

Aktivitas Sitotoksik Hasil Fermentasi Isolat Kapang Endofit Dari *Garcinia forbesii* King Terhadap Sel MCF-7

L. S. Aliya¹, A. Soemijati², & A. Mun'im³

¹Fakultas Farmasi Institut Sains dan Teknologi Nasional

^{2,3}Fakultas Farmasi Universitas Indonesia

Korespondensi: lisana.aliya@gmail.com

ABSTRAK

Endofit adalah organisme yang membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan gejala negatif pada inangnya. Kapang endofit memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim dan metabolit sekunder yang memiliki khasiat terapeutik, sehingga menyimpan potensi kekayaan alam baru untuk dimanfaatkan di berbagai bidang farmasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya efek anti-kanker senyawa metabolit sekunder yang didapat dari hasil fermentasi dua isolat kapang endofit dari ranting tanaman *Garcinia forbesii* King. Dari hasil fermentasi kedua isolat, diperoleh ekstrak air, metanol, n-butanol dan etil asetat untuk masing-masing isolat, sehingga keseluruhan terdapat delapan ekstrak uji. Pada kedelapan ekstrak uji tersebut telah dilakukan uji pendahuluan dengan metode BSLT untuk memilih tiga ekstrak terbaik. ketiga ekstrak terpilih kemudian diuji sitotoksitasnya terhadap sel MCF-7 melalui metode pewarnaan merah netral dan Spektrofotometri *ELISA Plate Reader*. Pada pengujian ini, digunakan sisplatin sebagai blanko positif. Berdasarkan hasil uji terhadap ketiga ekstrak uji terpilih, diketahui bahwa seluruh ekstrak memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 dengan ekstrak yang paling aktif adalah ekstrak etil asetat dari kapang yang diisolasi dari ranting *Garcinia forbesii* King dengan nilai LC_{50} 225,22 $\mu\text{g/ml}$. Nilai tersebut relatif masih besar dibandingkan dengan blanko sisplatin yang memberikan nilai LC_{50} 8,60 $\mu\text{g/ml}$.

Kata Kunci: Kapang Endofit; *Garcinia forbesii* King; sel MCF-7.

ABSTRACT

Endophyte is microbes that colonize in the living tissues without causing any negative effect to their host plants. Endophytic fungi are capable to produce therapeutic enzymes and secondary metabolites, so they are predicted to become new resources in many pharmaceutical applications. The objective of the research was to understand the anti-cancer effect of the secondary metabolites resulted from fermentation products of four endophytic mold isolated from branch of *Garcinia forbesii* King. From the fermentation products of the two mold, extracts of water, methanol, n-buthanol and ethyl acetate had been collected from each isolates, so there were eight extracts as the total number of extracts to be tested. Pre-screening test had been carried out to the eighth extracts by using BSLT method to select three best extracts. The three selected extracts were tested for their toxicity to the MCF-7 cell line by neutral red staining and ELISA Plate Reader Spectrophotometry. In this study, cysplatine was used as the positive blank. From the cytotoxic testing of the eight selected extracts, it was found that all extracts had the cytotoxic activity to the MCF-7 cells with the most active extract was the ethyl acetate extract isolated from branch of *Garcinia forbesii* King with LC_{50} value of 225,22 $\mu\text{g/ml}$. LC_{50} number of the extract was found to be high compared to cisplatin with given LC_{50} value of 8,60 $\mu\text{g/ml}$.

Keywords: Endophytic Mold; *Garcinia forbesii* King; MCF-7 cell line.

PENDAHULUAN

Kanker merupakan suatu keadaan abnormal dari sel, di mana sekelompok sel mengalami pertumbuhan yang tidak terkontrol dengan tidak mengikuti aturan-aturan pembelahan sel. Kanker adalah penyebab utama kematian di seluruh dunia setelah penyakit kardiovaskuler (Hay et al., 2003) dan menunjukkan peningkatan prevalensi penyakit serta angka kejadian kematian dari tahun ke tahun (Mettlin, 1999) dan diperkirakan akan mencapai angka 12 juta kematian pada 2030 (WHO, 2010).

Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang pada umumnya terjadi pada kaum wanita. Walaupun sudah tampak adanya peningkatan pengobatan dan penurunan angka kematian di negara berkembang, tetapi angka kematian rata-rata akibat

kanker payudara masih berkisar 38 kematian di tiap 100.000 wanita (Berry et al., 2005).

Pengobatan kanker saat ini difokuskan pada kemoterapi, radiasi dan pembedahan, sampai terapi alternatif menggunakan tanaman obat. Beberapa jenis tanaman di Indonesia dikenal mampu menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas farmakologis sehingga dapat dimanfaatkan potensinya sebagai bahan baku sediaan obat. Mengingat kebutuhan bahan baku obat yang semakin meningkat baik jumlah maupun macamnya maka potensi sumber daya alam Indonesia tersebut perlu digali dan dikembangkan lebih jauh lagi.

Namun demikian, kendala yang dihadapi dalam pemanfaatan tanaman sebagai bahan baku obat adalah dalam hal kendala budidaya tanaman induk, karena eksplorasi tanaman secara terus menerus tanpa adanya

regenerasi dikhawatirkan dapat merusak keseimbangan ekosistem (Radji, 2005). Untuk mengantisipasi hal tersebut, maka saat ini banyak digalakkan pencarian sumber alternatif bahan baku obat melalui organisme endofit.

Sebagai penghasil senyawa bioaktif bahan baku obat, tanaman merupakan sumber penting untuk memperoleh kapang endofit yang terkolonisasi dan hidup di dalamnya (Wijayakrutta et al., 2005). Beberapa spesies kapang endofit diketahui dapat menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas terapeutik yang sama dengan tanaman inangnya. Melalui pemanfaatan kapang endofit, senyawa bioaktif dapat diperoleh melalui proses fermentasi aerobik sehingga memungkinkan untuk diproduksi secara berulang-ulang dalam skala industri dan dalam waktu singkat tanpa memerlukan eksplorasi tanaman inang secara menyeluruh sehingga tidak merusak keseimbangan ekosistem.

