

Sitotoksitas Ekstrak *Aspergillus fumigatus* dari Daun Mekai (*Albertisia papuana* Becc.) terhadap Sel Kanker Payudara T47D dan MCF-7

Cytotoxicity of *Aspergillus fumigatus* from Mekai leaves (*Albertisia papuana* Becc.) on T47D and MCF-7 Breast Cancer Cells

Hasnaul Maritsa¹*, Soekarti Moeljopawiro², Rina Sri Kasiamdari²

¹ Fakultas Sains Teknologi, Jurusan Biologi Universitas Jambi

² Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta

Email: Hasnaul.maritsa123@gmail.com, japawiros@yahoo.com, rkasiamdari@yahoo.com.au

ABSTRACT

The previous studies showed that the *Albertisia papuana* Becc. root have cytotoxicity on breast cancer. The *A. papuana* root toxicity on breast cancer could not only by plant secondary metabolism, but may be also by secondary metabolism of endophytes. *Aspergillus fumigatus* is one of endophytes that have anticancer agent. Endophytes can be distributed dynamically in whole of plant organ, one of them are leaves. Therefore the objective of this studies were to know the presence of *A. fumigatus* in *A. papuana* leaves, and the cytotoxicity of their secondary metabolism on breast cancer cells. The sample of *A. papuana* were collected from Botanical Zoo of Bogor, while T47D and MCF-7 cell lines were obtained of Tropical Medicine's Faculty, UGM. Isolation of endophytes was done by growing leaves extract on *water agar* 2 % medium. Secondary metabolism was extracted from fermented broth using in ethyl acetat and n-butanol. The cytotoxicity was perform by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The result showed that *A. fumigatus* associated with *A. papuana* leaves. Ethyl acetat extract from fermented *A. fumigatus* both on T47D and MCF-7 cell lines had lower (IC₅₀ 50, 444 µg/ml and 59 µg/ml) than n-butanol (IC₅₀ 103, 398 µg/ml and 127,188 µg/ml). It could be said that *A. fumigatus* from *A. papuana* leaves could induce cytotoxicity on T47D and MCF-7 breast cancer cells.

Keywords: cancer, *Aspergillus fumigatus*, secondary metabolism, *Albertisia papuana* Becc., cytotoxicity

PENDAHULUAN

Pengalaman dan pengetahuan masyarakat terhadap khasiat suatu tanaman telah banyak menuntun peneliti dalam menemukan obat baru yang efektif terhadap kanker (Newman & Cragg, 2009). *Albertisia papuana* Becc. atau dikenal dengan nama Mekai merupakan salah satu tumbuhan yang dipercayai masyarakat lokal di Kalimantan Timur, akarnya dapat mengobati kanker (Susiarti & Setyowati, 2005). Widyasari (2012) membuktikan ekstrak akar *A. papuana* dari Kalimantan Timur menghasilkan senyawa alkaloid dan memiliki daya sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D.

Kebiasaan menggunakan akar *A. papuana* sebagai obat antikanker menyebabkan tanaman ini dapat menjadi punah, padahal aktivitas ekstrak akar untuk antikanker tidak hanya dihasilkan oleh metabolit tanaman namun dapat juga dari endofit, salah satunya adalah *Aspergillus fumigatus*. Sebagai mikrobia endofit, *A. fumigatus* dapat berasosiasi dengan tanaman dan terdistribusi di seluruh organ tanaman. Kusari *et al.*, (2009) mengungkapkan bahwa *A. fumigatus* yang berasosiasi dengan kulit kayu tanaman *Juniperus communis* L. menghasilkan senyawa yang sitotoksik terhadap berbagai sel kanker yaitu sel Kanker Paru (A549), Kanker Ovari (SK-

OV-3), sel Kanker Kulit (SK-MEL-2), sel Kanker Kolon (HCT15), kanker Melanoma Murin (B16F10) dan sel Leukimia Kronis (K562). Ruma *et al.* (2013) mendapatkan *A. fumigatus* dari ranting tanaman *Garcinia morella* memiliki aktifitas bersifat sitotoksik terhadap sel Hela. Selain itu, Prabavanthy & Nachiyar (2013) juga telah mendapatkan *A. fumigatus* dari daun tanaman *Justicia beddomei* memiliki aktifitas yang bersifat sitotoksik terhadap sel Kanker Paru A549.

Fathoni (2013) menyebutkan bahwa fungi yang berasosiasi dengan daun *A. papuana* memiliki aktifitas sebagai antibiotik. Informasi mengenai daun *A. papuana* masih belum diketahui, terutama sebagai habitat *A. fumigatus* yang mampu menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat sitotoksik terhadap sel kanker payudara, sehingga perlu dilakukan penelitian terhadap *A. fumigatus* daun *A. papuana* sebagai penghasil senyawa yang bersifat sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dan MCF-7

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni-Oktober 2014 di Laboratorium Mikrobiologi UGM, dan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT-UGM), Yogyakarta.

Isolasi dan Identifikasi *A. fumigatus*

Metode yang digunakan mengikuti metode Strobel (1996) dan Arnold (2003). Daun yang diperoleh dari Kebun Raya Bogor dipotong sepanjang 0,5 cm² dan disterilisasi secara berurutan dengan alkohol 70%, NaOCl 4% dan aquades steril selama 1 menit dan ditumbuhkan pada medium *water agar* 2% ditambahkan ekstrak daun. Inkubasi dilakukan pada

kondisi gelap dan kondisi terang bertemperatur 37 °C. *A. fumigatus* yang terdeteksi diamati berdasarkan karakter fenotipik seperti bentuk permukaan atas-bawah koloni, warna, diameter, sklerotium, konidia/spora, hifa/miselium konidiofor, dan ada atau tidaknya septa. Setelah itu, difermentasikan untuk memproduksi metabolit sekunder.

