

## FRAKSINASI PROTEIN KAPANG LAUT *Xylaria psidii* KT30 DAN SITOTOKSISITASNYA TERHADAP SEL HeLa

[Fractionation of Proteins of Marine Fungus *Xylaria psidii* KT30 and their Cytotoxicity against HeLa Cells]

Mita Gebriella Inthe<sup>1)</sup>, Kustiariyah Tarman<sup>1)\*</sup> dan Mega Safithri<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>2)</sup>Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor

Diterima 22 Juli 2013 / Disetujui 03 Maret 2014

### ABSTRACT

Cervical cancer is the most common cause of death for Indonesian women after human breast cancer. One of the efforts of cancer treatment is the utilization of natural compounds. One of the microorganisms having the potential as anticancer agent is endophytic fungi. Endophytic fungi from the marine habitat can be isolated from sea weeds, sea grasses, sponges, and mangroves. *Xylaria psidii* KT30, a marine fungus used in this study was isolated from red seaweed *Kappaphycus alvarezii*. *Xylaria psidii* KT30 was cultivated in potato dextrose broth medium for nine days at room temperature 27-29°C in shaking condition. This study aimed to obtain protein fractions from *X. psidii* KT30 and determine their toxicity against Chang and HeLa cells. The fractionation process was conducted using DEAE Sephadex A-50 column chromatography and the toxicity was determined by Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). The metabolites excreted in the culture broth was extracted using 90% of ammonium sulphate. The extract was then tested for their toxicity against HeLa and Chang cells by Microculture Tetrazolium Technique (MTT) assay. The results revealed that LC<sub>50</sub> of the protein extract of *X. psidii* KT30 was 104.95 ppm and IC<sub>50</sub> was 69.9 ppm. Based on the National Cancer Institute (NCI), this value showed moderate cytotoxicity against HeLa cells.

**Keywords:** BSLT, cervical cancer, fractionation, Marine fungus, MTT assay, *Xylaria psidii*

### ABSTRAK

Kanker serviks merupakan kanker penyebab kematian kedua terbesar pada wanita di Indonesia setelah kanker payudara. Salah satu upaya pengobatan kanker dilakukan dengan memanfaatkan senyawa dari bahan alam. Salah satu mikroorganisme yang mempunyai potensi sebagai antikanker adalah kapang endofit. Kapang endofit dari lingkungan laut dapat diisolasi dari rumput laut, lamun, spons, dan mangrove. *Xylaria psidii* KT30 kapang laut yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari rumput laut merah *Kappaphycus alvarezii*. *Xylaria psidii* KT30 dikultur pada media *Potato Dextrose Broth* (PDB) selama sembilan hari pada suhu 27-29°C (*dishaker*). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan sitotoksitas ekstrak *X. psidii* KT30 terhadap sel Chang dan sel HeLa. Proses fraksinasi dilakukan dengan menggunakan kolom kromatografi DEAE Sephadex A-50 dan toksisitas ditentukan dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metabolit diekstraksi dengan amonium sulfat 90%. Ekstrak diuji aktivitasnya terhadap sel HeLa dan sel Chang dengan metode *Microculture Tetrazolium Technique* (MTT) assay. Hasil uji ekstrak protein *X. psidii* KT30 menunjukkan nilai LC<sub>50</sub> 104.95 ppm dan IC<sub>50</sub> 69.89 ppm. Berdasarkan National Cancer Institute (NCI), hasil toksisitas dari kapang laut bersifat moderat aktif terhadap sel HeLa.

**Kata kunci:** BSLT, fraksinasi, MTT assay, kanker serviks, kapang laut, *Xylaria psidii*

### PENDAHULUAN

Penyakit kanker merupakan penyakit yang menjadi salah satu ancaman utama terhadap kesehatan karena merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit jantung. Setiap tahunnya sekitar 7.6 juta orang di seluruh dunia meninggal karena kanker. Kanker serviks menduduki peringkat kedua yang diderita oleh perempuan. Setiap tahunnya sekitar 53.000 kasus kanker serviks terjadi, dimana 85% kasus kanker serviks berasal dari negara berkembang (Asian cancer, 2012). Menurut Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2008, kanker serviks merupakan jenis kanker tertinggi kedua di Indonesia dengan persentasi pasien rawat inap sebesar 10.3%. Yayasan

Kanker Indonesia tahun 2006 menerangkan berdasarkan patologi di 13 pusat, kanker serviks menempati urutan pertama dengan angka 16%, yang kemudian disusul dengan kanker payudara 15%.

Sel kanker leher rahim (sel HeLa) terjadi akibat infeksi Human Papillomavirus (HPV 18) sehingga mempunyai sifat yang berbeda dengan sel leher rahim normal (Prayitno, 2005; Shoeb, 2006; Michael dan Doherty, 2005). Selain itu, kanker dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu penggunaan tembakau, infeksi, radiasi, kurangnya aktivitas fisik, makanan yang tidak sehat, obesitas, dan polusi lingkungan (Anand *et al.* 2008). Faktor gaya hidup *modern* seperti kebiasaan merokok, konsumsi alkohol, makanan yang mengandung bahan tambahan pangan yang karsinogenik, dan makanan berlemak *trans* serta obesitas, dapat meningkatkan risiko terkena kanker tersebut (Jemal, 2011).

\*Penulis Korespondensi:  
Email: kustya@gmail.com; Hp: 082112873434

Berbagai upaya alternatif dilakukan untuk pengobatan kanker seperti pembedahan atau operasi, radiasi, kemoterapi, immune-terapi, dan masih banyak lagi. Namun, dalam prosesnya setiap pengobatan yang dilakukan memiliki efek samping yang dirasakan oleh penderita kanker serviks, seperti terjadinya penurunan jumlah sel-sel darah (akan kembali normal sekitar seminggu kemudian), infeksi (ditandai dengan panas, sakit tenggorokan, rasa panas saat buang air kecil, menggigil dan luka yang memerah, bengkak, dan rasa hangat), anemia, pendarahan seperti mimisan, rambut rontok, kulit gatal dan kering, mual dan muntah, dehidrasi dan tekanan darah rendah, sembelit atau konstipasi, diare, gangguan syaraf (Knezevic *et al.* 2011).