Fungi atau kapang endofit dikenal luas memiliki berbagai enzim dan penghasil metabolit sekunder sehingga memiliki arti ekonomis penting karena menyimpan potensi sumber daya yang hampir tak terbatas (Strobel, 2005). Namun demikian tampaknya data yang diperoleh belum cukup memadai untuk diaplikasikan di bidang pengobatan. Oleh karena itulah saat ini mulai banyak dilakukan penelitian mengenai potensi yang dimiliki oleh kapang endofit.

Telah dilakukan penelitian terdahulu mengenai uji khasiat dari metabolit sekunder yang diperoleh dari hasil fermentasi kapang endofit. Beberapa potensi yang telah diuji yaitu toksisitas dan antimikroba, antiinflamasi, antimalaria, antiproliferasi dan antioksidan (Hay et al., 2003; Taqwim, 2007; Nakatani et al., 2004; Moonkarndi, 2004). Selain itu, tengah diteliti dan dikembangkan pula isu terkini yang juga merupakan penelitian lanjutan dari penelitian sebelumnya, adalah uji sitotoksik terhadap sel kanker. Dari beberapa penelitian, diketahui bahwa terdapat kapang endofit yang mampu menghasilkan metabolit sekunder seperti senyawa taksol dan xanthon yang telah teruji memiliki aktivitas sitotoksik (Strobel et al., 1997; Pompakakui et al., 2006). Telah dilakukan pula penelitian lanjutan mengenai identifikasi isolat secara molekuler dari beberapa isolat yang telah diuji aktivitas toksisitasnya, sehingga beberapa isolat kapang endofit yang telah teruji tersebut telah teridentifikasi spesiesnya secara lengkap dengan sekuens genom yang dimilikinya (Nugraheni, 2008).

Dari BSLT hasil penelitian sebelumnya, diketahui bahwa hasil fermentasi isolat kapang endofit dari tanaman *Garcinia forbesii* dan *Garcinia porrecta* mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba dan bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* (Taqwim, 2007), sehingga diduga pula memiliki aktivitas sebagai antikanker. Hal ini didukung pula oleh penelitian lain yang menunjukkan sejumlah data eksperimental yang membuktikan bahwa sebagian besar senyawa dari tanaman yang memiliki aktivitas antimikroba umumnya menunjukkan potensi sebagai

antikanker karena sifat toksisitas yang dimilikinya (Lisadawati, 2002).

Berdasarkan hasil penelitian uji toksisitas secara BSLT tersebut di atas, maka dilakukanlah penelitian ini untuk mengetahui lebih jauh aktivitas sitotoksik hasil fermentasi metabolit sekunder isolat-isolat kapang endofit dari ranting tanaman *Garcinia forbesii* serta daun dan akar *Garcinia porrecta* terhadap sel kanker payudara MCF-7.

METODE

Kabinet laminar (Forma Scientific), inkubator sel dengan aliran oksigen 95% dan karbondioksida 5% (Forma Scientific), tangki nitrogen cair (Locator JR Thermolyne), labu kultur jaringan/*culture flask* 40 ml (Nunclon), pelat kultur jaringan 96 sumuran/*tissue culture plate* (Nunclon), mikroskop (Nikon TMS dan Euromex), ELISA *Plate Reader* (Stat Fax-2100, Awareness Technology Inc.), sentrifugator (Kubota dan Porta Centrifuge), neraca analitik (Precisa 300A), vortex mixer (VM 2000), evaporator rotasi vakum (IKA), *freeze dryer* (Scanvac), pH meter (Meterlab), hemositometer (Improved Neubauer, Superior Marienfeld), penyaring berdiameter pori 0,2 µm steril (Nalgene dan Ministart), spuit 10 ml steril (Terumo), pipet serologik 5,0 ml steril (Falcon), mikropipet (Eppendorf), tabung sentrifugasi (Falcon) dan tabung Eppendorf 1,0 ml (Eppendorf), Program Probit 1.5 dan SPSS 15.

Isolat kapang endofit yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 4 isolat, yaitu isolat 4.RF1 dan 12.RF3 yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi FMIPA UI. Penamaan isolat mengikuti penamaan yang diberikan peneliti sebelumnya yang terdiri dari 4 digit tata nama. Digit pertama merupakan nomor urut isolat secara keseluruhan. Digit kedua dan ketiga merupakan kode asal tanaman di mana kapang endofit berasal, yaitu kode RF untuk Ranting *Garcinia forbesii* King. Sedangkan digit terakhir merupakan nomor urut kapang yang menjelaskan digit kedua dan ketiga (nomor urut kapang yang diisolasi dari satu bagian tanaman yang sama). Sel MCF-7 (sel kanker payudara manusia) ATCC *cell lines* HTB-22TM yang diperoleh dari Institut Sains Biologi, Fakultas Biologi dan Sains Universitas Malaya.

Dimetil sulfoksida/DMSO (Sigma), *fetal calf serum* (Caisson Labs Inc.), sisplatin (Platosin[®], Pharmachemie B.V.), *phosphate buffered saline*, penisilin-streptomisin (Gibco), HEPES, merah netral (Merck), biru tripan (Merck), natrium dodesil sulfat (Merck), tripsin-EDTA (Gibco), NaHCO₃ (Merck), CaCO₃ (Merck), etil asetat p.a (Merck), n-butanol p.a (Merck), metanol p.a (Merck), *lactophenol cotton blue* (Laboratorium Parasitologi FK UI), *Potato Dextrose Agar/PDA* (Difco), *Potato Dextrose Broth/PDB* (Difco), *Yeast Extract* (Oxoid), *Rosewell Park Memorial Institute* 1640/RPMI 1640 (Gibco) dan air suling.

Peremajaan Isolat Kapang Endofit

Isolat kapang endofit yang tumbuh pada media isolasi diremajakan di dalam medium PDA. Peremajaan dilakukan dengan cara hifa dari tiap koloni dipindahkan dengan ose steril ke dalam medium PDA pada cawan petri, kemudian diinkubasi selama 10-14 hari pada suhu kamar (Maretyani, 2006). Setiap koloni kapang yang tumbuh kemudian dipindahkan ke dalam media agar miring. Setiap isolat kapang endofit dibuat duplo pada media PDA cawan petri dan agar miring, masing-masing digunakan sebagai kultur stok (*culture stock*) dan kultur kerja (*working culture*) (Yulia, 2004). Identifikasi kapang endofit dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi makroskopis dilakukan dengan cara mengamati bentuk morfologi koloni jamur serta kecepatan pertumbuhan koloni. Sementara indentifikasi secara mikroskopis dilakukan dengan cara menggunakan pewarnaan dengan *lactofenol cotton-blue* (Taqwim, 2007).

