



ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK METABOLIT KAPANG LAUT DARI PERAIRAN KALIMANTAN SELATAN

Kholifatu Rosyidah¹, Noer Komari¹, Agus Supriyono²

¹PS Kimia FMIPA Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru

²BPPT Kawasan PUSPIPEK Serpong, Tangerang

kholifatu@yahoo.co.id

Perairan laut Kalimantan Selatan mempunyai potensi yang sangat besar, salah satunya adalah terumbu karang. Terumbu karang merupakan tempat hidup berbagai organisme dan mikroorganisme laut. Eksplorasi senyawa aktif dari terumbu karang dikhawatirkan akan merusak karang itu sendiri. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa aktif dalam organisme terumbu karang juga diproduksi oleh mikroorganisme yang hidup di dalamnya. Oleh karena itu dilakukan isolasi kapang laut dari gorgonian dari perairan laut wilayah Kalimantan Selatan. Isolat kapang diidentifikasi dan difermentasi. Kapang tersebut diduga *Sporotrichum* spp. Kapang tersebut juga difermentasi dengan 600 mL media malt ekstrak cair. Supernatan hasil fermentasi diekstraksi dengan etil asetat dan diuapkan sampai bebas pelarut. Ekstrak ditimbang dan diperoleh 50,4 mg ekstrak kering. Ekstrak tersebut dilakukan uji BSLT diperoleh $LC_{50} = 372,26$ ppm dan uji sitotoksik dengan sel kanker T47D diperoleh $IC_{50} = 110,18$ μ g/mL.

Kata kunci: kapang laut, isolasi, fermentasi, sitotoksik, sel kanker T47D

PENDAHULUAN

Perairan laut Kalimantan Selatan mempunyai potensi yang sangat besar, salah satunya adalah terumbu karang. Terumbu karang merupakan tempat hidup berbagai organisme dan mikroorganisme laut. Eksplorasi senyawa aktif dari terumbu karang dikhawatirkan akan merusak karang itu sendiri. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa aktif dalam organisme terumbu karang juga diproduksi oleh mikroorganisme yang hidup di dalamnya. Oleh karena itu dilakukan isolasi kapang laut dari gorgonian berasal dari perairan laut wilayah Kalimantan Selatan. Potensi ini semakin menarik untuk diteliti dan dikembangkan karena mikroorganisme dapat diproduksi secara cepat dan dalam jumlah besar jika diinginkan.

Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa kapang laut menghasilkan senyawa aktif antikanker misalnya aspergiolida A dari *Aspergillus glaucus* (Du et al, 2007), melegrin (Du et al, 2010), dan oksalin (Dhorajiya et al, 2011). Tarman et al (2011) berhasil mengisolasi senyawa 2-karboksi-8-metoksi-naftalen-1-ol dari kapang *Mycelium sterillum* (KT29) aktif terhadap human bladder carcinoma cell line 5637 dan diperoleh nilai IC_{50} sebesar 0,34 mM lebih aktif dibandingkan etoposida sebagai kontrol positif ($IC_{50} = 0,6$ μ M). Metabolit kapang laut juga bersifat anti HIV misalnya WIN-6-6306 dari *Aspergillus flavipes* dan equisetin dari *Fusarium equiseti* serta sebagai antibiotik misalnya verticillin C dari *Verticillium* sp. (Wiese et al, 2011). Penelitian kandungan kimia kapang laut Indonesia belum banyak dilakukan terlebih lagi kapang dari perairan laut Kalimantan secara khusus. Kapang laut di daerah tropis diketahui

lebih melimpah dan lebih beragam dibandingkan daerah sub tropis dan laut dingin (Supriyono dan Wijayanti, 2000).

Eksplorasi senyawa metabolit sekunder dari laut termasuk dari kapang perlu terus dan segera dilakukan untuk menemukan senyawa aktif untuk meningkatkan kualitas hidup manusia. Dari berbagai literatur menunjukkan bahwa metabolit sekunder dari kapang sangat unik, mempunyai kerangka struktur dan bioaktivitas yang beragam. Keragaman tersebut dipengaruhi oleh habitatnya, baik kedalaman, jumlah oksigen, pH, tingkat salinitas, tingkat alkalinitas, temperatur, dan lain-lain (Bhatnagar and Kim, 2010; Jones, 2000; Ker et al, 2011; Sepcic et al, 2011; Thomas et al, 2010).

METODOLOGI

Isolasi strain kapang

Sampel gorgonian dalam media gliserin diambil dari freezer dan dibiarkan hingga mencair pada suhu kamar. Cairan dituang dalam plat agar yang mengandung media *Rose Bengal Chloramphenicol* (RBC). Kapang yang tumbuh dipisahkan berdasarkan morfologi dan ditanam dalam cawan petri dengan media PDA (*Potato Dextrose Agar*), sampai diperoleh isolat tunggal. Isolat Kp 2 diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis.

