang sedang dipelajari (Burdal *et al.*, 2003; Felth, 2011). Salah satu sel yang

banyak digunakan dalam penapisan senyawa yang memiliki aktivitas antikanker adalah sel T47D (*human ductal breast epithelial tumor cell line*). Sel T47D pertama kali diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun (Abcam, 2007). Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini bertujuan untuk :

1. Menapis kapang laut penghasil senyawa sitotoksik terhadap sel T47D dari beberapa wilayah perairan di Indonesia.
2. Mengidentifikasi jenis kapang yang memiliki aktivitas sitotoksik paling kuat.
3. Mengetahui nilai *inhibition concentration* 50 (IC_{50}) dari senyawa aktif yang dihasilkan.

BAHAN DAN METODE

Sampling Hospes

Sampel hospes (*host*) diambil dari Taman Nasional Laut Wakatobi-Sulawesi Tenggara, perairan Taman Nasional Laut Kepulauan Seribu-Jakarta, perairan sekitar kota Manado-Sulawesi Utara dan pantai Binuangeun-Banten (Gambar 1). Sampel hospes yang diambil berasal dari golongan spons, ascidian, karang lunak, dan rumput laut. Sampel hospes yang diperoleh dibersihkan dengan air laut steril kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik steril, diberi label dan segera dipreservasi pada suhu dingin dengan menggunakan es batu. Setiap spesimen sampel yang diperoleh difoto baik ketika masih berada di dalam air maupun ketika sudah berada di permukaan. Identifikasi dan perkiraan taksonomik setiap hospes dilakukan berdasarkan Colin & Arneson (1995).

Isolasi Kapang

Isolasi kapang dari hospes dilakukan dengan menggunakan *Minimum Fungi Medium* (terdiri dari



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel.
Figure 1. Sampling location.

0,02% ekstrak khamir, 0,1% *soluble starch*, 2% agar), *Malt Extract Agar medium* (terdiri dari 0,3% ekstrak malt, 0,3% ekstrak khamir, 0,5% pepton, 1,5% agar), dan *Glucose Peptone Yeast medium* (0,1% glukosa, 0,05% pepton soya, 0,01% ekstrak khamir, 1,5% agar). Penggunaan ketiga jenis media tersebut dimaksudkan untuk memperbesar peluang memperoleh isolat kapang yang berbeda. Ketiga jenis media tersebut dilarutkan dalam ASW (*artificial seawater*, NaCl 70 g; KCl 3,0 g; Na₂SO₄ 1,1 g; MgCl₂ 20,4 g; dan CaCl₂ 0,6 g, dilarutkan dalam akuades 4 L). Metode isolasi kapang dilakukan menurut Zhang *et al.* (2009) dan Kjer *et al.* (2010) dengan beberapa modifikasi. Sebelum dipotong, hospes disemprot dengan alkohol 70%, kemudian secara aseptis, sampel hospes dipotong dengan ukuran sekitar 2–4 mm³ dan potongan ditempatkan ke dalam petri yang berisi media. Petri diinkubasi pada suhu ruang (27–29°C) selama 3–7 hari. Setiap kapang yang tumbuh pada cawan petri kemudian dipindah ke petri yang baru berdasarkan bentuk dan warna hifa. Proses isolasi dilakukan secara berulang hingga diperoleh 1 jenis kapang tunggal (*strain* murni).

Kultivasi dan Penapisan Kapang

Strain murni hasil isolasi dikultivasi dalam media *Malt Extract Broth/MEB* (komposisi media MEB sama dengan MEA namun tanpa menggunakan agar) selama 3 minggu pada suhu 27–29°C dalam kondisi statis. Ekstraksi metabolit yang terdapat dalam kultur dilakukan dengan menggunakan etil asetat. Setiap ekstrak kasar yang diperoleh ditimbang beratnya lalu diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel T47D pada dosis 30 µg/mL. *Strain* murni yang memiliki aktivitas sitotoksik paling kuat selanjutnya diidentifikasi nama jenisnya, dikultivasi dalam media cair 1 L, diekstraksi dan diamati profil metabolitnya serta ditentukan nilai IC₅₀-nya terhadap sel T47D.