Protein bioaktif menarik perhatian para peneliti karena dapat dikembangkan potensinya sebagai senyawa toksik pada imunotoksin. Protein dikongjugasikan dengan antibodi untuk mengenal sel target, sehingga tidak menyerang sel lainnya. Imunotoksin digunakan untuk perlakuan penyakit penting pada manusia seperti kanker, AIDS, dan penyakit degeneratif (Cragg dan Newman, 2009; Minami *et al.* 1992; Girbes *et al.* 1993). Protein bioaktif dapat dihasilkan oleh mikroorganisme (Silva *et al.* 2010).

Salah satu mikroorganisme sumber utama metabolit adalah kapang endofit (Strobel dan Daisy, 2003; Blunt *et al.* 2007; Joseph dan Priya, 2011). Kapang endofit adalah fungi yang menginfeksi jaringan tanaman yang sehat tanpa menyebabkan sakit (Clay, 2004; Shushni *et al.* 2009; Chaeprasert *et al.* 2010; Kohlmeyer dan Volkmann-Kohlmeyer, 2003; Sukandar *et al.* 2010; Yan, 2004). Saat ini, kapang endofit dengan keragaman metabolit serta bioaktivitasnya yang tinggi sangat menarik untuk diteliti. Beberapa metabolit endofit menunjukkan aktivitas antibakteri, antifungi, hormon pertumbuhan tanaman, insektisida, imuno-supresan, dan lain-lain (Kumaran *et al.* 2009; Beutler, 2009; Kuno *et al.* 2012). Salah satu kapang yang memiliki aktivitas biologis adalah *Xylaria* sp. Metabolit sekunder dari isolat kapang endofit *Xylaria* sp. dapat digunakan sebagai obat antikanker dan autoimun (Hasan *et al.* 2007; Paulus *et al.* 2006; Yin *et al.* 2011; Chen *et al.* 2009; Romero *et al.* 2008; Xu *et al.* 2008; Song *et al.* 2012; Wu *et al.* 2011; Pongcharoen *et al.* 2008; Silva *et al.* 2010). Penelitian Tarman *et al.* (2011) menunjukkan bahwa 5 dari 11 isolat kapang endofit yang diisolasi dari makroalga, kayu, dan moluska, memiliki potensi sebagai sumber bahan bioaktif. Ekstrak dari *Xylaria psidii* (KT30) dan *Mycelium sterillum* (KT31) menunjukkan aktivitas antibakteri dan sitotoksitas yang tinggi (Tarman *et al.* 2011). Sampai sekarang belum ditemukan obat yang memenuhi kriteria terapi yang optimal terhadap para penderitanya, sehingga perlu dikembangkan obat baru yang mempunyai efek terapi yang baik (Luanpitpong *et al.* 2012; Goyal, 2012). *Xylaria psidii* KT30 adalah salah satu jenis kapang yang dapat menghasilkan protein antikanker. Akan tetapi stabilitas dan mekanisme aksi dari protein antikanker tersebut belum diketahui. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakterisasi protein yang dihasilkan oleh kapang endofit *Xylaria psidii* KT30 dan toksisitasnya.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan yang digunakan adalah kapang endofit *Xylaria psidii* KT30 yang diisolasi dari makroalga *Kappaphycus alvarezii* yang berasal dari perairan Barru, Sulawesi Selatan. Selain itu, juga digunakan sel kanker serviks (HeLa, ATCC CCL 2) dan sel hati normal (Chang, ATCC CCL 13).

### Kultivasi kapang laut KT30

Kultur disiapkan dengan memindahkan kapang dari media padat *Potato Dextrose Agar* (PDA, Difco) ke media cair *Potato Dextrose Broth* (PDB, Difco). Kapang dalam prekultur diinkubasi selama 7 hari. Prekultur selanjutnya digunakan sebagai biakan. Sebanyak 5% prekultur dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer yang berisi 350 mL media PDB (Difco) dan inkubasi selama sembilan hari dalam suhu ruang dengan bantuan *shaker* (Gemmy VRN 360) dengan kecepatan 120 rpm.

### Isolasi protein

Koleksi supernatan dari hasil inkubasi selama sembilan hari kemudian diendapkan menggunakan amonium sulfat (E-Merck) dengan konsentrasi 90%. Proses berikutnya adalah pengaturan pH hasil pengendapan sampai pH 7.4. Penyimpanan hasil pengendapan dilakukan selama satu malam. Supernatan hasil pengendapan disentrifuse (HIMAC CR 21 G) pada kecepatan 10000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang dikoleksi digunakan untuk uji *bioassay* BSLT.

### Uji toksisitas metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (Meyer *et al.* 1982)

Uji toksisitas dilakukan berdasarkan metode Meyer *et al.* 1982 dengan larva *Artemia salina* sebagai hewan uji. Mula-mula telur *A. salina* ditetaskan di dalam air laut buatan (38 g garam dapur dalam 1000 mL air biasa) di bawah lampu TL 20 watt. Setelah 48 jam telur menetas menjadi nauplii instar III/IV dan siap digunakan sebagai hewan uji. Larva *A. salina* dimasukkan ke dalam vial yang telah berisi larutan ekstrak sampel dengan seri dosis 50, 100, 250, 500, 750, dan 1000 ppm dengan 3 kali ulangan. Semua vial diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam di bawah penerangan lampu TL 20 watt. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah *Artemia salina* yang mati pada tiap konsentrasi. Penentuan harga LC<sub>50</sub> dalam µg/mL atau ppm dilakukan menggunakan analisis probit dengan program MINITAB versi 13.2 dengan selang kepercayaan 95%.

### Pemurnian dengan kromatografi (Ustadi *et al.* 2005)

Tahap pemurnian pertama dilakukan dengan kromatografi penukar ion dengan bahan pengelusi buffer B (buffer gel pemisah, Tris-HCl 2M, pH 7.4) (E-Merck). Sebanyak 75 mL larutan Tris Cl pH 7.4 (E-Merck) dan 4 mL larutan SDS 10% (Merck) (w/v) ditambahkan dengan akuades hingga volume total 100 mL. Matriks menggunakan kolom DEAE *Sephadex A-50* (Merck) dengan laju aliran 1 mL/menit. Selain itu juga digunakan NaCl (E-Merck) 1 M sebagai pengelusi. Jumlah volume tiap fraksi ditampung sebanyak 5 mL. Masing-masing fraksi diuji konsentrasi protein dengan spektrofotometer-uv (CECIL series 2) λ=280 nm.

