

## PRODUKSI SENYAWA BIOAKTIF DARI *Aspergillus ustus* MFW 26-08 YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS LAUT DALAM BERBAGAI MEDIA

Asri Pratitis<sup>1)</sup>, Gintung Patantis<sup>2)</sup>, Wibowo Mangunwardoyo<sup>2)</sup>,  
dan Ekowati Chasanah<sup>1)</sup>

### ABSTRAK

Penggunaan mikroba sebagai sumber senyawa bioaktif memiliki beberapa kelebihan di antaranya mempersingkat waktu produksi dan menghindari pemanfaatan sumberdaya laut secara berlebihan. Penelitian terdahulu menghasilkan beberapa isolat mikroba yang berpotensi sebagai penghasil senyawa bioaktif, di antaranya adalah isolat kapang MFW 26-08. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan optimasi pertumbuhan isolat kapang MFW 26-08 dan produksi senyawa bioaktif yang disekresikan oleh kapang tersebut. Optimasi dilakukan dengan menggunakan 3 jenis media: *Malt Extract Broth* (MEB), *Glucose Peptone Yeast* (GPY), dan *Minimal Fungal Media* (MFM); serta waktu kultivasi 2, 4, 6, 8, dan 10 minggu. Hasil riset menunjukkan bahwa ekstrak kasar kapang MFW 26-08 hasil kultivasi 2 minggu dalam medium MFM, pada konsentrasi 30 µg/mL, mampu menghambat 89% pertumbuhan sel kanker payudara T47D. Sedangkan pada konsentrasi 100 µg/mL ekstrak kapang yang dikultivasi dalam medium MEB selama 6 minggu, mampu menghambat pembentukan radikal bebas sampai 56%. Hasil identifikasi berdasarkan sifat-sifat morfologi dan molekuler menggunakan 18S rRNA, ITS1, dan ITS4 menunjukkan bahwa isolat MFW 26-08 memiliki kemiripan dengan *Aspergillus ustus* sebesar 99%.

**ABSTRACT:** *Production of bioactive substances extracted from Aspergillus ustus MFW 26-08 associated with marine sponge in various medium. By: Asri Pratitis, Gintung Patantis, Wibowo Mangunwardoyo and Ekowati Chasanah*

*The use of microbe as bioactive compounds sources has several advantages such as reducing the production time and avoiding over exploitation of marine resources. Previous research has shown that a number of microbes associated with sponges produced potential bioactive compounds, including marine fungi MFW 26-08. The objectives of this research are to optimize the cultivation of the MFW 26-08 and its production of bioactive compounds. Optimization was conducted using 3 liquid mediums, i.e Malt Extract Broth (MEB), Glucose Peptone Yeast (GPY), and Minimal Fungal Media (MFM); and cultivation time of 2, 4, 6, 8 and 10 weeks. Results showed that MFW 26-08 crude extract of 2 week-MFM cultivation, at concentration of 30 µg/mL, was able to inhibit 89% T47D (breast cancer) cell growth. While in concentration of 100 µg/mL, the MEB 6 week-cultivated extract was able to hamper free radicals (56%). Morphological and molecular analysis using 18S rRNA, ITS1 and ITS4 demonstrated that MFW 26-08 isolate was 99% similar to *Aspergillus ustus*.*

**KEYWORDS:** *bioactive, antitumour, antioxidant, Aspergillus ustus, sponge*

### PENDAHULUAN

Keanekaragaman hayati yang terdapat dalam lautan menyimpan potensi pembentukan berbagai senyawa metabolit yang berkhasiat obat. Beberapa publikasi telah melaporkan metabolit sekunder yang diisolasi dari makroalga, oktokoral, spons dan invertebrata lainnya. Namun demikian, terdapat dugaan bahwa metabolit yang dihasilkan oleh invertebrata maupun biota laut lainnya diproduksi oleh mikroorganisme yang berasosiasi pada biota tersebut

(Kelecom, 2002). Penelitian yang dilakukan oleh Berdy (2005) menunjukkan bahwa beberapa senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antibiotik, antitumor, dan antiviral diproduksi oleh bakteri yang bersimbiosis pada biota laut. Piel *et al.* (2004) juga melaporkan senyawa poliketida aktif antitumor diisolasi dari bakteri *Pseudomonas* sp. yang berasosiasi pada spons. Senyawa lain yang juga telah dilaporkan adalah *cryptophycin 1*, *chondramide*, *mimosamycin*, *apicularen A*, dan *tolytoxin* yang diisolasi dari bakteri laut (Sabdono & Radjasa, 2008).

<sup>1)</sup> Peneliti pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, KKP;  
E-mail: asri\_pra@yahoo.com

<sup>2)</sup> Staf Pengajar pada Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Alam, Universitas Indonesia

Selain bakteri, kapang termasuk mikroorganisme yang dilaporkan menghasilkan metabolit sekunder aktif. Beberapa riset menyebutkan bahwa kapang yang diisolasi dari lingkungan laut merupakan sumber yang kaya akan bahan alam berkhasiat obat. Beberapa riset menunjukkan bahwa *marine fungi* mampu memproduksi metabolit yang memiliki sifat sitotoksik (Rovirosa, 2006), maupun sebagai antioksidan yang potensial (San-Martin, 2005). Kemampuan bioaktivitas ini diduga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan habitat kapang maupun *host* kapang tersebut. Kondisi perairan dengan salinitas tinggi, tekanan yang tinggi, suhu yang bervariasi serta nutrisi yang terbatas, sangat berpengaruh terhadap pembentukan metabolit sekunder suatu organisme (Liberra & Lindequist, 1995). Hal ini yang membedakan antara kapang dari lingkungan laut dengan kapang terestrial. Hasil riset Chasanah *et al.* (2009) mendapatkan kapang jenis *Exserohilum rostratum* dan bakteri jenis *Streptomyces* sp. yang diisolasi dari spons laut asal Lombok, masing-masing memiliki aktivitas antikanker. Kanoh *et al.* (1999) melaporkan isolasi *phenylahistin* dari kapang *Aspergillus* sp. yang berpotensi sebagai antitumor. Kapang juga diketahui memproduksi penicilin dan siklosporin yang banyak bermanfaat dalam kemoterapi (Miller, 2000).