Kultivasi Strain Aktif

Strain aktif adalah kapang yang memiliki aktivitas sitotoksik paling baik hasil dari proses penapisan. Kultivasi *strain* aktif dilakukan di dalam media SWS yang mengandung 1% *soluble starch*; 0,1% soya pepton dan 1 L ASW. Kultivasi dilakukan selama 5 minggu pada suhu 27–28°C dalam kondisi statis. Ekstrak yang dihasilkan dari kultivasi 1 L tersebut kemudian diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel T47D dalam berbagai variasi dosis.

Ekstraksi dan Profil Metabolit

Ekstraksi metabolit dari kapang yang terdapat dalam miselium dan *broth* dilakukan secara terpisah. *Broth* adalah bagian cairan yang terdapat dalam

culture cair, berisi campuran media dan hasil metabolit yang disekresi oleh kapang, sedangkan miselium adalah bagian dari tubuh kapang yang terbentuk dari kumpulan hifa yang bercabang. Metabolit dalam *broth* diekstraksi dengan etil asetat sedangkan metabolit yang terdapat dalam miselium diekstraksi dengan campuran diklorometan (DCM) : metanol (MeOH) = 1 : 1.

Profil metabolit yang terdapat pada ekstrak miselium dan *broth* dilihat dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Analisis KLT dilakukan dengan plat alumunium yang mengandung matriks SiO₂. Sistem pengembang yang digunakan adalah campuran DCM : MeOH = 10 : 1. Deteksi dilakukan di bawah UV 254 nm dan disemprot dengan *phosphomolybdic acid* (PMA) kemudian dipanaskan pada suhu 100°C hingga bercak-bercak muncul dengan jelas. Analisis KCKT dilakukan dengan instrumen LCMS (Shimadzu), kolom ODS 2,0 x 150 mm, detektor *photo diode array* (PDA), sistem elusi H₂O 20%–asetonitril 100% (gradien).

Uji Sitotoksik

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT (3-(4,4-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) menggunakan sel lestari T47D. Sel tersebut dikultur dalam medium *Roswell Park Memorial Institut* 1640 (RPMI) (Sigma), *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% (Gibco), fungizone 0,5% (Gibco) dan penisilin-streptomisin 2% (Gibco). Sel dipelihara dalam inkubator dengan aliran CO₂ sebesar 5 mL/menit pada suhu 37°C. Jumlah sel yang digunakan dalam uji sebesar 20.000 sel/sumuran. Secara umum uji sitotoksik dilakukan menurut Freshney (2005). Dosis ekstrak yang digunakan untuk penapisan adalah sebesar 30 µg/ml sedangkan dosis untuk mengetahui nilai IC₅₀ ekstrak yang paling aktif adalah 1, 5, 25, 125, dan 625 µg/mL. Dalam uji ini digunakan doxorubicin sebagai kontrol positif. Doxorubicin merupakan salah satu obat kemoterapi yang tersedia secara komersial di pasaran. 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 IC₅₀ ditentukan dengan menggunakan analisis probit dengan bantuan program statistik MINITAB 14.0.

Identifikasi Kapang

Kapang diidentifikasi secara molekuler berdasarkan sekuens gen ITS1-5.8S-ITS2 rDNA. Amplifikasi sekuens gen tersebut dilakukan dengan *polymerase chain reaction* (PCR) dengan menggunakan primer *Internal Transcribed Spacer 1* (ITS1) dan *Internal Transcribed Spacer 4* (ITS4)