### Penentuan berat molekul dengan *sodiumdodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) (Rosenberg, 1996)

Metode *sodiumdodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) yang dikerjakan dalam penelitian ini menggunakan 4% stacking gel dan 10% gel akrilamida. Metode ini menggunakan matriks dari gel yang disusun oleh akrilamida dan N,N'-metilen-bis-akrilamida yang berpolimerisasi melalui mekanisme radikal bebas dengan bantuan katalisator N,N,N',-tetramethylene-diamine (TEMED) dan inisiator ammonium persulfat. Konsentrasi akrilamida yang digunakan dalam analisis ini adalah 10% (w/v). Pewarnaan yang digunakan adalah pewarnaan perak. Deteksi SDS-PAGE dilakukan dengan melepaskan gel hasil elektroforesis dari cetakan dan diukur jarak migrasi bromfenol blue. Gel tersebut dicelup dan direndam dalam larutan fiksasi (25% metanol (Merck) + 12% asam asetat (Merck)) selama 1 jam sambil digoyang konstan. Kemudian direndam dalam 50% (v/v) etanol (Merck) selama 2x20 menit. Larutannya diganti dengan larutan pengembang kemudian dicuci dengan akuabides. Setelah dicuci ditambahkan larutan perak nitrat selama 30 menit kemudian dicuci lagi dengan akuabidestilata 2x20 detik dan ditambahkan larutan campuran Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck) dan formal dehidat dan terakhir dengan larutan fiksasi.

### Uji sitotoksitas ekstrak protein kapang laut *Xylaria psidii* KT30 terhadap sel Chang dan sel HeLa (Hseu et al. 2008) media sel kanker (LCAG, 2009)

Media DMEM (Difco) bubuk dimasukkan ke dalam botol steril dan ditambahkan 3.7 gram NaHCO<sub>3</sub> (Merck), antibiotik penisilinstreptomisin (Kalbe) 1%, dan 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS, Sigma), kemudian dihomogenisasi dan ditambahkan akuabides sampai larutan media menjadi 1000 mL.

### Kultur sel Chang (Li et al. 2011)

Sel Chang ditumbuhkan dalam *flask* yang berisi media DMEM (Difco). Setelah sel tumbuh (menempel pada dinding *flask*), medianya dibuang dan sel HeLa dalam *flask* dibilas dengan larutan PBS (Sigma). Setelah itu, dimasukkan enzim tripsin sebanyak 5 mL, lalu diinkubasikan selama 5 menit, dan kemudian ditambahkan media DMEM (Difco). Suspensi tersebut disentrifus pada kecepatan 700 g selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang dan pellet (sel Chang) yang diperoleh ditambah dengan 5 mL DMEM (Difco). Setelah itu, dilakukan perhitungan jumlah sel Chang. Jumlah sel dihitung hingga masing-masing sumur akan terisi 5.000 sel dalam 100 µL kultur sel Chang, dan dimasukkan ke dalam tiap sumur sebanyak 96 sumur. Kultur sel tersebut diinkubasi selama 24 jam (*over night*) dalam inkubator (MILLIPORE) CO<sub>2</sub>. Uji yang sama (kultur sel) dilakukan dengan menggunakan sel HeLa.

### Sitotoksitas ekstrak

Setelah kultur sel Chang diinkubasi selama 24 jam medianya dibuang, kemudian dilanjutkan dengan perlakuan ekstrak. Ekstrak yang diuji meliputi protein kasar, protein fraksi 53 (F3.1), 60 (F3.2) dan 69 (F4). Masing-masing larutan ekstrak terdiri dari 5 konsentrasi akhir pada *microplate*. Tahap awal perlakuan ekstrak adalah dengan membuat stok larutan ekstrak dengan konsentrasi masing-masing 10000 ppm, yang dibuat dengan

cara melarutkan 10 mg ekstrak dengan 50 µL DMSO (Merck), kemudian ditambah dengan 950 µL DMEM (Difco). Masing-masing larutan ekstrak kemudian diencerkan dengan menambahkan DMEM (Difco) untuk mendapatkan konsentrasi akhir pada *microplate*. Konsentrasi akhir yang digunakan pada semua sampel adalah 7, 16, 32, 75, 150, 250, 500, dan 1000 ppm. Sumur *microplate* yang berisi sel Chang dari tahap sebelumnya (kultur sel Chang), ditambahkan 100 µL larutan ekstrak uji di atas sebagai perlakuan, dan ditambahkan 100 µL DMEM (Difco) sebagai kontrol negatif. Campuran dalam *microplate* tersebut diinkubasi selama 48 jam dalam inkubator (MILLIPORE) CO<sub>2</sub>. Hal yang sama (uji sitotoksitas) dilakukan dengan menggunakan sel HeLa.

### Uji sitotoksitas terhadap sel Chang dan sel HeLa dengan MTT (CCRC 2000)

Setelah diinkubasi 48 jam, dimasukkan garam tetrazolium 5 mg/mL sebanyak 10 µL ke dalam tiap sumur. Warna campuran menjadi kuning. Diinkubasi selama 4 jam pada inkubator (MILLIPORE) CO<sub>2</sub>. Setelah diinkubasi dan telah terbentuk kristal formazan, larutan dibuang. Kristal formazan yang terbentuk dilarutkan dengan 100 µL etanol 96% pada tiap sumur. Warna larutan menjadi ungu. Nilai absorbansi dari formazan yang terbentuk diukur dengan *microplate reader* (STATFAX 2100) pada panjang gelombang 595 nm. Semua perlakuan dilakukan tiga kali pengulangan.

### Morfologi sel Chang dan sel HeLa

Pengamatan morfologi sel Chang dan sel HeLa dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya Binokuler (RRC – XSZ107BN).