Isolat kapang MFW 26-08 merupakan isolat yang diisolasi dari perairan Wakatobi, Sulawesi Tenggara dan memiliki potensi yang baik sebagai antioksidan dan antitumor ketika dikultivasi pada suhu ruang, dengan media YPM (*yeast mannitol peptone*) selama 10 minggu (Pratitis *et al.*, 2009). Produksi senyawa bioaktif selain ditentukan oleh jenis mikroba, juga sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan tempat kapang tumbuh (Yang *et al.*, 2007). Dalam kondisi yang lebih terkendali, pembentukan metabolit sekunder oleh mikroba termasuk kapang akan dipengaruhi oleh media dan kondisi pertumbuhan seperti lamanya waktu inkubasi, suhu, pH, dan tingkat aerasi (Atalla *et al.*, 2008). Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi senyawa bioaktif yang potensial sebagai antitumor dan antioksidan dari isolat kapang MFW 26-08 yang dikultivasi secara statis dengan menggunakan 3 (tiga) jenis media dengan waktu kultivasi yang berbeda. Media yang digunakan merupakan jenis media bernutrisi tinggi, sedang, dan rendah.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Isolat kapang MFW 26-08 yang digunakan pada penelitian ini merupakan koleksi Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan

Perikanan (BBRP2B-KP), yang diisolasi dari spons asal perairan Wakatobi, Sulawesi Tenggara. Spons laut yang menjadi *host* diambil dari kedalaman 20 m dengan cara *scuba diving*. Sel lestarsi tumor payudara T47D merupakan koleksi BBRP2B-KP. Media kultivasi yang digunakan adalah *malt extract broth* (MEB), *glucose peptone yeast* (GPY), dan *minimal fungal media* (MFM). Bahan lain yang digunakan meliputi bahan-bahan kimia untuk mengekstrak bahan aktif dan pengujian bioaktivitas ekstrak kapang yang menggunakan kualitas pro analisa (*grade p.a.*).

## Metode

### Identifikasi isolat kapang

Identifikasi isolat terpilih dilakukan secara morfologi dan molekuler. Identifikasi morfologi dilakukan dengan menumbuhkan kapang dalam media selektif MEB padat selama 5 hari. Selanjutnya dilakukan pengamatan pada koloni kapang yang terbentuk. Pengamatan meliputi warna, bentuk, dan tekstur permukaan koloni. Selain itu juga dilakukan pengamatan pada bagian sisi balik koloni (*reverse side*). Identifikasi secara molekuler menggunakan primer 18S rRNA, ITS1, dan ITS4. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas), susunan primer yang digunakan sama dengan yang digunakan oleh Pang & Mitchell (2005). Reaksi PCR dilakukan dengan *Pure Taq Ready to Go PCR beads* (GE Healthcare). Sekuensing dilakukan di Laboratorium Macrogen, Korea Selatan. Hasil sekuensing dianalisis menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Atschul, 1997) dan pohon *philogenetik* menggunakan program *Treecon 1.3b*.

### Produksi senyawa metabolit

#### Kultivasi kapang dalam media cair

Kultivasi dilakukan dalam 3 (tiga) media cair, yaitu MEB (0,3% ekstrak malt; 0,3% ekstrak khamir; 0,5% pepton) yang mewakili media bernutrisi tinggi, GPY (0,1% *glucose*.H<sub>2</sub>O; 0,05% *soybean*; 0,01% ekstrak khamir) yang mewakili media bernutrisi sedang, serta MFM (0,02% ekstrak khamir; 0,1% *soluble starch*) yang mewakili media bernutrisi rendah. Ketiga jenis media tersebut dilarutkan dalam *artificial seawater/ASW*.

Inokulum kapang disiapkan dengan menggunakan metode Budijanto *et al.* (2000). *Starter* isolat kapang dibuat dalam agar miring yang telah dikultivasi selama 5 hari. Spora kapang disuspensikan dengan masing-masing media. Selanjutnya, spora dan miselium kapang dipindahkan ke dalam media kultur. Kultivasi

dilakukan selama 10 minggu dengan waktu pengamatan setiap 2 minggu.

#### **Penentuan biomassa kapang selama kultivasi**

Penentuan biomassa kapang dilakukan dengan menggunakan metode Budijanto *et al.* (2000) yang dimodifikasi. Biomassa ditentukan berdasarkan pengukuran berat kering miselium yang terbentuk setiap 2 minggu. Kultur kapang dalam media cair ditambah pelarut etil asetat p.a dengan perbandingan 1 : 1, selanjutnya campuran disonikasi untuk memecah dinding sel miselium. Setelah itu, dilakukan penyaringan dengan kertas saring *Whatman* No. 41 untuk memisahkan miselium dengan media kultur dan pelarut. Miselium selanjutnya dimasukkan ke dalam oven selama 1-2 hari, untuk menghilangkan sisa air dan pelarut, miselium yang telah kering kemudian ditimbang.