Pembuatan Medium Fermentasi Kapang Endofit

Fermentasi kapang endofit dilakukan di dalam medium PDY (*Potato Dextrose Yeast*). Untuk membuat PDY, disiapkan medium PDB (*Potato Dextrose Broth*) 24 gram, *Yeast Extract* 4 gram dan kalsium karbonat 5 gram. Seluruh bahan dimasukkan ke dalam labu bulat dan di larutkan dengan air suling hingga 1 liter. Aduk hingga larut dan homogen sambil dipanaskan hingga mendidih dan kemudian bahan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Kemudian dituang ke dalam labu erlenmeyer sebanyak 500 ml.

Fermentasi Kultur Kapang Endofit

Koloni kapang yang telah murni dalam medium PDA cawan petri diambil sebesar kira-kira 2x2 cm² berikut agar, kemudian diinokulasikan masing-masing ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 500 ml medium PDY. Kultur selanjutnya diinkubasi dan diaduk pada kecepatan 150 rpm selama 14 hari pada suhu kamar (Yulia, 2004).

Ekstraksi Kultur Hasil Fermentasi

Suspensi koloni kapang endofit yang diperoleh dari proses fermentasi dibagi menjadi 3 bagian. Bagian pertama disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit dan supernatan yang diperoleh dipisahkan dari lapisan biomasnya dan menjadi larutan uji ekstrak air. Ke dalam lapisan biomas, ditambahkan pelarut metanol ditambahkan dan dihomogenkan dengan vorteks selama 5 menit. Setelah homogen, campuran biomas dan metanol disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit dan dipisahkan lapisan supernatan dari biomasnya (Yulia, 2004). Supernatan yang diperoleh menjadi larutan uji ekstrak metanol.

Suspensi koloni kapang bagian kedua dan ketiga masing-masing diekstraksi dengan etil asetat (Kubicek and Druzhinina. 2007) dan n-butanol. Larutan pengeksrak ditambahkan ke dalam suspensi koloni kapang sebanyak 50% dari volume suspensi koloni kapang endofit yang diperoleh, dihomogenkan dengan

vorteks selama 5 menit lalu disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan kemudian dipisahkan dari biomasnya dan menjadi larutan uji ekstrak etil asetat dan ekstrak butanol.

Masing-masing supernatan yang diperoleh dari proses tersebut disaring dengan filter bakteri dengan diameter pori 0,22 µm (Kubicek and Druzhinina. 2007). Supernatan (larutan uji ekstrak air) kemudian dikeringkan dengan metode liofilisasi (*freeze drying*) sedangkan larutan uji ekstrak metanol, etil asetat dan butanol dikeringanginkan di dalam desikator atau dipekatkan dengan menggunakan evaporator rotasi vakum pada suhu tidak lebih dari 50°C (Kubicek and Druzhinina. 2007). Ekstrak n-butanol kemudian dikentalkan menggunakan evaporator rotasi vakum pada suhu di bawah 50°C (Kubicek and Druzhinina. 2007) dan disimpan dalam desikator secara aseptis.

Uji Toksisitas Metode BSLT

Dari ekstrak kering dibuat larutan induk 5000 µg/ml dengan menggunakan pelarut masing-masing. Dari larutan induk dipipet masing-masing 4 µl, 40 µl dan 400 µl ke dalam multiwell 24 sumuran dan dibiarkan hingga tidak berbau pelarut. Sepuluh larva *Artemia salina* kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing sumuran dan ditambahkan air laut hingga 2 ml, sehingga konsentrasi akhir dalam tiap sumuran adalah 10, 100 dan 1000 µg/ml. Sebagai kontrol negatif diberi perlakuan yang sama tanpa penambahan sampel. Masing-masing perlakuan dibuat triplo. Pengujian diamati 24 jam kemudian dengan menghitung jumlah larva yang mati dari tiap konsentrasi dan dihitung nilai LC₅₀ masing-masing ekstrak uji menggunakan program probit (Taqwim, 2007).

Uji Sitotoksisitas terhadap Sel MCF-7

Pembuatan Larutan Uji

Ekstrak kering masing-masing isolat ditimbang sebanyak 20 mg di dalam tabung Eppendorf dan dilarutkan dalam 1 ml DMSO, sehingga diperoleh larutan induk I dengan konsentrasi 20 µg/µl. Larutan induk I kemudian dipipet sebanyak 100 µl kemudian diencerkan dengan 900 µl medium RPMI 1640, sehingga diperoleh larutan induk II dengan konsentrasi 2 µg/µl. Seluruh pengerjaan dilakukan secara aseptis di dalam ruang LAF (*Laminar Air Flow*).

Larutan induk II dipipet masing-masing sebanyak 50, 100, 150, 200 dan 250 µl, kemudian dilakukan pengenceran dengan medium RPMI 1640 masing-masing sebanyak 950, 900, 850, 800 dan 750 µl, sehingga diperoleh konsentrasi larutan uji 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 dan 0,5 µg/µl.

Pembuatan Larutan Sisplatin (Blangko Positif)

Larutan sisplatin dengan konsentrasi 1 µg/µl dipipet masing-masing sebanyak 50, 100, 200, 300 dan 400 µl, kemudian dilakukan pengenceran dengan medium RPMI 1640 masing-masing sebanyak 950, 900,

850, 800, 700 dan 600 µl, sehingga diperoleh konsentrasi akhir sisplatin 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 dan 0,4 µg/µl.

Pembuatan Larutan Blangko DMSO

Larutan DMSO dipipet sebanyak 100 µl dan ditambahkan 900 µl air suling sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi DMSO 10%. Larutan tersebut dipipet masing-masing sebanyak 200 µl, kemudian diencerkan dengan medium RPMI 1640 masing-masing sebanyak 800 µl, sehingga diperoleh larutan DMSO dengan konsentrasi 2%.