masing-masing dengan urutan basa 5'- CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTAA-3' dan 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'. Isolasi DNA kapang dilakukan sesuai dengan petunjuk yang ada pada protokol Fermentasi *DNA Extraction Kit*. PCR dilakukan dengan volume akhir sebanyak 25 μ L yang terdiri dari campuran 5–25 ng DNA, 0,4 mM primer, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$, 2,0 U Taq polymerase, dan 1,0x buffer. Produk PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis, dipurifikasi dengan menggunakan Fermentas *Agarose Gel DNA Purification Kit* kemudian disekuens dengan ABI PRISM™ 3730XL sequencer. Sekuens gen ITS1 dan ITS 2 yang diperoleh lalu dibandingkan dengan sekuens gen ITS1-5.8S-ITS2 rDNA dari spesies kapang yang sudah diketahui di NCBI GenBank. Pensejajaran sekuens gen dan konstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan bantuan perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 5.0. Hasil identifikasi kapang secara molekular selanjutnya diperkuat dengan identifikasi secara morfologi menurut buku Gandjar (1989) dan Pitt & Hocking (2009).

HASIL DAN BAHASAN

Skrining Kapang Penghasil Senyawa Sitotoksik

Keseluruhan isolat kapang yang diskriminasi aktivitas sitotoksiknya berjumlah 46 isolat, dengan rincian 10 isolat berasal dari pantai Binuangeun, Kabupaten Lebak, Banten, 8 isolat berasal dari perairan sekitar Kota Manado, Sulawesi Utara, 9 isolat berasal dari perairan sekitar pulau Pramuka kawasan Taman Nasional Laut Kepulauan Seribu, DKI Jakarta dan 18 isolat berasal dari taman Nasional Laut Wakatobi, Sulawesi Tenggara (Tabel 1). Hospes kapang sebagian besar berasal dari spons (porifera) lalu diikuti karang lunak (coelenterata), ascidia, dan rumput laut merah. Menurut Bugni & Ireland (2004), spons merupakan sumber *host* atau substrat yang paling banyak dieksplorasi dalam penelitian senyawa bahan alam dari kapang laut. Jumlah senyawa baru dari kapang laut yang berasosiasi dengan spons merupakan yang tertinggi dibandingkan dengan kapang yang berasosiasi dengan *host* lain misalnya rumput laut, moluska, ekinodermata, dan lain-lain.

Rendemen (*yield*) ekstrak yang dihasilkan dari strain kapang tersebut berkisar antara 1,2–89,4 mg dengan rata-rata sebesar 11,3 mg per 100 mL volume kultur. Rendemen yang dihasilkan tergantung dari jenis strain kapang yang dikultivasi. Beberapa kapang memiliki biomassa yang tinggi sedangkan yang lainnya rendah. Ekstrak yang dihasilkan masih berupa ekstrak kasar (*crude extract*) yang terdiri dari banyak

campuran senyawa ditambah dengan pengotor seperti garam-garam dan protein dari media.

Hasil uji sitotoksik memperlihatkan bahwa nilai inhibisi ekstrak terhadap proliferasi sel T47D dengan dosis 30 μ g/mL berkisar antara 0–35,5% (rata-rata penghambatan sebesar 10,7%). Ekstrak yang memiliki aktivitas sitotoksik paling kuat terhadap sel T47D adalah ekstrak yang diperoleh dari kapang dengan kode isolat MFW39 (Tabel 1) dengan jumlah ekstrak yang dihasilkan sebesar 13,1 mg.

Kapang MFW39 disolasi dari permukaan ascidia W-02-08 dengan menggunakan media MEA. Ascidia W-02-08 diambil dari perairan sekitar pulau Wangi-Wangi yang termasuk dalam kawasan Taman Nasional Laut Wakatobi, Sulawesi Tenggara. Berdasarkan kenampakan morfologi, ascidia ini diperkirakan termasuk dalam genus *Aplidium*. Perkiraan ini diperkuat oleh hasil identifikasi yang dilakukan oleh Pusat Penelitian Oseanologi LIPI yang menyatakan bahwa ascidia ini termasuk dalam jenis *Aplidium longithorax*. Hasil uji sitotoksik terhadap 46 ekstrak kapang disajikan dalam Tabel 1, doxorubicin dengan dosis 5 μ g/mL digunakan sebagai kontrol positif.