#### **Ekstraksi senyawa metabolit**

Ekstraksi senyawa metabolit dilakukan terhadap larutan media yang telah dicampur pelarut etil asetat p.a (Chasanah *et al.*, 2009). Langkah pertama, dilakukan pemisahan antara pelarut dan media kultur. Selanjutnya, pelarut organik yang telah mengandung senyawa metabolit dievaporasi untuk menghilangkan sisa pelarut. Ekstrak kasar yang diperoleh digunakan untuk pengujian selanjutnya.

#### **Pengujian bioaktivitas**

Pengujian bioaktivitas yang dilakukan meliputi penentuan kemampuan antitumor dan antioksidan.

#### **Uji sitotoksitas in vitro terhadap sel lestari tumor**

Uji sitotoksitas dilakukan dengan metode MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) menurut Zachary (2003). Sel lestari tumor payudara T47D dikultur dalam media RPMI 1640 yang mengandung *Fetal Bovine Serum*/FBS 10%, *fungizone* 1%, dan *penicillin-streptomycin* 2%.

Ekstrak kasar kapang diuji pada konsentrasi 30 µg/mL sebanyak 3 ulangan. Sampel ekstrak kapang sejumlah 100 µL dimasukkan ke dalam sumuran mikroplat yang berisi sel tumor sebanyak 10<sup>5</sup> sel (100 µL). Selain itu, dibuat kontrol yang terdiri dari kontrol sel (100 µL sel + 100 µL media), kontrol media (200 µL media), kontrol sampel (100 µL ekstrak kapang + 100 µL media) dan kontrol DMSO (100 µL sel + 100 µL konsentrasi DMSO uji). Mikroplat diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 48 jam. Selanjutnya ditambahkan 10 µL pereaksi MTT ke dalam sumuran

mikroplat, serta diinkubasikan kembali selama 4 jam dalam inkubator CO<sub>2</sub>. Reaksi MTT dihentikan dengan penambahan 100 µL Sodium Dodesil Sulfat (SDS) 10%. Mikroplat diinkubasi kembali di dalam ruang gelap pada suhu kamar selama 12 jam. Setelah inkubasi tersebut, absorbansi tiap sumuran diukur dengan *DYNEX* spektrofotometer *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm. Penentuan persentase kematian sel dihitung berdasarkan rumus:

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{(A - D) - (B - C)}{(A - D)} \times 100\%$$

Keterangan: A = Absorbansi kontrol sel  
B = Absorbansi sampel  
C = Absorbansi kontrol sampel  
D = Absorbansi kontrol media

#### **Uji aktivitas antioksidan**

Uji antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) menurut Li *et al.* (2006). Ekstrak kasar kapang diuji pada konsentrasi 100 µg/mL dalam larutan metanol p.a. Sebanyak 160 µL ekstrak dimasukkan ke dalam sumuran mikroplat kemudian ke dalam tiap sumuran ditambahkan 40 µL larutan DPPH (3 mg DPPH dalam 10 mL metanol). Selain itu, dibuat kontrol yang terdiri dari kontrol sampel (160 µL ekstrak kapang + 40 µL metanol), kontrol negatif (160 µL metanol + 40 µL DPPH), dan blanko (200 µL metanol). Asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif. Mikroplat diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian absorbansi tiap sumuran dibaca dengan *Dynex microplate reader* pada panjang gelombang 510 nm. Persentase penghambatan radikal bebas ditentukan dengan rumus:

$$\% \text{ hambatan} = \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \times 100\%$$

Keterangan: A = absorbansi kontrol negatif  
B = absorbansi blanko  
C = absorbansi sampel  
D = absorbansi kontrol sampel

## **HASIL**

### **Identifikasi Isolat Kapang**

Hasil penapisan awal menunjukkan bahwa kapang laut MFW 26-08 memiliki aktivitas antioksidan dan antikanker (Pratitis *et al.*, 2009). Morfologi spons laut (sebagai *host*) dan kapang dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Morfologi spons laut host MFW 26-08; (a) di atas permukaan air, dan (b) di dalam air.  
Figure 1. The morphology of MFW 26-08's host sea sponge; (a) above the water surface and (b) under water.



Gambar 2. Morfologi isolat MFW 26-08; (a) makroskopik, dan (b) mikroskopik.  
Figure 2. The morphology of MFW 26-08 isolate; (a) macroscopic and (b) microscopic.

Isolat MFW 26-08 yang ditumbuhkan pada medium MEB padat menunjukkan koloni yang berwarna putih kekuningan, dengan bagian tengah berwarna kuning sampai kecoklatan. Koloni kapang tidak memiliki garis-garis radial dari pusat koloni ke bagian tepinya dengan tekstur koloni yang seperti kapas. Isolat tumbuh dengan cepat pada medium MEB padat namun tumbuh lambat pada medium MFM. Bagian sisi balik koloni (*reverse side*) isolat ini berwarna kekuningan. Ciri-ciri tersebut menyerupai ciri-ciri kapang dalam genus *Aspergillus*.

*Aspergillus* merupakan kapang yang termasuk ke dalam kelas Ascomycota, yang memiliki ciri khas adanya askus yaitu tempat terbentuknya askospora. Pengamatan mikroskopik isolat MFW 26-08 menunjukkan konidiofor yang berwarna hialin (tidak berwarna), dengan vesikel yang berbentuk bulat. Fialid terbentuk di atas metula. Metula dan fialid tersebut terletak di atas konidiofor, yang menutupi seluruh bagian konidiofor (Gambar 2).