Pembuatan Medium Kultur RPMI 1640

Kalibrasi gelas piala untuk volume 1 liter. Isi dengan air suling steril sebanyak 900 ml. Masukkan serbuk medium RPMI 1640 yang mengandung L-glutamin sebanyak 10,4 gram lalu tutup dengan *aluminium foil*. Letakkan gelas piala di atas pengaduk magnetik lalu aduk sampai larut. Masukkan 2 ml penisilin-streptomisin, 2 g natrium bikarbonat, dan 0,52 g dapar HEPES, aduk kembali. Larutan distabilkan pada pH 7,2 dengan menggunakan pH meter. Biarkan campuran teraduk homogen, kemudian cukupkan volume dengan air suling sampai 1 liter. Masukkan selang karet silikon, botol kultur dan filter ke dalam *laminar air flow* dan dipasang pada alat *pulsed pump*. Ujung selang lain dimasukkan ke dalam gelas piala. Hidupkan pompa dan saring dengan bakteri filter 0,2 µm. Larutan medium RPMI 1640 disimpan pada suhu 2-8°C (Freshney, 2005).

Pemeliharaan Kultur Sel MCF-7

Sel MCF-7 dipelihara dalam 2 ml medium RPMI 1640 yang disuplementasi 20% FCS dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C, 5% CO₂. Sel diperiksa setiap hari di bawah mikroskop dan diganti dengan medium kultur yang baru setiap 3 hari (Phelan, 1998). Sel kemudian disubkultur setelah mencapai konfluensi 80% dengan menggunakan larutan tripsin

Perhitungan Persentase Kematian Sel MCF-7

Perhitungan persentase kematian sel MCF-7 oleh larutan uji dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\frac{\text{Serapan blanko DMSO} - \text{Serapan larutan uji}}{\text{Serapan blanko DMSO}} \times 100\%$$

Sedangkan perhitungan persentase kematian sel MCF-7 oleh sisplatin dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\frac{\text{Serapan kontrol negatif} - \text{Serapan Sisplatin}}{\text{Serapan kontrol negatif}} \times 100\%$$

Analisis Data

Dari data persentase kematian sel MCF-7, ditentukan nilai LC₅₀ melalui analisis regresi linier, analisis varian (ANOVA) satu arah untuk melihat hubungan antar perlakuan dengan persentase kematian sel dan uji beda nyata terkecil sebagai analisis lanjutan ANOVA. Sebelumnya dilakukan uji kenormalan Shapiro-Wilk dan homogenitas Levene terlebih dahulu.

0,25%. Kepadatan sel dihitung dengan metode tripan blue.

Pengujian Sitotoksitas Terhadap Sel MCF-7

Sebuah pelat kultur jaringan 96 sumuran digunakan untuk pengujian. Pelat terdiri dari 12 kolom yang diberi simbol 1 sampai 12 dan 8 baris yang diberi simbol A sampai H. Pelat diisi dengan larutan uji, blangko DMSO, kontrol positif dan kontrol negatif. Pelat diinkubasikan selama 24 jam.

Ke dalam setiap sumuran pada pelat 96 dipipet dan dimasukkan 100 µl suspensi sel MCF-7. Sel diinkubasi selama 1 hari dalam inkubator sel pada 37°C. Pada hari kedua, ke dalam sumur uji pelat 1 dan 2 ditambahkan 100 µl larutan uji masing-masing dalam konsentrasi 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 dan 0,5 µg/µl, sehingga diperoleh konsentrasi akhir 50, 100, 150, 200 dan 250 µg/ml. Pada sumur kontrol negatif ditambahkan 100 µl medium RPMI 1640, sedangkan pada sumur kontrol positif ditambahkan larutan sisplatin dengan konsentrasi 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 dan 0,4 µg/µl sehingga diperoleh konsentrasi akhir 25, 50, 100, 150, 200 µg/ml. Pada sumur blanko pelat 1 dan 2, ditambahkan 100 µl larutan DMSO dalam medium RPMI 1640 dengan konsentrasi 2%. Pelat kemudian kembali diinkubasi di dalam inkubator sel pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pada akhir periode inkubasi, seluruh medium dibuang dan ke dalam setiap sumuran ditambahkan 200 µl merah netral 0,5% dan diinkubasi kembali selama 2 jam pada suhu 37°C dalam inkubator sel. Setelah 2 jam, merah netral dibuang dan sel dicuci dengan 300 µl PBS. Ke dalam tiap sumuran ditambahkan 300 µl natrium dodesil sulfat 1% dan sel diinkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 37°C dalam inkubator sel. Pelat kultur jaringan kemudian dimasukkan ke dalam ELISA *Plate Reader* dan dibaca serapannya pada panjang gelombang 492 nm dengan panjang gelombang referensi 630 nm.

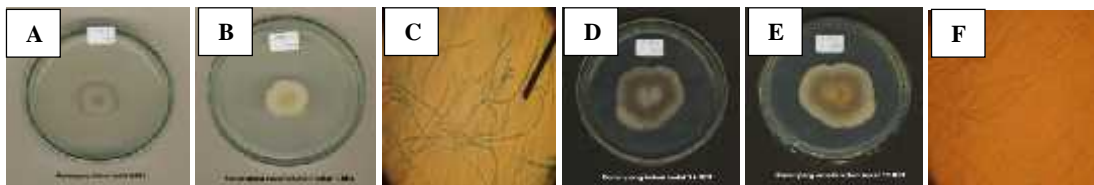
HASIL DAN PEMBAHASAN

Tanaman dari genus *Garcinia* dipilih karena merupakan salah satu genus tumbuhan yang banyak dimanfaatkan dalam pengobatan secara tradisional, dan diketahui banyak mengandung senyawa xanton yang dikenal memiliki aktivitas farmakologis (Maretyani, 2006). Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa genus *Garcinia* memiliki berbagai aktivitas

farmakologis seperti antimikroba, antimalaria, antiproliferasi dan antioksidan, serta antikanker (Hay et al., 2003; Moonkarndi et al., 2004; Atika, 2007; Radji et al., 2004).

Secara umum, penelitian ini dilakukan dalam dua tahap, tahap pertama yaitu tahapan isolasi metabolit sekunder yang mencakup peremajaan isolat, fermentasi dan ekstraksi, sedangkan tahapan kedua merupakan tahap uji aktivitas sitotoksik menggunakan kultur sel kanker payudara MCF-7.

Isolat kapang endofit diremajakan terlebih dahulu dengan cara ditanam pada media PDA. Koloni yang telah ditanam selama 7 hari kemudian diamati makroskopik dan mikroskopiknya. Pengamatan secara makroskopis meliputi pengukuran laju pertumbuhan koloni dan penampang koloni dan sebalik koloni. Sedangkan secara mikroskopis, dilakukan pengamatan struktur hifa di bawa mikroskop, yang meliputi ada tidaknya septa dan inti, bentuk sporangiofor atau konidiofor serta spora atau konidia yang dihasilkan.