Inhibisi ekstrak MFW39 terhadap proliferasi sel T47D adalah sebesar 35,4 % sedangkan doxorubicin (sebagai kontrol positif) memiliki nilai inhibisi sebesar 70,5% pada dosis 5 μ g/mL (Gambar 2). Nilai hambatan ekstrak MFW39 masih jauh lebih kecil dari doxorubicin kemungkinan besar karena ekstrak yang diujikan masih sangat kasar. Pada saat panen (*harvest*), metabolit dari miselium dan *broth* masih bercampur sehingga kemungkinan besar kadar senyawa sitotoksik yang terdapat di dalamnya masih sangat kecil. Pada tahap ini juga belum diketahui pada bagian mana senyawa sitotoksik terdapat pada kapang MFW39, apakah pada ekstrak miselium atau ekstrak *broth*. Meskipun nilai inhibisi ekstrak MFW39 tidak sebesar nilai inhibisi doxorubicin, tetapi hasil penelitian ini memberi petunjuk bahwa isolat kapang MFW39 mampu menghasilkan senyawa aktif yang mampu menghambat proliferasi sel T47D.

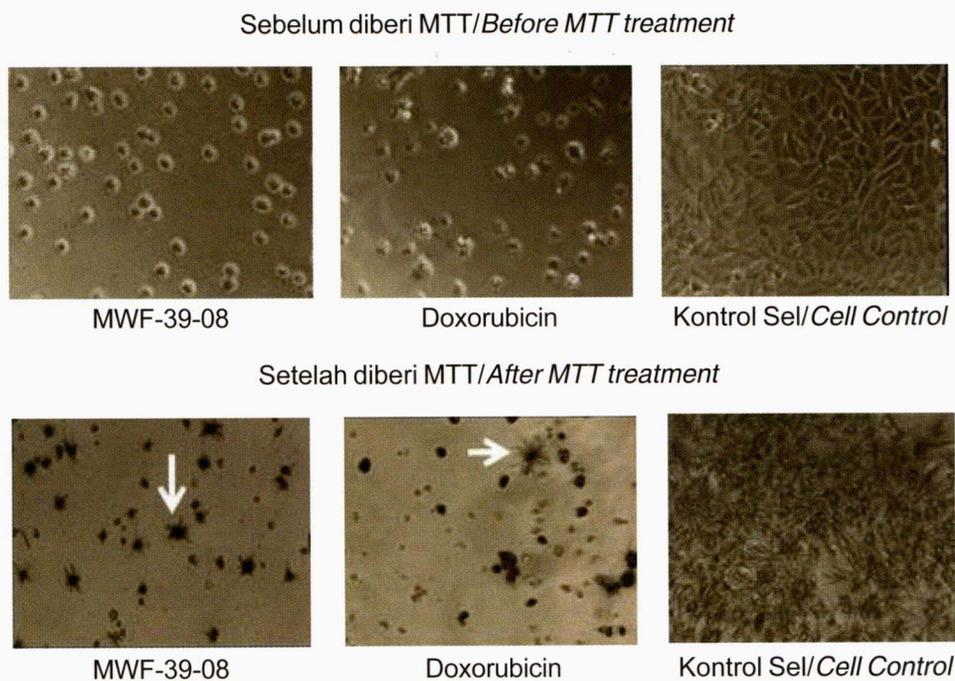
Morfologi sel T47D setelah diberi perlakuan ekstrak MFW39, doxorubicin dan tanpa perlakuan disajikan pada Gambar 2. Hasil pengamatan morfologi memperlihatkan bahwa pemberian ekstrak MFW39 dapat menyebabkan perubahan morfologi pada sel T47D dibandingkan dengan ekstrak yang lain. Berdasarkan pengamatan secara visual terhadap foto sel setelah diberi perlakuan ekstrak MFW39, morfologi sel T47D tampak berubah menjadi bulat sedangkan sel yang tidak diberi perlakuan (kontrol sel), bentuknya tetap pipih-lonjong (seperti bentuk daun) dan melekat kuat di dasar flask kultur. Ekstrak yang tidak aktif (tidak mengandung senyawa sitotoksik) tidak dapat menyebabkan perubahan pada morfologi sel.