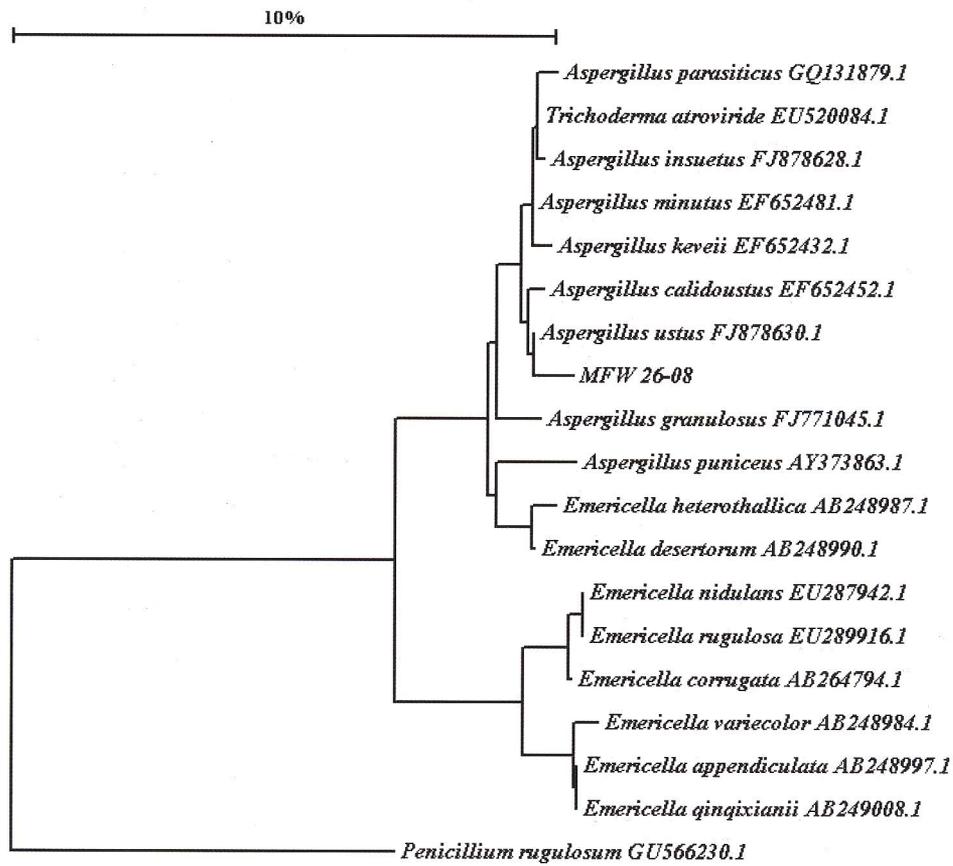
Identifikasi molekuler dilakukan dengan menggunakan primer 18S rRNA, ITS1, dan ITS4. Hasil sekuensing isolat MFW 26-08 setelah dianalisis

menggunakan program BLAST menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki kemiripan 99% terhadap *Aspergillus ustus* dengan kode FJ878630.1 (Gambar 3).

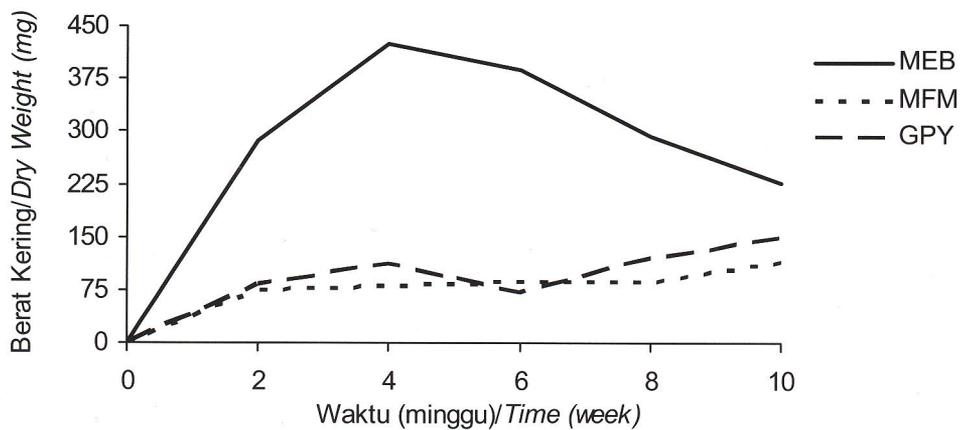
#### Produksi Senyawa Metabolit

Kurva pertumbuhan isolat kapang *Aspergillus ustus* MFW 26-08 dapat diketahui dari pengukuran biomassa kapang selama 10 minggu. Berdasarkan pengukuran biomassa kapang yang ditumbuhkan dalam tiga media kultur yang berbeda, dapat diketahui bahwa isolat kapang MFW 26-08 memiliki perubahan biomassa yang cukup besar pada kultivasi dalam medium MEB. Kondisi tersebut berbeda dengan kapang yang ditumbuhkan dalam medium MFM dan GPY. Jumlah biomassa kapang terbesar dihasilkan pada kultivasi selama 4 minggu dalam medium MEB (Gambar 4).

Secara umum, kurva pertumbuhan kapang yang diukur melalui pendekatan biomassa membentuk *S-shape* yang mewakili fase lag, eksponensial, statis, dan lisis (Anon., 2009). Setiap fase dalam kurva pertumbuhan menunjukkan kondisi kapang dalam



Gambar 3. Pohon filogenetik MFW 26-08.  
Figure 3. Phylogenetic tree of MFW 26-08.



Gambar 4. Perubahan biomassa isolat *Aspergillus ustus* MFW 26-08 selama kultivasi dalam 3 media kultur yang berbeda.