Gambar 1. Penampang makroskopis muka koloni isolat 4.RF1 (A); penampang sebalik koloni isolat 4.RF1 (B); penampang mikroskopis hifa isolat 4.RF1 (C). Penampang makroskopis muka koloni isolat 12.RF3 (D); penampang sebalik koloni isolat 12.RF3 (E); penampang mikroskopis hifa isolat 12.RF3 (F).

Kapang endofit 4.RF1 berasal dari ranting tanaman *Garcinia forbesii* King. Pada pengamatan makroskopis, isolat ini memiliki hifa berwarna putih dengan warna coklat pada bagian tengah (Gambar 1A). Pada usia 14 hari diameter koloni sebesar 4 cm. Pada penampang sebalik koloni, terlihat warna kuning kecoklatan pada bagian tengah yang dikelilingi oleh hifa berwarna putih (Gambar 1B). Pengamatan secara mikroskopis pada perbesaran 400x memperlihatkan hifa yang tidak bersekat, memiliki konidiofor yang merupakan cabang pendek dari hifa vegetatif sehingga tampak seperti tonjolan-tonjolan kecil (Gambar 1C).

Kapang endofit 12.RF3 juga berasal dari ranting tanaman *Garcinia forbesii*. Pada pengamatan makroskopis, permukaan koloni terlihat seperti beludru halus berwarna putih (Gambar 1D) dengan sebalik koloni berwarna putih dengan bagian tengah kecoklatan (Gambar 1E). Pada usia 14 hari diameter koloni sebesar 8 cm. Pengamatan mikroskopis pada perbesaran 400x memperlihatkan struktur hifa yang sangat halus dan belum berhasil teramati struktur spesifiknya (Gambar 1F).

Proses fermentasi dilakukan pada saat koloni mencapai pertumbuhan optimum, yaitu pada saat umur koloni berkisar antara 7–14 hari. Fermentasi dilakukan selama 14 hari pada suhu kamar di bawah kondisi penggojokan dengan *rotary shaker* dengan putaran 150 rpm yang dimaksudkan untuk meningkatkan aerasi medium sehingga kadar oksigen yang dibutuhkan selama fermentasi aerob dapat tetap dipertahankan (Wahyudi, 1998). Penambahan kalsium karbonat bertujuan untuk meningkatkan pH medium yang akan menurun dengan adanya asam-asam yang diproduksi selama fermentasi. Fermentasi dihentikan setelah 14 hari, yaitu pada saat pertumbuhan koloni telah mencapai fase stasioner (Soemiati, 2000). Hal tersebut dikarenakan metabolit sekunder sudah terkumpul dan siap dipanen pada fase stasioner (Roosheroe and Sjamsuridzal, 2006).

Suspensi koloni isolat yang telah difermentasi selanjutnya dapat diekstraksi menggunakan berbagai organik yang berbeda polaritasnya seperti metanol, butanol dan etil asetat untuk memperoleh metabolit sekundernya. Metanol digunakan untuk mengekstraksi biomassa kapang yang telah dipisahkan dari supernatannya (Yulia, 2004), sedangkan butanol dan etil asetat digunakan untuk mengekstraksi suspensi koloni hasil fermentasi (Mackeen et al., 2002). Biomassa atau suspensi koloni yang telah ditambahkan dengan pelarut kemudian divorteks yang bertujuan untuk menarik metabolit sekunder ke fraksi pelarut organik. Campuran selanjutnya disentrifugasi untuk memisahkan fraksi-fraksi campuran. Fraksi pelarut organik yang diperoleh kemudian difiltrasi menggunakan bakteri filter dengan diameter pori 0,2 μ m untuk menghilangkan miselia fungi yang masih terbawa dan bakteri yang berpotensi sebagai kontaminan (Kubicek and Druzhinina, 2007). Ekstrak kemudian dipekatkan menggunakan evaporator rotasi vakum dengan kondisi suhu di bawah 50°C dan dikeringkan secara aseptis dalam desikator untuk menghindari kerusakan senyawa apabila dikeringkan pada suhu tinggi (Kubicek and Druzhinina, 2007). Karena pengeringan ekstrak air dengan cara pemanasan pada suhu rendah tidak memungkinkan, maka pengeringan dilakukan dengan cara liofilisasi dengan menggunakan *freeze dryer*.

Pengujian praskrining dilakukan pada kedelapan ekstrak dengan metode BSLT menggunakan Larva *Artemia salina* berumur 48 jam (*nauplii*) untuk memperoleh ekstrak terbaik berdasarkan nilai LC₅₀. Hasil BSLT kedelapan ekstrak uji yang diperoleh dengan program Probit menunjukkan ekstrak metanol merupakan fraksi yang kurang aktif dibandingkan dengan ekstrak lainnya, hal ini terlihat dari nilai LC₅₀ yang besar, yaitu antara 100 – 400 μ g/ml dan satu ekstrak dinyatakan tidak aktif karena memiliki nilai LC₅₀ yang lebih besar dari 1000 μ g/ml. Sedangkan ekstrak yang paling aktif dari keempat jenis ekstrak adalah

adalah ekstrak air. Hal ini terlihat dari nilai LC_{50} yang kecil, yaitu di bawah $50 \mu\text{g/ml}$ (Tabel 1).