Fermentasi kapang dalam media cair

Kapang tunggal ditanam dalam media PDA dalam tabung reaksi. Setelah tumbuh dengan baik (5 hari), inokulum kapang dipindahkan ke dalam media malt ekstrak cair volume 60 mL. Starter umur 7 hari dipindahkan ke dalam 540 mL medium malt ekstrak yang dilarutkan dalam air laut buatan dalam sebuah botol 1000 mL dalam kondisi steril. Kapang diinkubasi selama 60 hari pada suhu kamar. Fermentasi diakhiri dengan menambah 200 mL etil asetat.

Ekstraksi hasil fermentasi

Media fermentasi kapang disaring. Supernatan dipartisi dengan etil asetat 3x200 mL. Ekstrak etil asetat dievaporasi sampai pelarut menguap. Setelah pelarut diuapkan, ekstrak diuji daya sitotoksiknya.

Uji sitotoksik

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT menggunakan sel lestari T47D. Sel tersebut dikultur dalam medium RPMI 1640, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, fungison 0,5%, dan penisilin-streptomisin 2%. Ekstrak kapang dibuat dengan dosis 12,5, 25, 50, 100, 200 dan 400 µg/mL. Suspensi sel dengan kepadatan 5×10^4 /mL dimasukkan ke dalam *microplate* 96 *well* dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ pada suhu 30°C dengan aliran CO₂ 5 mL/menit. Setelah 12 jam media dibuang dan diganti dengan 100 µL media yang mengandung ekstrak uji dengan dosis seperti di atas.

Dalam pengujian ini digunakan 3 jenis kontrol yaitu kontrol sel, kontrol sampel, dan kontrol media. Mikroplat diinkubasikan kembali selama 24 jam dalam inkubator CO₂. Setelah 24 jam, media dibuang lagi dan ditambahkan 100 µL media yang sudah mengandung MTT (1 mL stok MTT diencerkan 10 kali dalam *Phospat Buffer Saline*/PBS). Mikroplat diinkubasikan kembali pada inkubator CO₂. Setelah 4 jam, ditambahkan 100 µL *sodium dedosil sulfat* (SDS) 10% untuk melarutkan kristal formazan yang terbentuk. Mikroplat diinkubasi kembali selama 12 jam pada suhu kamar lalu dibaca absorbansinya dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm. Data absorbansi tiap sumuran digunakan untuk menghitung viabilitas sel T47D yang diberi perlakuan dibandingkan dengan kontrol (tanpa perlakuan). Nilai *inhibition concentration 50* (IC₅₀) dihitung dengan analisis probit. Viabilitas sel T47D dihitung berdasarkan rumus:

$$B/A \times 100\%$$

Keterangan: A = absorbansi sel tanpa perlakuan,
B = absorbansi sampel,

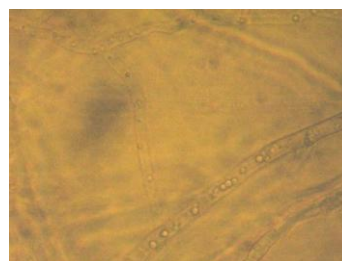
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat Kp 2 secara makroskopis terlihat berwarna ungu kotor. Permukaan koloni berspora, teksturnya kasar dan zonasi daerah tumbuhnya menyebar. Kapang ini tumbuh dengan cepat, tidak menghasilkan eksudat dan balik koloninya berwarna hijau (gambar 1). Kapang ini diduga merupakan *Sporotrichum* spp.

Proses fermentasi dilakukan pada suhu ruang dalam kondisi statis. Kapang berada terapung di atas media. Media fermentasi dipisahkan dari substrat. Supernatan disaring dan dipartisi dengan pelarut etil asetat 3 x 200mL. Pelarut etil asetat digunakan untuk mengekstrak metabolit kapang yang bersifat semi polar. Hasil partisi dievaporasi dengan penguap putar bertekanan sehingga diperoleh ekstrak kering sebanyak 50,4 mg.