Figure 4. Changes in biomass of *Aspergillus ustus* MFW 26-08 during cultivation within 3 different culture media.

media pertumbuhannya. Pada fase lag, pertumbuhan kapang cenderung lambat. Hal ini berkaitan dengan adaptasi spora dengan lingkungan yang baru, sehingga jumlah biomassa kapang terbatas. Selama waktu tersebut, miselium kapang tumbuh dengan

lambat. Pertumbuhan kapang meningkat pesat pada fase eksponensial, yaitu ketika kapang bereproduksi secara maksimal. Kondisi ini terus berlangsung sampai satu atau beberapa faktor membatasi nutrisi pada media, seperti jumlah oksigen yang menipis dan

akumulasi sisa metabolik yang berubah menjadi racun. Fase selanjutnya adalah penurunan jumlah biomassa, yaitu saat faktor pembatas pertumbuhan mulai meningkat. Akibatnya, pertumbuhan kapang menjadi lambat. Fase ini berlangsung sampai kondisi statis, yaitu saat nutrisi dalam media hampir habis sehingga tidak ada lagi pertumbuhan kapang. Fase statis ini diakhiri dengan fase lisis.

Walaupun secara umum pertumbuhan kapang membentuk pola yang sama, kecepatan dan besar pertumbuhan kapang berbeda-beda tergantung pada media yang digunakan (Meletiadis *et al.*, 2001). Dari Gambar 4, diketahui bahwa kapang *Aspergillus ustus* MFW 26-08 mengalami fase eksponensial sejak 2 minggu pertama kultivasi. Pada medium MEB, fase eksponensial ini berlangsung sampai minggu ke-4 dan mengalami penurunan biomassa sampai minggu ke-10. Pertumbuhan biomassa yang lebih lambat ditunjukkan oleh kapang yang dikultivasi pada media MFM dan GPY. Pada medium MFM, pertumbuhan kapang sejak minggu ke-2 hingga ke-10 relatif sangat lambat. Kondisi serupa juga ditunjukkan oleh kapang yang dikultivasi pada medium GPY. Perbedaan pertumbuhan kapang pada ke tiga media kultur tersebut diduga terjadi karena adanya perbedaan komposisi nutrisi pada media yang digunakan. Nutrien dalam medium merupakan faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan (Cormican & Pfaller, 1996). Komposisi yang cukup beragam dalam media kultur MEB menyebabkan kandungan nutrisi MEB menjadi lebih kaya dibanding media MFM dan GPY. Media MEB mengandung 0,3% ekstrak malt; 0,3% ekstrak khamir; dan 0,5% pepton yang kaya akan unsur C, H, dan O sebagai sumber nutrisi utama kapang. Sebaliknya, medium MFM terdiri dari 0,02% ekstrak khamir dan 0,1% *soluble starch*; sementara

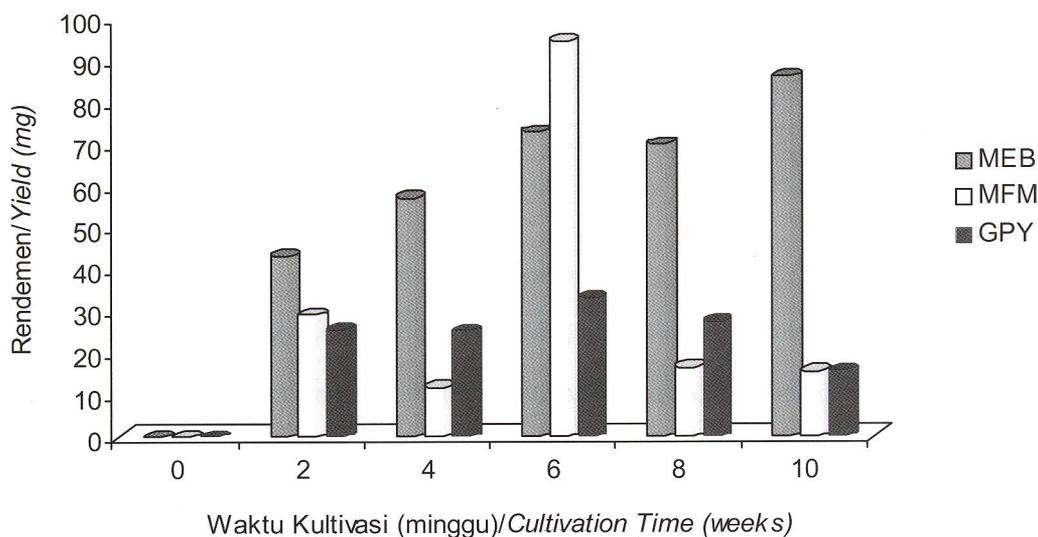
GPY mengandung 0,1% glukosa; 0,05% *soybean*; dan 0,01% ekstrak khamir yang mengandung nutrisi yang lebih rendah.

Grafik perubahan biomassa isolat *Aspergillus ustus* MFW 26-08 memiliki pola yang berbeda dengan grafik rendemen ekstrak kasar kapang dalam pelarut etil asetat. Walaupun biomassa tertinggi ditunjukkan oleh kapang yang dikultur dalam medium MEB selama 4 minggu (Gambar 4.) namun rendemen ekstrak kasar tertinggi dihasilkan pada kultivasi dalam medium MFM selama 6 minggu. Hal ini menunjukkan bahwa biomassa tidak selalu berbanding lurus dengan rendemen ekstrak kasar yang dihasilkan. Rendemen ekstrak kasar yang merupakan senyawa metabolit sekunder mikroba sebagian besar diproduksi pada fase statis, yaitu saat nutrisi dalam lingkungan menurun dan menjadi pembatas (Calvo *et al.*, 2002). Oleh karena itu, kapang yang ditumbuhkan dalam media dengan nutrisi yang terbatas cenderung menghasilkan senyawa metabolit yang lebih tinggi (Gambar 5).