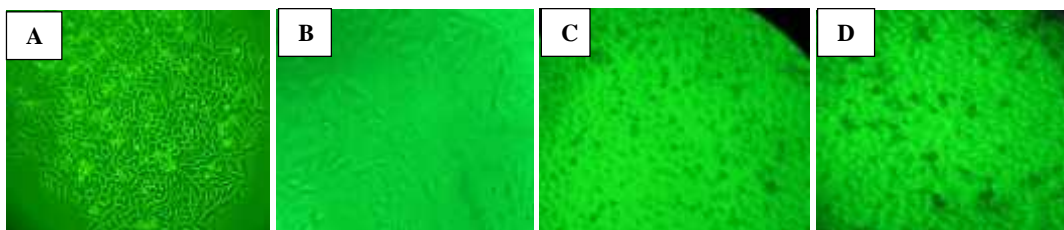
Berdasarkan nilai LC_{50} kedelapan ekstrak, metanol memiliki nilai LC_{50} yang paling tinggi, artinya ekstrak metanol kurang toksik dibandingkan dengan ekstrak lainnya. Hal ini diduga karena metanol hanya digunakan untuk mengekstraksi biomassa yang telah dipisahkan dari suspensi hasil fermentasi, dengan tujuan untuk menarik metabolit sekunder yang mungkin masih terdapat di dalam sel. Berdasarkan hasil tersebut dapat ditarik kesimpulan bahwa metabolit sekunder yang dihasilkan melalui fermentasi ini diproduksi di luar biomassa kapang dan tersuspensi di dalam medium dan tidak terakumulasi di dalam biomassa. Selain itu, diketahui pula nilai LC_{50} ekstrak air relatif lebih rendah dibanding ekstrak lainnya. Dengan membandingkan prosedur kerja antara ekstrak air dan ekstrak organik (etil asetat dan butanol), dapat ditarik dugaan mengapa dapat terjadi demikian, yaitu karena supernatan air digunakan seluruhnya tanpa fraksinasi, sedangkan ekstrak etil asetat dan butanol masing-masing merupakan hasil fraksinasi dari suspensi fermentasi. Dengan demikian, jumlah metabolit sekunder pada ekstrak air jauh lebih besar dibandingkan dengan ekstrak organik.

Kesulitan dalam melakukan pengujian ini adalah pada saat melakukan pengujian di dalam multiwell 24 sumuran. Ekstrak yang sudah mengering pada dinding sumur menjadikannya lebih sukar larut pada saat dicampur kembali dengan medium air laut buatan, sehingga konsentrasi akhir ekstrak terlarut menjadi bias. Sebagai alternatif untuk mengatasi permasalahan serupa pada percobaan selanjutnya, dapat dipergunakan DMSO sebagai pengganti pelarut organik dapat langsung dilakukan pengujian tanpa perlu menguapkan pelarut organik terlebih dahulu.

Pada pengujian sitotoksitas, digunakan kultur sel kanker payudara manusia MCF-7 sebagai sel

uji. Jumlah sel yang dibutuhkan untuk pengujian sitotoksitas menurut ATCC adalah $1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ sel/ml atau $10^3 - 10^5$ sel dalam tiap sumur. Jumlah tersebut merupakan jumlah yang umum dipakai agar serapan dapat cukup besar sehingga dapat terdeteksi dengan baik oleh alat (Clarke et al., 1996). Kepadatan sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 6×10^4 sel/ml tiap sumurnya, dalam $100 \mu\text{l}$ medium RPMI 1640 yang disuplementasi dengan FCS 10% sebagai sumber nutrisi sel.

Pengujian sitotoksitas dimulai dengan memasukkan sel MCF-7 yang telah dihitung ke dalam pelat kultur jaringan 96 sumuran dan diinkubasi terlebih dahulu selama 24 jam untuk memperoleh kondisi optimum pengujian, yaitu pada saat sel mencapai fase log. Setelah inkubasi, sumuran berisi suspensi sel diberi perlakuan yang berbeda-beda, yaitu dilakukan penambahan larutan uji dalam DMSO, sisplatin sebagai kontrol positif, dan blanko DMSO kemudian diinkubasi kembali selama 24 jam. DMSO digunakan sebagai pelarut karena DMSO dapat berpenetrasi ke dalam sel dan dikategorikan bersifat non toksik sampai pada konsentrasi 3% (Wadhvani et al., 2003). Pada akhir masa inkubasi, sel diamati kembali di bawah mikroskop untuk membandingkan struktur sel antara sebelum (Gambar 2A) dan setelah diberikan perlakuan dan untuk melihat kematian yang terjadi. Setelah perlakuan, pada sumur blanko negatif, sel masih terlihat hidup dan melekat pada dasar sumuran (Gambar 2B), sedangkan pada sumuran uji, sel tampak mengalami kematian yang terlihat dari perubahan struktur morfologinya (Gambar 2C - 2D). Sel viabel yang melekat pada dasar sumuran tampak jernih berbentuk bulat atau memanjang menyerupai daun, sedangkan sel mati berbentuk serpihan berwarna hitam.



Gambar 2. Sel MCF-7 (A); blanko negatif sel MCF-7 setelah pengujian (B); sel MCF-7 setelah dilakukan pengujian dengan sampel konsentrasi akhir $200 \mu\text{g/ml}$ (C); sel MCF-7 setelah dilakukan pengujian dengan blanko positif sisplatin konsentrasi akhir $200 \mu\text{g/ml}$ (D).

Sel viabel kemudian dilisis untuk membebaskan merah netral yang terkandung dalam sel dengan menggunakan larutan SDS 1%. Serapan merah netral dalam larutan SDS diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 492 nm dengan panjang gelombang referensi 630 nm . Serapan yang dihasilkan berbanding lurus dengan jumlah sel yang masih aktif melakukan metabolisme (sel viabel) sehingga persentase kematian sel dapat dihitung dengan membandingkannya dengan blanko DMSO.

Dari grafik hubungan antara konsentrasi, baik konsentrasi larutan uji maupun blanko sisplatin, dengan persentase kematian sel terlihat adanya peningkatan kematian sel seiring dengan meningkatnya konsentrasi (Gambar 3). Nilai LC_{50} , nilai yang menggambarkan konsentrasi minimum yang dibutuhkan untuk menghambat sel MCF-7 sebanyak 50% dari jumlah awal, diperoleh dengan menggunakan analisis regresi linier. Semakin kecil nilai LC_{50} suatu larutan uji, maka dikatakan bahwa potensi aktivitas sitotoksiknya semakin tinggi. Dibandingkan dengan blanko sisplatin yang

memiliki nilai LC_{50} 78,94 $\mu\text{g/ml}$, seluruh ekstrak yang diuji memiliki nilai LC_{50} yang cukup besar. Ekstrak yang paling toksik adalah ekstrak etil asetat isolat 4.RF3 yaitu