### Analisis data

Data yang diperoleh dari uji sitotoksitas dengan MTT berupa nilai absorbansi tiap sumur, kemudian nilai absorbansi tersebut dikonversi menjadi % inhibisi dengan menggunakan rumus (Zhang et al. 2005):

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

Analisis statistik untuk membandingkan inhibisi tiap ekstrak dilakukan dengan menggunakan *One-Way* ANOVA dengan SPSS. Jika terdapat perbedaan yang nyata, maka analisis dilanjutkan dengan uji Duncan menggunakan program SPSS.

## HASIL dan PEMBAHASAN

### Hasil kultivasi kapang endofit *Xylaria psidii* KT30

Pertumbuhan kapang pada media padat terlihat dari benang-benang putih yang mengelilingi keping inokulan. Miselium akan bertambah banyak dan mengikat keping-keping tersebut menjadi suatu bentuk yang padat terjalin kuat oleh hifa-hifa miselium. Pemisahan miselium dari mediumnya harus melalui suatu penyaringan sebab miselium tidak dapat diambil seperti perlakuan pada butir (Gandjar et al. 2006). Proses penyaringan menghasilkan supernatan kapang yang kemudian

dimurnikan melalui proses pengendapan. Volume awal kultur produksi adalah 350 mL. Setelah masa kultur selama sembilan hari diperoleh volume panen sebesar 300 mL. Biomassa tidak digunakan karena protein target selama masa pertumbuhan telah disekresikan ke dalam medium pertumbuhan. Isolat kapang *X. psidii* KT30 dalam media padat dan cair dapat dilihat pada Gambar 1. Rendemen protein yang dihasilkan dari proses pengendapan dengan amonium sulfat adalah 0.09%.



Gambar 1. Kapang laut *X. psidii* KT30 dalam media padat PDA (A), kapang laut *X. psidii* KT30 dalam media cair PDB (B)

#### Tingkat toksisitas (Bioassay) hasil pengendapan

Hasil uji toksisitas menggunakan ekstrak kasar kapang laut *Xylaria psidii* KT30 menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak menyebabkan semakin besarnya persentase kematian. Persamaan regresi hubungan antara log konsentrasi dengan mortalitas *Artemia salina* dari ekstrak kasar kapang laut *X. psidii* KT30 yaitu  $Y = 1.094x + 2.789$ , Y menunjukkan konsentrasi mortalitas, X menunjukkan log konsentrasi dan R menunjukkan koefisien korelasi antara X dan Y. Persamaan regresi  $Y = 1.094x + 2.789$  menunjukkan bahwa setiap penambahan konsentrasi sebanyak 1 log (5 ppm) menyebabkan kenaikan mortalitas probit sebesar 1.094. Berdasarkan persamaan tersebut diperoleh nilai koefisien korelasi ( $R^2$ ) sebesar 0.949. Nilai  $LC_{50}$  ekstrak kasar kapang laut *X. psidii* KT30 yang dihasilkan dari perhitungan sebesar 104.95 ppm (Tabel 1).

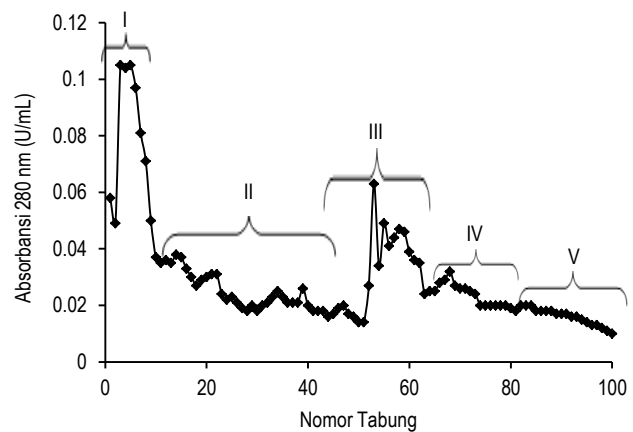
Tabel 1. Data hasil uji BSLT ekstrak kasar kapang laut *X. psidii* KT30

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Persen Mortalitas (%)	Probit	$LC_{50}$
50	1.69	40.00 ± 1.00	4.75	104.95 ppm
100	2.00	46.66 ± 2.30	4.90	
250	2.39	66.66 ± 1.50	5.41	
500	2.69	73.33 ± 2.80	5.61	
750	2.87	80.00 ± 1.70	5.84	
1000	3.00	90.00 ± 2.60	6.28	

Meyer *et al.* (1982) melaporkan bahwa suatu ekstrak tanaman dianggap sebagai bioaktif apabila ekstrak tersebut memiliki nilai  $LC_{50}$  lebih kecil atau sama dengan 1000 mg/L. Nilai tersebut menunjukkan bahwa ekstrak kasar dari kapang laut *X. psidii* KT30 termasuk dalam kategori toksik. Beberapa hasil penelitian terhadap senyawa bioaktif yang diuji dengan *Artemia salina* (BSLT) menunjukkan adanya korelasi spesifik terhadap uji antikanker bila mempunyai  $LC_{50} < 1000$  ppm.

#### Fraksi protein ekstrak kapang laut *Xylaria psidii* KT30

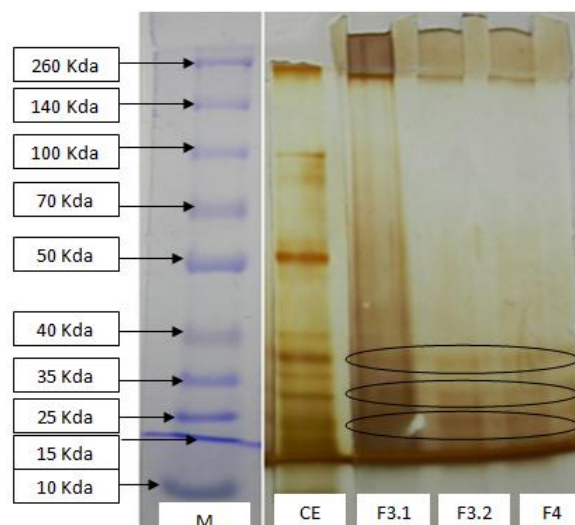
Hasil fraksinasi ekstrak protein kasar dari kapang laut *Xylaria psidii* KT30 yang dipisahkan kromatografi kolom DEAE *Sephadex A-50* sampai 100 fraksi. Hasil fraksinasi protein disajikan pada Gambar 2. Pengukuran kandungan protein dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm. Hal ini disebabkan protein pada umumnya menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm karena adanya residu asam amino triptofan, fenilalanin, dan tirosin (Boyer, 2000). Hasil absorbansi menghasilkan lima puncak fraksi protein yang terdiri dari fraksi I (tabung ke-2 sampai ke-12), fraksi II (tabung ke-13 sampai ke-49), fraksi III (tabung ke-50 sampai ke-61), fraksi IV (tabung ke-62 sampai ke-72), dan fraksi V (tabung ke-73 sampai ke-100).