Tabel 1. Isolat kapang dan bobot ekstrak kasar yang diperoleh dari 100 mL kultur cair
 Table 1. Fungal isolate and weight of crude extract obtained from 100 mL liquid culture

Isolat Kapang/ Fungal Isolate	Hospes dan Perkiraan Taksonomis/ Host and Taxonomic Prediction	Golongan/Group	Lokasi Sampling/ Sampling Location	Yield (mg)	Penghambatan Sel/Cells Inhibition (%) *)
MFB01	B-05-09 (rumput laut <i>Halymania durvillae</i>)	Rumput laut/Seaweed		21.9	5.5
MFB02	B-05-09 (rumput laut <i>Halymania durvillae</i>)	Rumput laut/Seaweed		22.4	13.6
MFB03	B-05-09 (rumput laut <i>Halymania durvillae</i>)	Rumput laut/Seaweed		89.4	10.5
MFB04	B-05-09 (rumput laut <i>Halymania durvillae</i>)	Rumput laut/Seaweed		16.5	13.3
MFB06	B-01-09 (karang lunak <i>Sarcophyton</i> sp.)	Spons/Sponge	Binuangeun,	9.9	19.2
MFB07	B-10-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge	Banten	24.5	10.6
MFB09	B-10-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		9.2	0.0
MFB10	B-10-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		24.5	0.0
MFB11	B-05-09 (rumput laut <i>Halymania durvillae</i>)	Rumput laut/Seaweed		2.6	18.9
MFB13	B-12-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		13.4	19.2
MFM03	M-15-19 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		17.5	15.3
MFM04	M-08-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		13.4	29.4
MFM08	M-14-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge	Perairan	9.4	0.0
MFM09	M-18-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge	Sekitar	13.2	3.5
MFM10	M-08-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge	Manado	7.9	0.0
MFM13	M-11-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		7.2	26.9
MFM14	M-11-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		7.7	0.0
MFM15	M-14-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		11.0	2.8
MFP03	PS-17-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		16.0	7.2
MFP06	PS-17-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		15.3	2.8
MFP09	PS-63-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge	Perairan	8.9	2.1
MFP10	PS-64-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge	Sekitar	17.8	0.0
MFP11	PS-18-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge	Kepulauan	16.7	0.6
MFP13	PS-17-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge	Seribu	5.7	0.6
MFP15	PS-17-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		11.9	2.8
MFP17	PS-17-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		3.8	3.1
MFP23	PS-17-09 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		3.4	0.0
MFW01	W-02-08 (ascidia <i>Aplidium longitorax</i>)	Ascidia		5.1	13.0
MFW05	W-02-08 (ascidia <i>Aplidium longitorax</i>)	Ascidia		5.8	14.1
MFW06	W-02-08 (ascidia <i>Aplidium longitorax</i>)	Ascidia		2.8	23.9
MFW07	W-02-08 (ascidia <i>Aplidium longitorax</i>)	Ascidia		4.0	4.5
MFW20	W-14-08 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		4.3	4.7
MFW23	W-14-08 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		4.9	2.3
MFW26	W-14-08 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge	Taman	3.9	16.3
MFW28	W-14-08 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge	Nasional	5.1	28.7
MFW29	W-14-08 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge	Laut	9.2	17.7
MFW39	W-02-08 (ascidia <i>Aplidium longitorax</i>)	Ascidia	Wakatobi,	13.1	35.4
MFW40	W-01-08 (karang lunak <i>Sinularia</i> sp.)	Karang lunak/Soft coral	Sulawesi	1.2	18.7
MFW41	W-01-08 (karang lunak <i>Sinularia</i> sp.)	Karang lunak/Soft coral	Tenggara	5.9	15.2
MFW42	W-01-08 (karang lunak <i>Sinularia</i> sp.)	Karang lunak/Soft coral		5.2	26.1
MFW50	W-08-08 (spons <i>Ircinia</i> sp.)	Spons/Sponge		2.2	8.9
MFW52	W-24-08 (spons <i>Aaptos</i> sp.)	Spons/Sponge		2.8	15.7
MFW61	W-25-08 (spons tidak teridentifikasi)	Spons/Sponge		1.6	4.1
MFW62	W-47-08 (karang lunak <i>Lobophytum</i> sp.)	Karang lunak/Soft coral		13.7	15.5
MFW70	W-08-08 (spons <i>Ircinia</i> sp.)	Spons/Sponge		6.4	8.2
Doxorubicin					70.5