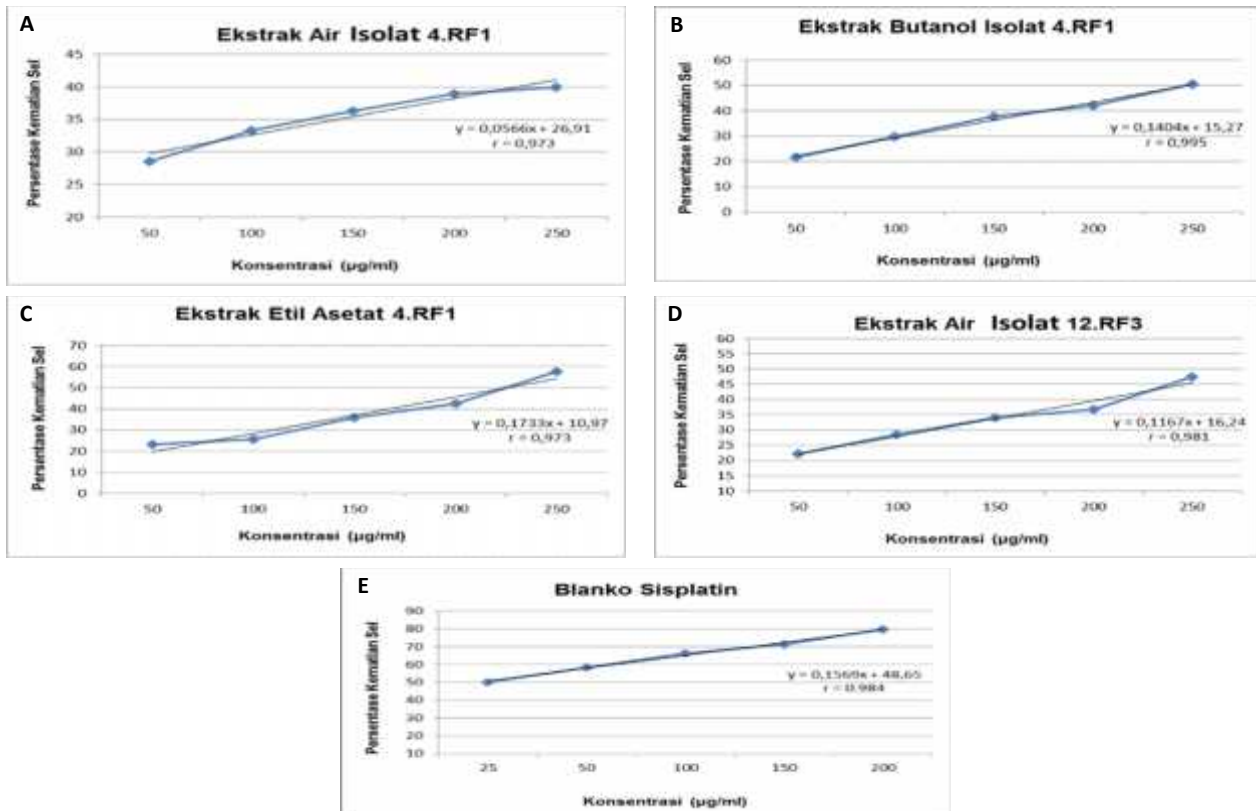
dengan nilai LC_{50} 225,22 $\mu\text{g/ml}$, dan yang paling kurang toksik adalah ekstrak air 4.RF1 dengan nilai LC_{50} 407,95 $\mu\text{g/ml}$.

Tabel 1. Nilai LC_{50} ekstrak air, metanol, n-butanol dan etil asetat hasil fermentasi isolat kapang endofit

Nama Isolat	Nilai LC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			
	Air	Metanol	n-Butanol	Etil Asetat
Isolat 4.RF1	30,492*	128,014	90,620*	8,183*
Isolat 12.RF3	38,594*	421,577	153,932	>1000

Keterangan:

(*) merupakan isolat terpilih yang akan diuji sitotoksitasnya menggunakan sel kanker payudara MCF-7



Gambar 3. Grafik hubungan antarapersentase kematian sel MCF-7 setelah inkubasi 24 jam dengan konsentrasi ekstrak air isolat 4.RF1 (A); ekstrak butanol isolat 4.RF1 (B); ekstrak etil asetat isolat 4.RF1 (C); ekstrak air isolat 12.RF3 (D); larutan blanko sisplatin.

Tabel 2. Nilai LC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) yang Diperoleh melalui Perhitungan dengan Menggunakan Persamaan Regresi Linier

Perlakuan	Nilai LC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Larutan uji ekstrak air 4.RF1	407,95
Larutan uji ekstrak air 12.RF3	289,29
Larutan uji ekstrak butanol 4.RF1	247,36
Larutan uji ekstrak etil asetat 4.RF1	225,22
Larutan blanko sisplatin	8,60

Nilai LC_{50} larutan uji yang cukup besar dapat dikarenakan larutan uji masih merupakan ekstrak kasar. Apabila yang digunakan adalah senyawa murni hasil isolasi ekstrak, diharapkan senyawa murni tersebut memiliki daya toksisitas yang tidak jauh berbeda atau mendekati blanko sisplatin karena kadar zat aktif yang ditimbang sama.

Data persentase kematian sel MCF-7 dianalisis secara statistik menggunakan metode analisis varian

(ANOVA) satu arah. Hasil uji menunjukkan bahwa persentase kematian sel antar kelompok perlakuan memiliki perbedaan bermakna yang ditunjukkan dengan nilai signifikansi yang lebih besar dari 0,05. Untuk mengetahui hubungan dan besarnya perbedaan persentase kematian sel antara kelompok perlakuan, maka dilakukan analisis lebih lanjut, yaitu uji beda nyata terkecil. Dari hasil analisis ini, masing-masing ekstrak uji dibandingkan persentase kematiannya dengan blanko

sisplatin. Hasilnya, setiap kelompok perlakuan memiliki nilai signifikansi $< 0,05$ sehingga terdapat perbedaan bermakna pada data persentase sel MCF-7 antar kelompok perlakuan dengan blanko sisplatin. Artinya ekstrak uji memiliki nilai toksisitas yang jauh berbeda dibandingkan dengan blanko sisplatin, di mana blanko memberikan nilai persentase kematian yang lebih besar dibandingkan larutan uji.

KESIMPULAN

Berdasarkan nilai LC_{50} dari hasil uji sitotoksitas terhadap sel MCF-7 secara *in vitro*, kedelapan ekstrak uji memiliki sitotoksik yang baik karena memiliki nilai LC_{50} kurang dari 1000 $\mu\text{g/ml}$.