Gambar 2. Hasil purifikasi protein kapang laut *X. psidii* KT30 menggunakan kromatografi kolom DEAE *Sephadex A-50*

#### Berat molekul berdasarkan SDS-PAGE

Hasil penentuan bobot molekul pada fraksi F3.1, F3.2 dan F4 menghasilkan tiga pita protein dengan prediksi berat molekul 23.99, 32.88, dan 37.30 kDa (Gambar 3). Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa purifikasi protein yang dilakukan belum optimal, sehingga perlu dilakukan pemurnian lanjutan dengan menggunakan metode yang lainnya.



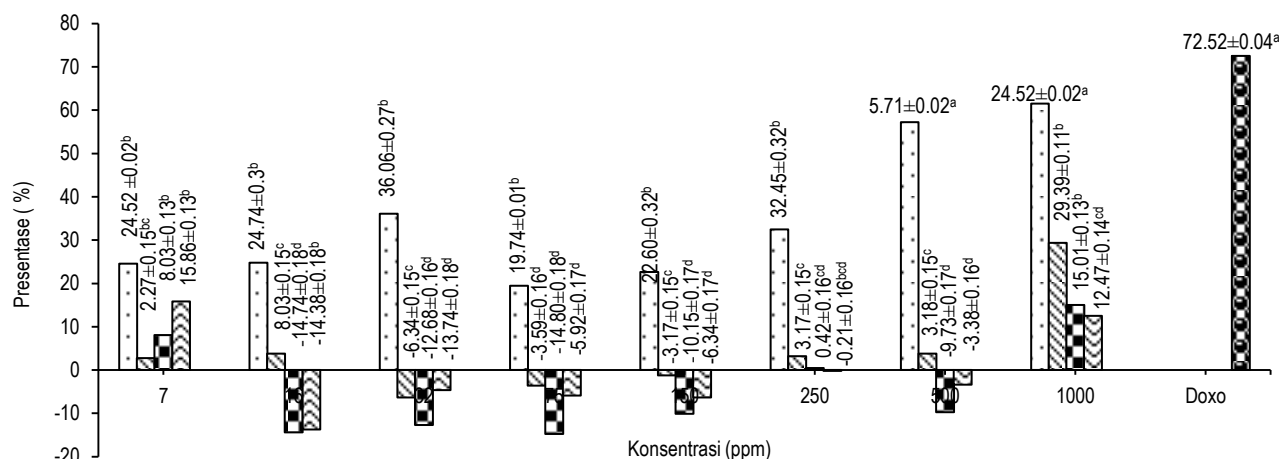
Gambar 3. Hasil SDS-PAGE (M (marker), CE (protein kasar), F3.1 (tabung ke-53), F3.2 (tabung ke-60), F4 (tabung ke-69))

### Sitotoksisitas protein *Xylaria psidii* KT30 terhadap sel Chang dan sel HeLa

Uji sitotoksisitas dalam penelitian ini dilakukan untuk melihat tingkat sitotoksisitas ekstrak protein fraksi F3.1, F3.2, dan fraksi F4 kapang laut *X. psidii* KT30 terhadap sel normal (Chang) dan sel HeLa. Uji sitotoksisitas awal dilakukan terhadap sel Chang. Penelitian resistensi obat kanker menggunakan sel kanker dapat digunakan untuk mempelajari mekanisme pengaturan resistensi obat-obatan untuk penyakit kanker (Arya *et al.* 2011). Obat kanker yang digunakan sebagai kontrol positif adalah doxorubicin. Penggunaan doxorubicin dilaporkan dapat menimbulkan risiko efek samping pada jaringan normal terutama

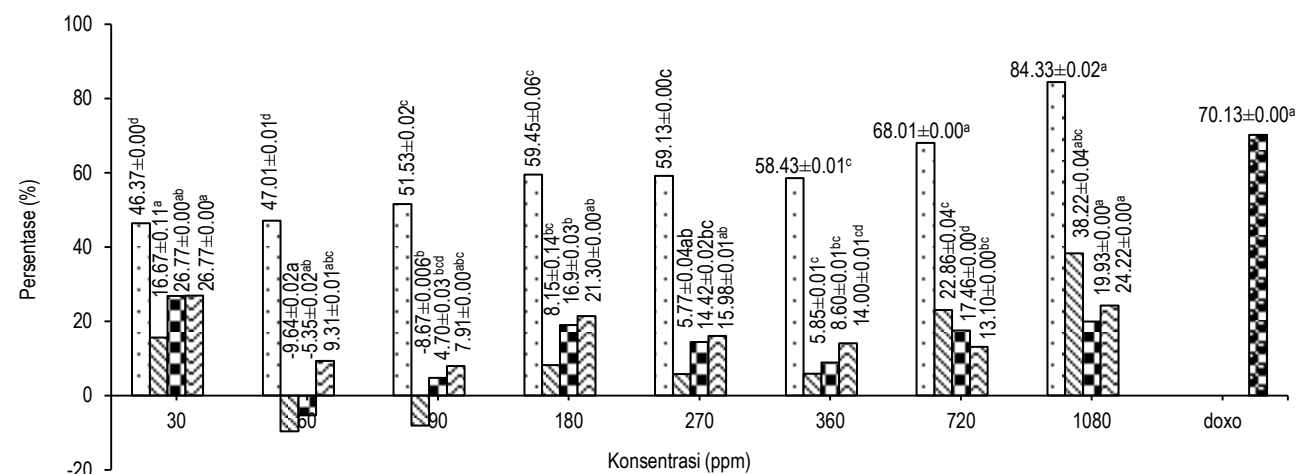
jantung serta menekan sistem imun (Wattanapitayakul *et al.* 2005).