Keterangan/Note :

*) Penghambatan pertumbuhan sel T47D (%) setelah diberi perlakuan ekstrak kapang selama 24 jam (dosis ekstrak kapang = 30 µg/mL, doxorubicin = 5 µg/mL)/Growth inhibition of T47D cells (%) after being treated with fungi extract for 24 hours (dose of fungal extract = 30 µg/mL, doxorubicin = 5 µg/mL).



Gambar 2. Morfologi sel T47D setelah diberi perlakuan ekstrak kapang MFW39 dan kristal formazan yang terbentuk (tanda panah) setelah 3 jam pemberian MTT (perbesaran 100 x).

Figure 2. Morphology of T47D cells after being treated with MFW39 fungal extract and formazan crystal formed (arrows) after 3 hours exposing with MTT (100 x magnification).

Aktivitas sitotoksik yang terdapat pada ekstrak kapang MFW39 juga dapat dideteksi berdasarkan kristal formazan yang terbentuk di dalam mikroplat setelah 3-4 jam pemberian MTT. Kristal formazan yang terbentuk setelah pemberian ekstrak MF-39-08 relatif paling sedikit dibandingkan dengan kristal formazan yang terbentuk akibat perlakuan ekstrak kapang lainnya (Gambar 2). Dalam uji sitotoksik metode MTT, jumlah kristal formazan sebanding dengan jumlah sel yang hidup. Reaksi MTT merupakan reaksi reduksi seluler yang didasarkan pada pemecahan garam tetrazolium MTT yang berwarna kuning menjadi kristal formazan yang berwarna biru keunguan. Enzim suksinat dehidrogenase pada mitokondria sel hidup mampu memecah MTT menjadi kristal formazan (Zachary, 2003). Reaksi tersebut melibatkan piridin nukleotida kofaktor NADH dan NADPH yang hanya dikatalis oleh sel hidup, sehingga jumlah formazan yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel yang hidup. Semakin banyak sel yang hidup, semakin banyak kristal formazan yang terbentuk, semakin tinggi nilai absorbansi yang diperoleh dan mengindikasikan mortalitas yang rendah.

Profil Metabolit Kapang MFW39

Rendemen metabolit dari kultivasi kapang MFW39 dalam media cair SWS pada skala 1 L sebesar 360,8 mg untuk ekstrak miselium dan ekstrak *broth* sebesar

57,4 mg. 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.

Ekstraksi metabolit dari *broth* dilakukan dengan etil asetat karena pelarut ini bersifat semipolar sehingga diharapkan dapat menarik senyawa metabolit sekunder hasil metabolisme kapang yang terdapat dari *broth* dalam kisaran polaritas yang lebar mulai yang bersifat non polar sampai polar. Selain itu, etil asetat memisah dengan baik dengan *broth* ketika didiamkan dalam corong pisah setelah dilakukan pengocokan sehingga mudah memisahkan antar keduanya.

Ekstraksi terhadap miselium dan *broth* dilakukan secara terpisah karena ada kemungkinan metabolit sekunder yang terdapat pada miselium dan *broth* memiliki perbedaan. Ada metabolit tertentu yang hanya terdapat dalam miselium dan ada pula metabolit tertentu yang hanya terdapat pada *broth*. Alasan lainnya adalah jika senyawa sitotoksik yang dihasilkan