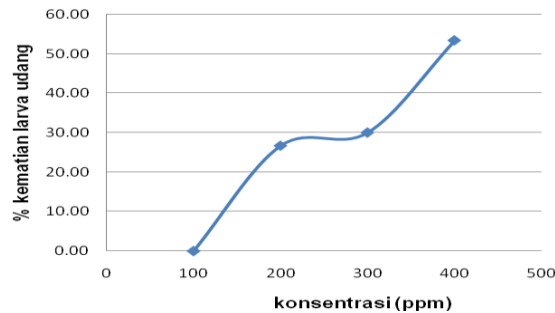
a



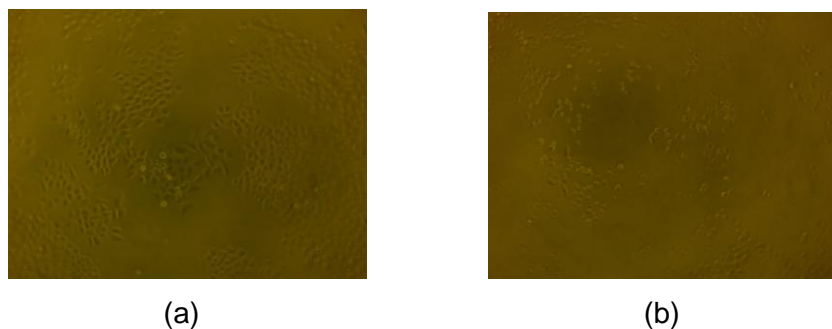
b

Gambar 1. Isolat Kp 2 dalam media PDA (a) makroskopis (b) mikroskopis

Metabolit *broth* kapang berupa ekstrak etil asetat kering kemudian dilakukan uji bioaktivitas dengan BSLT (*brine shrimp lethality test*) dan uji sitotoksisitas dengan sel kanker T47D. Uji toksisitas dengan BSLT diperoleh nilai $LC_{50} = 372,26$ ppm. Berdasarkan grafik pada gambar 2, semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin banyak larva udang yang mati. Hal ini menunjukkan bahwa metabolit Kp 2 mengandung senyawa yang bersifat toksik.

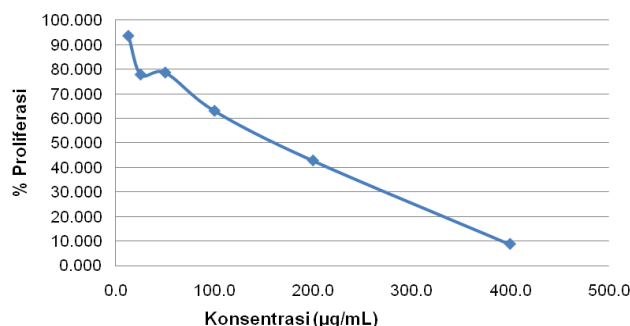


Gambar 2. Toksisitas ekstrak etil asetat metabolit Kp2



Gambar 3. Morfologi sel uji T47D dalam uji sitotoksisitas; (a) sel kontrol, (b) sel uji diberi perlakuan ekstrak kapang

Uji sitotoksik dengan sel kanker T47D menunjukkan bahwa ekstrak *broth* Kp 2 mampu menghambat proliferasi sel kanker T47D (gambar 3). Semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin besar aktivitas sitotoksiknya. Pada konsentrasi 100,00 $\mu\text{g/mL}$ proliferasi sel kanker T47D sebesar 62,99%. Pada konsentrasi 200,00 $\mu\text{g/mL}$, proliferasi sel kanker T47D 42,76%. Sedangkan pada konsentrasi 400,00 $\mu\text{g/mL}$, proliferasi sel kanker T47D hanya 8,75% (gambar 4). Berdasarkan analisis probit data hasil uji, diketahui bahwa ekstrak etil asetat metaboit Kp 2 mampu menghambat 50% proliferasi sel kanker T47D (IC_{50}) pada konsentrasi 110,18 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar 4. Persen proliferasi sel uji T47D setelah diberi perlakuan ekstrak *broth* kapang Kp 2

Gorgonian dan kapangnya banyak mengandung senyawa yang mempunyai bioaktivitas menarik seperti sitotoksik (Rodríguez et al., 1998), anti-inflammasi (Chung et al., 2012), antibakteri (Wang et al., 2011), antifouling (Nong, 2013) dan bersifat immunomodulator (Berrue and Kerr, 2009). Senyawa 2 β -Acetoxy-2-(debutyroxy) stecholide E acetate bersifat aktif sitotoksik terhadap sel kanker P-388 dengan IC₅₀= 1,59 μ g/mL, sedangkan stecholide L menunjukkan daya sitotoksik sedang terhadap sel kanker P-388 (IC₅₀= 10 μ g/mL), A-549 (IC₅₀= 2.5 μ g/mL), HT-29 (IC₅₀= 5 μ g/mL), dan MEL-28 (IC₅₀= 5 μ g/mL) (Rodríguez et al., 1998).