Perlakuan konsentrasi 1000 ppm dan kontrol positif (doxorubicin) menunjukkan hasil yang signifikan terhadap presentase inhibisi sel Chang (Gambar 4). Nilai IC<sub>50</sub> semua konsentrasi protein ekstrak kasar, fraksi F3.1, F3.2, dan fraksi F4 hasil fraksinasi dari kapang laut *X. psidii* KT30 pada penelitian ini tidak bisa ditentukan karena pada konsentrasi ekstrak terbesar (1000 ppm) tidak menghasilkan presentase inhibisi >50% terhadap sel Chang. Oleh karena itu, nilai IC<sub>50</sub> ekstrak protein fraksi terpilih kapang laut terhadap sel Chang disimpulkan >100 ppm.



Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0.05$ )

Gambar 4. Pengaruh perlakuan konsentrasi protein terhadap inhibisi sel Chang (ekstrak kasar □, fraksi F3.1 ▨, fraksi F3.2 ▩ dan fraksi F4 ■ )

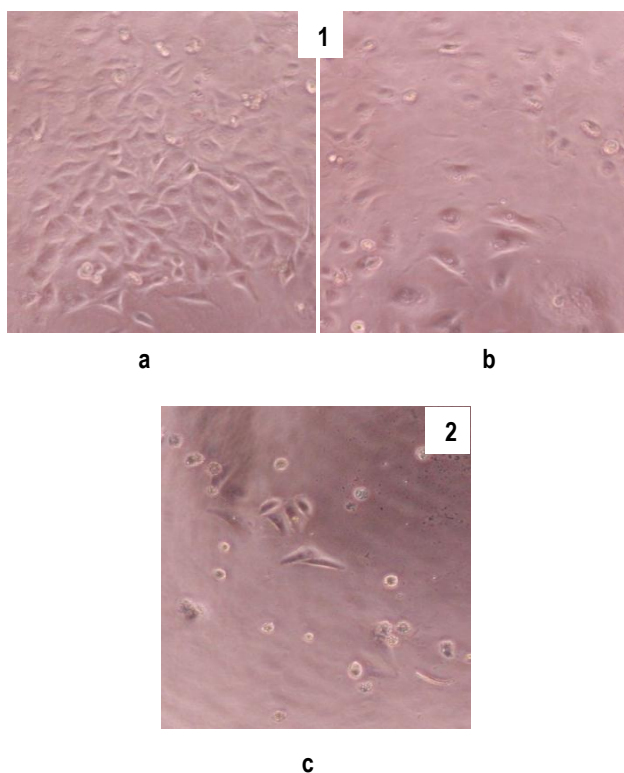


Keterangan: Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0.05$ )

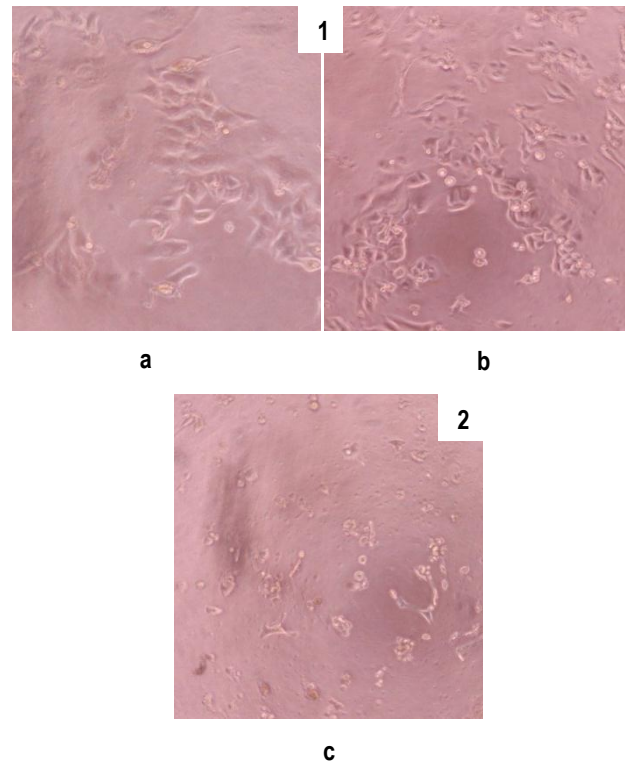
Gambar 5. Pengaruh perlakuan konsentrasi protein terhadap sel HeLa (ekstrak kasar □, fraksi F3.1 ▨, fraksi F3.2 ▩ dan fraksi F4 ■ )

Nilai  $IC_{50}$  semua ekstrak protein fraksi F3.1, F3.2, dan F4 terhadap sel kanker serviks (HeLa) pada penelitian ini (Gambar 5) tidak bisa ditentukan karena pada konsentrasi ekstrak terbesar (1080 ppm) tidak menghasilkan presentase inhibisi >50% terhadap sel HeLa. Oleh karena itu, nilai  $IC_{50}$  ekstrak protein kapang laut *X. psidii* KT30 terhadap sel HeLa disimpulkan >100 ppm. Berdasarkan *National Cancer Institute* (NCI), nilai ini menunjukkan aktivitas antikanker ekstrak protein hasil purifikasi *X. psidii* KT30 sangat lemah terhadap sel HeLa, sedangkan ekstrak kasar protein kapang laut *X. psidii* KT30 memiliki nilai  $IC_{50}$  69.89 ppm. Ekstrak kasar dikatakan memiliki potensi yang kuat sebagai agen antikanker jika nilai  $IC_{50}$  < 30  $\mu$ g/mL, moderat aktif (30  $\mu$ g/mL  $\leq$   $IC_{50}$  < 100  $\mu$ g/mL), tidak aktif ( $IC_{50}$   $\geq$  100  $\mu$ g/mL) (Itharat dan Ooraikul, 2007).