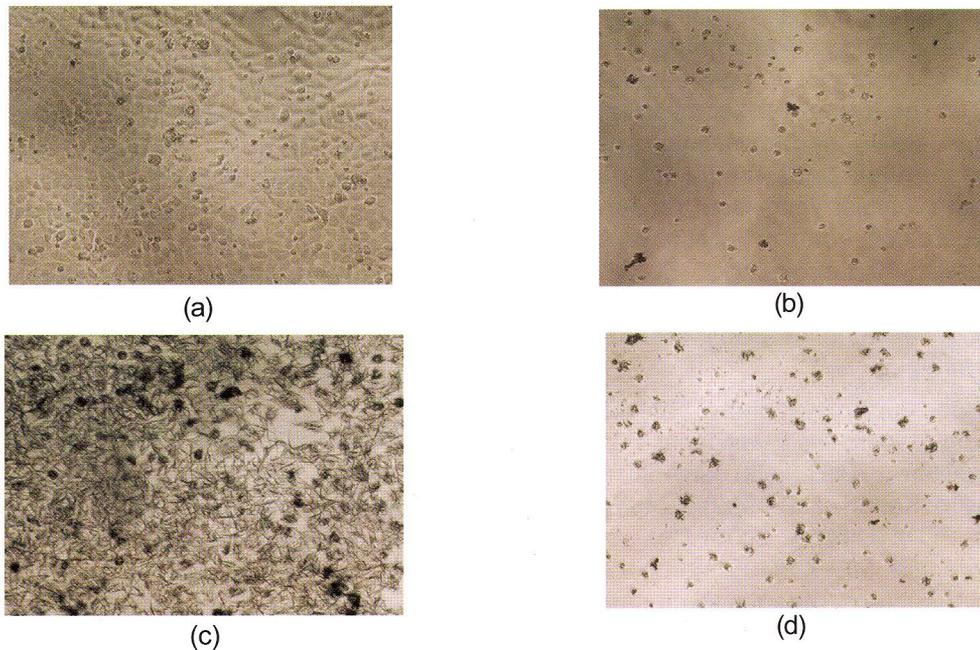
### Bioaktivitas Ekstrak Kasar Kapang *Aspergillus ustus* MFW 26-08

#### Pengujian antikanker

Hasil pengujian ekstrak terhadap sel lestari tumor payudara T47D secara *in vitro* menunjukkan bahwa pada konsentrasi 30 µg/mL ekstrak kasar isolat kapang *Aspergillus ustus* MFW 26-08 yang dikultur pada media MFM selama 2 minggu mampu menyebabkan kematian 89% sel uji. Penambahan ekstrak kasar kapang ke dalam sel uji selama 48 jam menyebabkan perubahan morfologi sel uji. Hal ini terlihat dari sedikitnya kristal formazan yang terbentuk



Gambar 5. Jumlah rendemen ekstrak kasar isolat kapang *Aspergillus ustus* MFW 26-08 selama 10 minggu.  
Figure 5. Total yield of crude extract of *Aspergillus ustus* MFW 26-08 during 10 weeks cultivation.

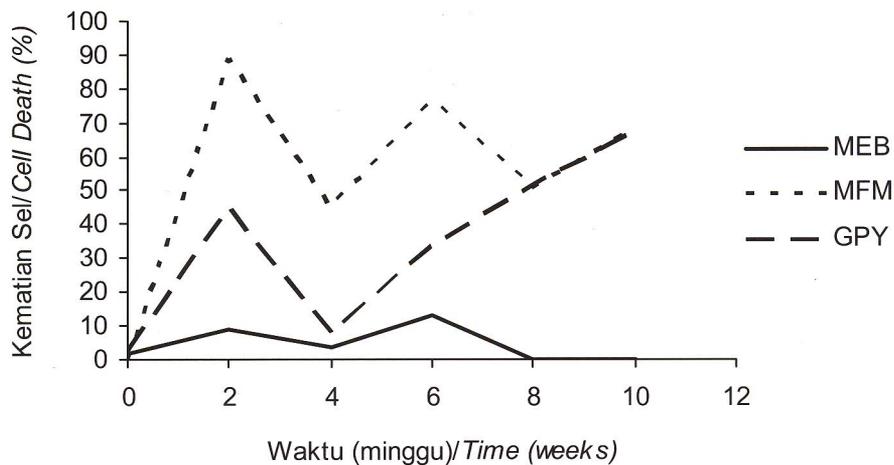


Gambar 6. Morfologi sel uji T47D dalam pengujian antitumor; (a) sel kontrol, (b) sel uji diberi perlakuan ekstrak kapang, (c) formazan pada sel kontrol, dan (d) formazan pada sel diberi ekstrak kapang.

Figure 6. The morphology of T47D cells in the antitumor test; (a) control cells, (b) cells treated with fungal extracts, (c) formazan in control cells and (d) formazan in the cells treated with fungal extracts.

selama pengujian (Gambar 6). Pembentukan kristal formazan terjadi karena adanya reaksi enzim suksinat dehidrogenase pada mitokondria sel hidup terhadap garam tetrazolium yang digunakan dalam pengujian. Enzim suksinat dehidrogenase hanya diproduksi oleh sel hidup, sehingga jumlah kristal formazan yang terbentuk sebanding dengan jumlah sel yang masih hidup. Semakin banyak sel yang hidup maka jumlah formazan yang terbentuk semakin besar (Zachary, 2003).

Pengujian bioaktivitas ekstrak kasar kapang *Aspergillus ustus* MFW 26-08 terhadap sel lestri tumor payudara T47D secara *in vitro* menunjukkan adanya aktivitas berbeda dari setiap ekstrak terhadap sel yang diujikan. Ekstrak kasar kapang dari medium MFM menyebabkan kematian sel uji yang cenderung lebih besar bila dibandingkan dengan ekstrak kapang yang diperoleh dari kultivasi dengan media MEB dan GPY (Gambar 7). Potensi antitumor yang ditunjukkan oleh kemampuan mematikan sel tumor terbesar



Gambar 7. Grafik nilai bioaktivitas antitumor ekstrak kasar isolat *Aspergillus ustus* MFW 26-08 dalam berbagai media.