KESIMPULAN

Isolat Kp 2 diduga *Sporotrichum* spp. Kapang tersebut difermentasi dengan 600 mL media malt ekstrak cair, ekstrak supernatan diperoleh 50,4 mg ekstrak kering. Ekstrak tersebut dilakukan uji BSLT diperoleh LC₅₀ = 372,26 ppm dan uji sitotoksik dengan sel kanker T47D diperoleh IC₅₀ = 110,18 μ g/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Berrue, F.; Kerr, R.G., 2009, Diterpenes from gorgonian corals. *Nat. Prod. Rep.* 26, 681–710.
- Bhatnagar I and Kim S K, 2010, Marine Antitumor Drugs: Status, Shortfalls and Strategies, *Mar. Drugs*, 8, 2702-2720
- Chung, H.-M., Hong, P.-H., Su, J.-H., Hwang, T.-L., Fang, L.-S., Sung, P.-J., Wu, Y.-C., Li, J.-J, Chen, J.-J, Lu, M.-C., Wang, W.-H., 2012, Bioactive Compounds from a Gorgonian Coral *Echinomuricea* sp. (Plexauridae), *Mar. Drugs*, 10, 1169-1179
- Dewick, P.M. 1997. *Medical Natural Products, A biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex. England.
- Dhorajiya B, Malani M, Dholakiya B, 2011, Extraction and Preservation Protocol of Anti-Cancer Agents from Marine World, *Chemical Sciences Journal*, 38, accepted version, <http://astonjournals.com/csj>
- Du L, Zhu T, Fang Y, Liu H, Gu Q, Zhu W, 2007. Aspergiolide A, a novel anthraquinone derivative with naphtha (1,2,3-de) chromene-2, 7-dione skeleton isolated from a marine-derived fungus *Aspergillus glaucus*. *Tetrahedron Letters*, 63, 1085–1088.

- Du L, Feng T, Zhao B, Li D, Cai S, Zhu T, Wang F, Xiao X, Gu Q, 2010. Alkaloids from a deep ocean sediment-derived fungus *Penicillium* sp. And their antitumor activities, *Antibiotic*, 63, 165–170.
- Elsebai M. F., Kehraus S., Gütschow M. and König G. M, 2010, “Spartinoxide, a new enantiomer of A82775C with inhibitory activity toward HLE from the marine-derived fungus *Phaeosphaeria spartinae*”, *Nat. Prod. Commun.*, 5, 1071-1076.
- Jones, E.B.G., 2000, Marine fungi: some factors influencing biodiversity, *Fungal Diversity*, 4, 53-73.
- Ker, C.L., Petit, K.E., Biard, J.F. and Fleurence, J., 2011, Search for Hydrophilic Marine Fungal Metabolites: A Rational Approach for Their Production and Extraction in a Bioactivity Screening Context, *Mar. Drugs*, 9, 82-97.
- Lin X, Zhou X, Wang F, Liu K, Yang B, Yang X, Peng Y, Liu J, Ren Z and Liu Y, 2012, A New Cytotoxic Sesquiterpene Quinone Produced by *Penicillium* sp. F00120 Isolated from a Deep Sea Sediment Sample, *Mar. Drugs*, 10, 106-115.
- Nong, X.-H., Zheng, Z.-H., Zhang, X.-Y., Lu, X.-H., Qi, S.-H., 2013, Polyketides from a Marine-Derived Fungus *Xylariaceae* sp., *Mar. Drugs*, 11, 1718-1727
- Rodríguez, J., Nieto, R.M., and Carlos, J., 1998, New Briarane Stecholid Diterpenes from the Indonesian Gorgonian *Briareum* sp., *J. Nat. Prod.*, 61 (3), pp 313–317
- Septic K, Zalar P and Cimerman N G, 2011, Low Water Activity Induces the Production of Bioactive Metabolites in Halophilic and Halotolerant Fungi, *Mar. Drugs*, 9, 43-58.
- Supriyono, A., Wijayanti, L.. 2000. Eksplorasi Senyawa Aktif Dari Biota Laut Untuk Aplikasi Di Bidang Farmasi. *Kongres Ilmiah XIII Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia: kumpulan makalah*. Jakarta.
- Tarman, K., Lindequist, U., Wende, K., Porzel, A., Arnold, N., and Wessjohann, L.A., 2011, Isolation of a New Natural Product and Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Extracts from Fungi of Indonesian Marine Habitats, *Mar. Drugs*, 9: 294-306.
- Thomas, T.R.A., Kavlekar, D.P., and LokaBharathi, P.A., 2010, Marine Drugs from Sponge-Microbe Association—A Review, *Mar. Drugs*, 8, 1417-1468.
- Wang, Y.-N., Shao, C.-L., Zheng, C.-J., Chen, Y.-Y., Wang, C.-Y., 2011, Diversity and Antibacterial Activities of Fungi Derived from the Gorgonian *Echinogorgia rebekka* from the South China Sea, *Mar. Drugs*, 9, 1379-1390
- Wiese J., Ohlendorf B., Blümel M., Schmaljohann R. and Imhoff J. F., 2011, Phylogenetic identification of fungi isolated from the marine sponge *Tethya aurantium* and identification of their secondary metabolites, *Mar. Drugs*, 9, 561-585.