Sitotoksitas protein fraksi F3.1, F3.2, dan F4 yang rendah terhadap sel HeLa diduga karena fraksi-fraksi tersebut bukan yang bertanggungjawab pada sitotoksitas ekstrak protein kapang laut *X. psidi* terhadap sel HeLa. Kumala (2008) melaporkan kapang endofit isolat 1.3.11 yang diisolasi dari *Brucea javanica* terbukti bersifat sitotoksitas terhadap sel kanker payudara MCF-7 dan T47D dengan  $IC_{50}$  berturut-turut 48  $\mu$ g/mL dan 68  $\mu$ g/mL dan menunjukkan sinergisme dengan doxorubicin dalam pemacuan apoptosis. Morfologi sel Chang dan sel HeLa diamati dibawah mikroskop (Gambar 6 dan 7).



Gambar 6. Sel Chang (a) inhibisi 0%, (b) inhibisi < 50%, (c) inhibisi > 50%; 1: sel hidup, 2: sel mati



Gambar 7. Sel HeLa (a) inhibisi 0%, (b) inhibisi < 50%, (c) inhibisi > 50%; 1: sel hidup, 2: sel mati

Bentuk sel Chang dan sel HeLa yang tanpa perlakuan tampak melekat pada bagian permukaan tempat tumbuh sel, selain itu sel juga masih berbentuk epithelial-like (CLS, 2013). Sedangkan sel Chang dan sel HeLa yang telah mendapat perlakuan dan mengalami inhibisi <50% masih tetap sama dengan bentuk sel hidup, namun pada beberapa sel terlihat telah mengalami kerusakan. Pada sel yang mengalami inhibisi > 50% akan jelas terlihat perubahan morfologinya diantaranya sel sudah tidak lagi terlihat berkoloni dan telah terlepas dari tempat tumbuhnya. Terlepasnya ikatan antar sel dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya faktor enzimatis seperti enzim tripsin, protease, collagenase (Freshey, 2000).

## KESIMPULAN

Ekstrak kasar protein kapang laut *Xylaria psidii* KT30 dikategorikan senyawa toksik moderat aktif dengan nilai  $LC_{50}$  104.9 ppm dan nilai  $IC_{50}$  69.89 ppm. Analisa protein dengan SDS-PAGE pada fraksi terpilih mempunyai prediksi berat molekul 23.99, 32.88, dan 37.30 kDa. Fraksi terpilih dari kapang laut *X. psidii* KT30 tidak bersifat toksik terhadap sel Chang dengan inhibisi kurang dari 50% yang mengindikasikan ekstrak protein kapang laut aman untuk sel normal, sedangkan fraksi F4 berpotensi sebagai agen antikanker sel HeLa.



## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi, Program Insentif Riset Sinas, 2013 (RD-2013-0552) yang telah mendanai penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. 2008. Curcumin and cancer an old-age disease with an age-old solution. *Cancer Lett* 267: 133–164. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.03.025.
- Arya V, Kashyap CP, Tikka B, Sharma S, Kumari S, Verma P, Sharma S. 2011. Human cancer cell lines-A brief communication. *J Chem Pharm Res* 3: 514-520.
- Asian Cancer. 2012. Kanker serviks. <http://www.asiancancer.com/indonesian/cancer-topics/cervical-cancer/> [30 Maret 2013].
- Beutler JA. 2009. Natural products as a foundation for drug discovery. *Current Protocols Pharmacol* 46: 9.11.1-9.11.21 DOI: 10.1002/0471141755.ph0911s46.
- Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. 2007. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 24: 31-86. DOI: 10.1039/B603047P.
- Boyer RF. 2000. *Modern Experimental Biochemistry*. San Fransisco: Addison Wesley Longman Pr.
- Chaeprasert S, Piapukiew J, Whalley AJS, Sihanonth P. 2010. Endophytic fungi from mangrove plant species of Thailand: their antimicrobial and anticancer potentials. *Bot Mar* 53: 555–564. DOI: 10.1515/bot.2010.074.
- Chen WL, Qian Y, Meng WF, Pang JY, Lin YC, Guan YY, Chen SP, Liu J, Pei Z, Wang GL. 2009. A novel marine compound xyloketal B protects against oxidized LDL-induced cell injury *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 78: 941-950. DOI: 10.1016/j.bcp.2009.05.029.
- Clay K. 2004. Fungi and the food of the gods. *Nature* 427: 401-402. DOI: 10.1038/427401a.
- [CLS] Cells Line Service (DE). 2013. Chang liver. [http://www.Cells-lines-service.de/content/e3969/e4032/e4035/index\\_eng.html](http://www.Cells-lines-service.de/content/e3969/e4032/e4035/index_eng.html) [01 April 2013].
- Cragg GM, Newman DJ. 2009. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochem Rev* 8: 313-331. DOI: 10.1007/s11101-009-9123-y.
- Freshey IR. 2000. *Culture of Animal Cells. 4th edition. A Manual Basic Technique*. New York: John Wiley and Sons Inv, Pub.
- Gandjar I, Sjamsuridzal W, Zoetari A. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. 20-60. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Goyal PK. 2012. Cancer chemoprevention by natural products: current & future prospects. *J Integr Oncol* 1: e101. DOI: 10.4172/2329-6771.
- Hasan AEHA. 2007. *Novel Natural Products from Endophytic Fungi of Egyptian Medicinal Plants-Chemical and Biological Sharacterization*. [Disertasi]. Mesir. University Dusseldorf.
- Hseu YC, Chang WH, Chen, CS, Liao JW, Huang CJ, Lu FJ., Chia YC, Hsu HK, Wu JJ, Yang HL. 2008. Antioxidant activities of toona sinensis leaves extracts using different antioxidant models. *Food Chem Toxicol Food and Chemical Toxicology* 46: 105–114. DOI: 10.1016/j.fct.2007.07.003.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA-Cancer J Clin* 61: 69–90. DOI: 10.3322/caac.20107.
- Joseph B, Priya RM. 2011. Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect: a review. *American J Biochem Mol Biol* 1: 291-309. DOI: 10.3923/ajbmb.2011.291.309.
- [LCAG] Lonza Cologne AG. 2009. Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit R for HeLa Cells [ATCC® CCL-2™]. Jerman (DE): Lonza Cologne AG.
- Li K, Li Q, Zhang T, Han Z, Li J, Liu Z, Zheng F. 2011. Procyanidins from *Pinus koraiensis* bark inhibits HeLa cell growth by inducing apoptosis and reducing survivin protein expression. *Afr J Biotechnol* 10: 7766-7771.
- Luanpitpong S, Chanvorachote P, Nimmannit U, Leonard SS, Stehlik C, Wang L, Rojanasakul Y. 2012. Mitochondrial superoxide mediates doxorubicin-induced keratinocyte apoptosis through oxidase modification of ERK and Bcl-2 ubiquitination. *Biochem Pharmacol* 83: 1643-1654. DOI: 10.1016/J.bcp.2012.03.010.
- Knezevic AH, Dikic D, Lisicic D, Kopjar N, Orsolice Knezevic, Karabeg S, Benkovic V. 2011. Synergistic effects of irinotecan and flavonoids on ehrlich ascites tumour-bearing mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 109: 343–349. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00735.x.
- Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B. 2003. Fungi from coral reefs: a commentary. *Mycol Res* 107: 386–387. DOI: 10.1017/S0953756203227775.
- Kumala S, Muhammad G. 2008. Isolasi dan penapisan kapang endofit tanaman Secang sebagai penghasil senyawa antibakteri. *J Ilmu Kefarmasian Indonesia* 21: 15-17.
- Kumaran RS, Muthumary J, Hur BK. 2009. Isolation and identification of an anticancer drug, taxol from *Phyllosticta tabernaemontanae*, a leaf spot fungus of an angiosperm, *Wrightia tinctoria*. *The J Microbiol* 47: 40-49. DOI: 10.1007/s12275-008-0127-x.
- Kuno T, Tsukamoto T, Hara A, Tanaka T. 2012. Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *J Biophys Chem* 3: 156-173. DOI: 10.4236/jbpc.2012.32018.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nachols DE, McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 45: 31-34. DOI: 10.1055/s-2007-971236.
- Michael M, Doherty MM. 2005. Tumoral drug metabolism: overview and its implication for cancer therapy. *J Clin Oncol* 23: 205-229. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.120.
- Paulus BP, Gadek P, Hyde K. 2006. Successional pattern of microfungi in fallen leaves of *Ficus pleurocarpa* (Moraceae) in an Australian tropical rain forest. *Biotropica* 38: 42-51. DOI: 10.1111/j.1744-7429.2006.00110.x.