Figure 7. Graph of the value of antitumor bioactivity of crude extract of *Aspergillus ustus* MFW 26-08 isolate in various media.

ditunjukkan oleh ekstrak yang dikultur dalam medium MFM selama 2 minggu. Penambahan sampel dari medium MFM sebanyak 30 µg/mL kedalam sel uji selama 48 jam menyebabkan kematian sel sebanyak 89%. Sementara itu, pada konsentrasi yang sama, ekstrak hasil kultur pada media GPY dan MEB menunjukkan inhibisi yang lebih rendah, masing-masing sebesar 68% dan 13% pada waktu kultivasi masing-masing 10 dan 6 minggu. Berdasarkan hal tersebut, maka kultur optimal *Aspergillus ustus* MFW 26-08 sebagai antitumor adalah pada medium MFM selama 2 minggu.

Beberapa studi melaporkan bahwa, senyawa metabolit dari *Aspergillus ustus* dapat menyebabkan kematian sel tumor A431 (kulit) dan A549 (paru-paru) secara *in vitro* (Kanoh *et al.*, 1999); sel tumor L5178Y, HeLa, serta PC12 (Liu *et al.*, 2009). Dengan demikian, *Aspergillus ustus* MFW 26-08 merupakan kapang lokal yang berpotensi menghasilkan senyawa aktif antitumor.

**Pengujian antioksidan**

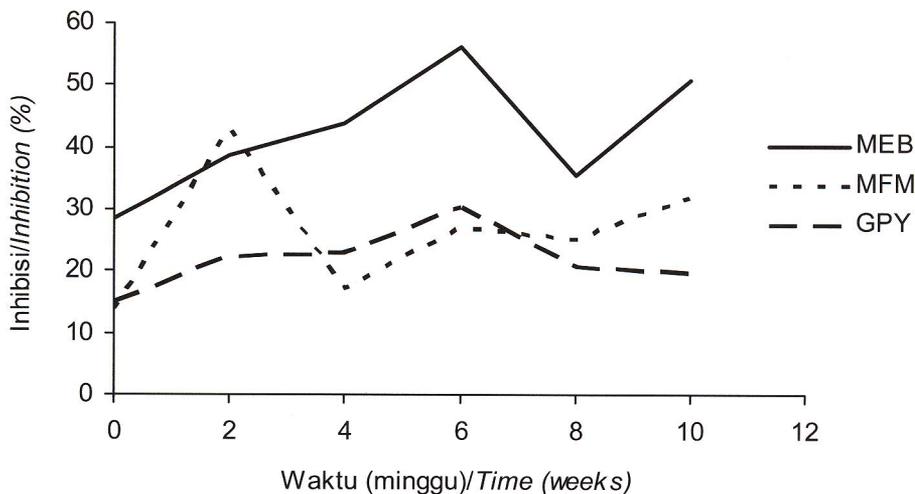
Pengujian antioksidan dengan menggunakan metode DPPH menunjukkan adanya aktivitas inhibisi pembentukan radikal bebas pada masing-masing ekstrak yang diujikan. Inhibisi terbesar ditunjukkan oleh ekstrak kasar yang dihasilkan selama kultivasi 6 minggu pada medium MEB, yaitu 56% (Gambar 8). Pada konsentrasi yang sama, kontrol positif asam askorbat yang digunakan sebagai pembanding memberikan inhibisi sebesar 85%. Penghambatan yang rendah diduga disebabkan oleh sifat ekstrak yang berupa senyawa campuran.

Beberapa senyawa murni memiliki aktivitas penghambatan radikal bebas >50% pada konsentrasi yang cukup tinggi. Hal ini ditunjukkan oleh 1S)-(+)-curcuphenol yang diisolasi dari *Didiscus* spp. dengan IC<sub>50</sub> pada 209 µg/mL (El Sayed *et al.*, 2002 dalam Takamatsu *et al.*, 2003) dan puupehenone dari biota *Hyrtios* spp. sebesar 27 µg/mL (Rafi *et al.*, 1979 dalam Takamatsu *et al.*, 2003). Dengan demikian, ekstrak kasar kapang MFW 26-09 berpeluang sebagai sumber antioksidan.

**KESIMPULAN DAN SARAN**

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Identifikasi berdasarkan sifat-sifat morfologi dan molekuler menggunakan 18S rRNA dan ITS1 dan ITS4 menunjukkan bahwa isolat MFW 26-08 memiliki kemiripan dengan *Aspergillus ustus* sebesar 99%.
2. Produksi biomassa kapang dari isolat MFW 26-08 diperoleh secara maksimal pada kultivasi selama 4 minggu dalam medium MEB, sementara rendemen terbesar dihasilkan dari kultur kapang pada medium MFM selama 6 minggu.
3. Ekstrak kasar kapang MFW 26-08 hasil kultivasi 2 minggu dalam medium MFM pada konsentrasi 30 µg/mL mampu menghambat 89% pertumbuhan sel kanker payudara T47D. Sedangkan pada konsentrasi 100 µg/mL ekstrak kapang yang dikultivasi dalam medium MEB selama 6 minggu, mampu menghambat pembentukan radikal bebas sampai 56%.



Gambar 8. Grafik nilai bioaktivitas antioksidan ekstrak kasar isolat *Aspergillus ustus* MFW 26-08 dalam berbagai media.

Figure 8. The value of antioxidant bioactivity of crude extract of *Aspergillus ustus* MFW 26-08 isolate in various media.