DAFTAR PUSTAKA

- Atika D. (2007). *Uji Aktivitas Antimikroba Hasil Fermentasi Kapang Endofit yang Diisolasi dari Akar, Batang, Daun Tanaman Garcinia fruticosaLauterb dan Garcinia laterifloraBlume serta Akar dan Daun Tanaman Garcinia Cowa Roxb.* Skripsi Departemen Farmasi UI. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, Mandelblatt JS, Yakovlev AY, Habbema JD, Feuer EJ. (2005). Cancer Intervention and Surveillance Modeling Network (CISNET) Collaborators. Effect of Screening and Adjuvant Therapy on Mortality from Breast Cancer. *N Engl J Med*, 353, 1784-1792.
- Clarke R, Leonessa F, Brünner N, Thompson EW. (1996). In Vitro Models of Breast Cancer. In Haris JR, Lipman ME, Morrow M, Osborne CK (Eds). *Disease of The Breast*. 2nd ed. Lippincott and William & Wilkins.
- Freshney RI. (2005). Cytotoxicity. In: *Culture of Animal Cells: A Manual Basic Technique*. 5th ed. John Wiley & Sons.
- Hay A, Helexbeux J, Duval O, Labared M, Grellier P, Richomme P. (2003). Antimalarial Xathones from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia viellardii*. *Life Sci*, 75, 3077-3085.
- Kubicek CP, Druzhinina IS. (2007). *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*, 2nd ed. Springer.
- Lisdawati V. (2002). Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*), Toksisitas, Efek Antioksidan dan Efek Antikanker Berdasarkan Uji Penapisan Farmakologi. PT Mahkota Dewa Indonesia. Skripsi Departemen Farmasi UI. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Mackeen M, Ali A, Lajis N, Kawazu K, Kikuzaki H, Nakatani N. (2002). Antifungal *Garcinia* Acid Ester from Fruit *Garcinia atroviridis*. *J Naturforsch* 75(c), 291-295.
- Maretyani, L. (2006). *Penapisan dan Pemurnian Fraksi yang Dihasilkan Bakteri dan Kapang Endofit yang Memiliki Aktivitas sebagai Antijamur dan Antibakteri*. Skripsi Fakultas Farmasi. Jakarta: Universitas Pancasila.
- Mettlin C. (1999). Global Breast Cancer Statistic. *CA Cancer J Clin*, 49, 138-144.
- Moonkarndi P, Kosem N, Kaslungka S, Luanratana O, Pongpan N, Neungton N. Antiproliferation, Antioxidation and Induction of Apoptosis by *Garcinia mangostana* (Mangosteen) on SKBR3 Human Breast Cancer Cell Line. (2004). *J Ethnopharmacol*, 90, 161-166.
- Nakatani K, Yamakuni T, Kondo N, Arakawa T, Oosawa K, Shimura S, Inoue H, Ohizumi Y. (2004). Gamma-Mangostin Xanthone Acts as a Strong Anti-Inflammatory. *Mol Pharmacol*.
- Nugraheni FA. (2008). *Identifikasi Isolat-Isolat Kapang Endofit Hasil Isolasi Tanaman Garcinia porrecta dan Garcinia forbesii dengan Metode PCR dan Sekuensing Menggunakan Primer NS1 dan NS4*. Skripsi Departemen Farmasi UI. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Phelan MC. (1998). Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture. *Current Protocols in Cell Biology*, 1.1.1-1.1.10.
- Pompakakui S, Liangsakul J, Ngamrojanavanich N, Roengsumran S, Sihanonth P, Piapukiew J, Sangvichien E, Puthong S, Petsom A. (2006). Cytotoxic Activity of Four Xanthones from *Emericella varicolor*, An Endophytic Fungus Isolated from *Croton oblongifolius*. *Arch Pharm Res*, 29(2), 140-144.
- Radji M, Soemiati A, Indani N. (2004). Uji Mutagenisitas dan Antikanker Ekstrak Aseton dan n-Heksana dari Kulit Batang Sesoot (*Garcinia picrorrhiza* Miq). *Majalah Ilmu Kefarmasian*, I(2), 69-78.
- Radji M. (2005). Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, II(3), 113-126.
- Roosheroe IG, Sjamsuridzal W. (2006). *Mikologi Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Soemiati A. (2000). *Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Kimia Serta Uji Aktivitas Biologi dari Buah Tanaman Garcinia dulcis Kurz dan Kulit Batang serta Akar Tanaman Garcinia picrorrhiza Miq*. Ringkasan Disertasi Departemen Kimia UI. Depok: Pascasarjana Departemen Kimia Universitas Indonesia.
- Strobel G, Richard T, Arthur B. *Acremonium* sp. – Leucinostatin A Producing Endophyte of European Yew (*Taxus baccata*). (1997) *Plant Science*, 128, 97-108.
- Strobel G. (2005). Harnessing Endophytes for Industrial Microbiology. *Curr Opin Microbiol*, 9, 240-244.
- Taqwim SF. (2007). *Uji Antimikroba dan Uji Sitotoksitas dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test Metabolit Sekunder Kapang Endofit Hasil Isolasi dari Akar, Batang, dan Daun Tanaman Garcinia forbesii King*. Skripsi Departemen Farmasi UI. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Wadhvani T, Desai K, Patel D, Lawani D, Bahaley P, Joshi P, Kothari V. (2009). Effect of Various

- Solvents on Bacterial Growth in Context of Determining MIC of Various Antimicrobials. *Internet J Microbiol*, 7(1).
- Wahyudi P. (1998). Mikroba Endofitik Sebagai Penghasil Materi yang Bermanfaat. *BPPT*, 1761/H/98: 1-9.
- WHO. *Breast Cancer: Prevention and Control*. 16 April 2010. <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>
- Wijayakrutta S, Sriubolmas N, Panhput W, Thongon N, Danwiset K, Ruangrunsi N, Meevootisom V. (2005). Endophytic Fungi with Anti-Microbial, Anti-Cancer and Anti-Malarial Activities Isolated from Thai Medicinal Plants. *World J Microbiol Biotechnol*, 265-272.
- Yulia PR. (2004). *Isolasi dan Seleksi Kapang Endofit Penghasil Antimikroba pada Beberapa Tanaman Obat Tradisional Indonesia*. Skripsi Departemen Farmasi UI. Depok: Universitas Indonesia.