- Prayitno A. 2005. Ekspresi Protein p53, Rb, dan c-myc pada kanker serviks uteri dengan pengecatan immuno histokimia. *Biodiversitas* 6: 157-59.
- Pongcharoen W, Rukachaisirikul V, Phongpainchit S, Kuhn T, Pelzing M, Sakayaroj J, Taylor WC. 2008. Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. *Phytochemistry* 69: 1900-1902. DOI: 10.1016/j.phytochem.2008.04.003.
- Romero CJ, Barria EO, Arnold AE, Rios LC. 2008. Activity against *Plasmodium falciparum* of lactones isolated from the endophytic fungus *Xylaria* sp. *Pharm Biol* 46: 700-703. DOI: 10.1080/13880200802215859.
- Shoeb M. 2006. Anticancer agents from medical plants. *Bangladesh J Pharmacol* 1: 35-41. DOI: 10.3329/bjp.v1i2.486.
- Silva GH, Oliveira CM, Teles HL, Pauletti PM, Gamboa IC, Silva DHS, Bolzani VSB, Young MCM, Neto CMC, Pfenning LH, Berlinck RGS, Araujo AR. 2010. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp. An endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). *Phytochem Lett* 3: 164-167. DOI: 10.1016/j.phytol.2010.07.001.
- Strobel GA, Daisy B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Mol Biol R* 67: 491-502. DOI: 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.
- Song YX, Wang J, Huang H, Ma L, Wang J, Gu Y, Liu L, Lin YC. 2012. Four eremophilane sesquiterpenes from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp. BL321. *Mar Drugs* 10: 340-348. DOI: 10.3390/md10020340.
- Shushni MA, Mentel R, Lindequist U, Jansen R. 2009. Balticols A-F, naphthalenone derivatives with antiviral activity, from an Ascomycetous fungus. *Chem Biodivers* 6: 127-137. DOI: 10.1002/cbdv.200800150.
- Tarman K. 2011. Biological and Chemical Investigations of Indonesian Marine-Derived Fungi and Their Secondary Metabolites [Disertasi]. Greifswald: Universität Greifswald.
- Tarman K, Lindequist U, Wende K, Porzel A, Arnold, Ludger 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. DOI: 10.3390/md9030294.
- Ustadi, Kim KY, Kim SM. 2005. Purification and identification of a protease inhibitor from glassfish (*Liparis tanakai*) eggs. *J Agr Food Chem* 53: 7667-7672. DOI: 10.1021/jf0482459.
- Wattanapitayakul SK, Chularojmontri L, Herunsalee A, Charuchongkolwongse S, Niomsakul S, Bauer JA. 2005. Screening of antioxidants from medicinal plants for cardioprotective effect against doxorubicin toxicity. *Basic Clin Pharm Toxicol* 96: 80-87. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto960112.x.
- Wu W, Dai H, Bao L, Ren B, Lu J, Luo Y, Guo L, Zhang L, Liu H. 2011. Isolation and structural elucidation of proline-containing cyclopentapeptides from an endolichenic *Xylaria* sp. *J Nat Prod* 74: 1303-1308. DOI: 10.1021/np100909y.
- Xu F, Zhang Y, Wang J, Pang J, Huang C, Wu X, She Z, Vrijmoed LLP, Jones GEB, Lin Y. 2008. Benzoburan derivatives from the mangrove endophytic fungus *Xylaria* sp. *J Nat Prod* 71: 1251-1253. DOI: 10.1021/np070602x.
- Yan HY. 2004. Harvesting drugs from the seas and how Taiwan could contribute to this effort. *Chonghua J Med* 9: 1-6.
- Yin X, Feng T, Li ZH, Su J, Li Y, Tan NH, Liu JK. 2011. Chemical investigation on the culture of the fungus *Xylaria carpophila*. *Nat Prod Bioprospect* 1: 75-80. DOI 10.1007/s13659-011-0011-y.
- Zhang M, Zhang JJ, Adelman RA, Liu Y, Zhang MX, Lu F, Yan M. 2005. Inhibition of the human choroidal microvascular endothelial cells proliferation by endostatin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 3355-3360.