4. Pada penelitian selanjutnya, disarankan untuk memproduksi senyawa bioaktif isolat kapang *Aspergillus ustus* MFW 26-08 pada medium MFM dengan skala yang lebih besar, untuk mendapatkan jumlah ekstrak kasar yang lebih banyak. Selain itu, juga dibutuhkan pemurnian senyawa aktif lebih lanjut untuk menghasilkan aktivitas antitumor dan antioksidan yang lebih baik.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2009. Growth kinetics in liquid media : batch culture. <http://www.fungionline.org.uk/5kinetics/2batch.html>. Diakses pada tanggal 4 April 2009.
- Atschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids Res.* 25(17): 3389–3402.
- Attala, M.M., Zeinab, H.K., Eman, R.H., Amani, A.Y., and Abeer, A.A. 2008. Production of some biologically active secondary metabolites from marine-derived fungus *Varicosporina ramulosa*. *Mal. J. Microbiol.* 4(1):14–24.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites: A personal view. *J. Antibiot.* 58(1): 1–26.
- Budijanto, S., Nuraida, L., dan Susanto, A. 2000. Studi stabilitas minyak kapang *Mucor inaequisporus* M05 II/4 kaya asam gamma linolenat selama penyimpanan. *Bul. Teknol. dan Industri Pangan.* 11(2): 49–54.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., and Keller, N.P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(3): 447–459.
- Chasanah, E., Januar, H.I., Irianto, H.E., Bourne, D., Liptrot, C., and Wright, A. 2009. Screening of anticancer activity of fungi derived from Indonesian marine sponges. *Journal Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology Special Edition in Conjunction with World Ocean Conference 2009.* 4: 1–8.
- Cormican, M.G. and Pfaller, M.A. 1996. Standardization of antifungal susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* 38(4): 561–578.
- Kanoh, K., Kohno, S., Kahtada, J., Hayashi, Y., Muramatsu, M. and Uno, I. 1999. Antitumor activity of phenylhistin *in vitro* and *in vivo*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(6): 1130–1133.
- Kelecom, A. 2002. Secondary metabolites from marine microorganism. *An. Acad. Bras. Cienc.* 74(1): 151–170.
- Li, Y., Li, X., Lee, U., Kang, J.S., Choi, H.D., and Son, B.W. 2006. A new radical scavenging anthracene glycoside, asperflavin ribofuranoside, and polyketides from a marine isolat of the fungus *Microsporium*. *Chem. Pharm. Bull.* 54(6): 882–883.
- Liberra, K. and Lindequist, U. 1995. Marine fungi-a prolific resource of biologically active natural products. *Pharmazie.* 50(9): 583–588.
- Lim, S. H., Darah, I. and Jain, K. 2006. Antimicrobial activities of tannins extracted from *Rhizophora apiculata* barks. *J. Trop. For. Sci.* 18(1): 59–65.
- Liu, H., RuAngelie, E. E., Ebel, R., Wang, Y., Schulz, B., Draeger, S., Muller, W.E.G., Wray, V., Lin, W. and Proksch, P. 2009. Drimane sesquiterpenoids from the fungus *Aspergillus ustus* isolated from the marine sponge *Suberites domuncula*. *J. Nat. Prod.* 72(9): 1585–1588.
- Meletiadis, J., Meis, J. F. G. M., Mouton, J. W., and Verweij, P. 2001. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *J. Clin. Microbiol.* 39(2): 478–484.
- Miller, J.D. 2000. Screening for secondary metabolites. In Hyde, K.D. and Pointing, S.B. (eds.). *Marine Mycology-A Practical Approach*. Fungal Diversity Research Series I, Fungal Diversity Press. Hong Kong. p.158–171.
- Pang, K. and Mitchell, J.I. 2005. Molecular approaches for assessing fungal diversity in marine substrata. *Bot. Mar.* 48(5): 332–347.
- Piel, J., Hui, D., Wen, G., Butzke, D., Platzer, M., Fusetani, N., and Matsunaga, S. 2004. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *PNAS.* 101(46): 16222–16227.
- Pratitis, A., Nursid, M., Januar, H. I., Mangunwardoyo, W. dan Chasanah, E. 2009. Isolasi dan uji bioaktivitas kapang yang berasosiasi dengan invertebrata laut asal perairan Wakatobi. *Prosiding Seminar Nasional Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 13 Agustus, Jakarta.
- Rovirosa, J., Marrero, A.D., Darias, J., Painemal, K., and San-Martin, A. 2006. Secondary metabolites from marine *Penicillium brevicompactum*. *J. Chil. Chem. Soc.* 51(1): 775–778.
- Sabdono, A. and Radjasa, O.K. 2008. Microbial symbionts in marine sponges: Marine natural product factory. *J. Coast. Dev.* 11(2): 57–61.
- San-Martin, A., Painemal, K., Diaz, Y., Martinez, C. and Rovirosa, J. 2005. Metabolites from the marine fungus *Cladosporium cladosporioides*. *J. Argent. Chem. Soc.* 93(4-6): 247–251.
- Takamatsu, S., Hodges, T.W., Rajbhandari, I., Gerwick, W.H., Hamann, M.T., and Nagle, D.G. 2003. Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *J. Nat. Prod.* 66: 605–608.
- Yang, L. H., Miao, L., Lee, O. O., Li, X., Xiong, H., Ka-Lai, P., Vrijmoed, L., and Pei-Yuan, Q. 2007. Effect of culture conditions on antifouling compound production of a sponge-associated fungus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 1221–1231.
- Zachary, I. 2003. Determination of cell number. In Hughes, D. and Mehmet, H. (eds). *Cell proliferation and apoptosis*. BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford. p.17–23.