Produksi Metabolit Sekunder

A. fumigatus yang berukuran 5 mm dikultivasi pada *Potato Dextrosa Broth*, pH 7,2 - 7,4 dan difermentasikan selama 21 hari pada kondisi statis (Gangadevi & Muthmuary, 2008). Ekstrak kasar disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit, suhu -4 °C. Supernatan diekstraksi dengan etil asetat, dan dicuci dengan air. Air hasil pemisahan ini diekstraksi dengan n-butanol, sedangkan ekstrak etil asetat dilarutkan secara berurutan dengan 90 % metanol dan n-heksana. Kemudian, dilakukan evaporasi sampai dihasilkan ekstrak kasar.

Uji Sitotoksitas

Ekstrak etil asetat dan n-butanol *Aspergillus fumigatus* diuji daya sitotoksitasnya terhadap sel kanker payudara T47D dan MCF-7 serta sel vero sebagai sel normal. Preparasi ekstrak dibuat mengikuti prosedur Sudha & Selvam (2013) yaitu 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,3125; 0,156; 0,078; 0,039; 0,020 dan 0,098 mg/ml.

Sebanyak 100 µl sampel ekstrak yang sudah dipreparasi ditambahkan pada *cell line* yang telah konfluen. Perlakuan setelah 24 jam ditambahkan reagen MTT dan diinkubasi selama 4-6 jam. Pembacaan *microplate Elisa Reader* pada λ 550 nm dilakukan setelah pemberian *Stopper* SDS 10%

dalam HCl 0,1 N yang dilarutkan pada tiap sumuran setelah diinkubasi pada kondisi gelap di suhu ruangan selama satu malam.

Data dianalisis mengikuti metode Masriani *et al.* (2014). Persentase sel yang hidup dihitung dengan rumus:

$$\% P = \frac{A_{550}(S_E) - A_{550}(K_M)}{A_{550}(S_K) - A_{550}(K_M)} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ diperoleh dari persamaan regresi linear persentase sel hidup vs log kadar konsentrasi. Keterangan. S_E=Sel yang ditambahkan ekstrak, K_M=Kontrol Media, dan S_K=Sel kontrol Sedangkan Indeks Selektifas (IS) dihitung menggunakan rumus:

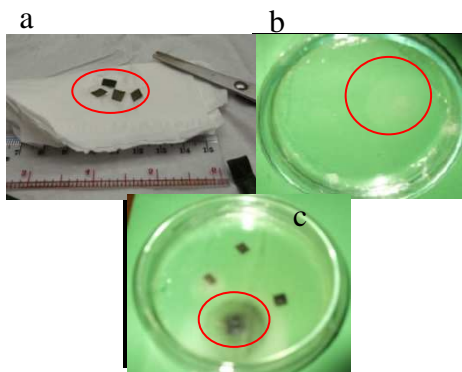
$$IS = \frac{IC_{50} \text{ Vero}}{IC_{50} \text{ Sel Kanker}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Identifikasi

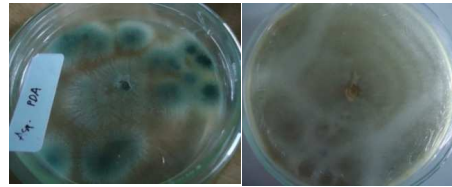
A. fumigatus Daun *A. papuana*

Daun yang digunakan adalah daun sehat yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua yaitu pada urutan ke 3-5 dari pucuk yang ditandai dengan warna hijau terang dan mengkilat pada permukaannya serta terbebas dari gangguan herbivora dan gejala simptomatis. Pertumbuhan endofit daun *A. papuana* ini dapat dilihat pada gambar 1, sedangkan morfologi *A. A. fumigatus* dapat dilihat pada gambar 2.

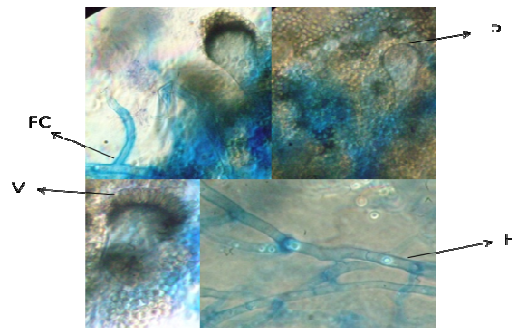


Gambar 1. Pertumbuhan Endofit Daun *A. papuana* (a). Segmen daun 0,5 cm² (b).

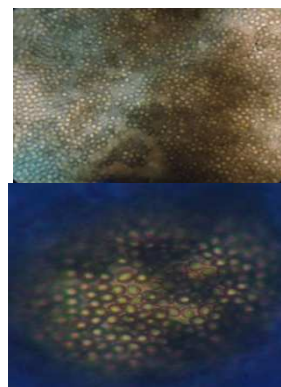
Ketidakberhasilan sterilisasi (c). Isolat endofit



Gambar 2. Morfologi koloni *A. fumigatus* daun *A. papuana* (a) Permukaan atas, berwarna hijau, tepi marginal berwarna putih, diameter koloni 3-15 cm, (b). Koloni yang terlihat dari permukaan bawah berwarna putih berair



Gambar 3. Morfologi Mikroskopis *A. fumigatus* Daun *A. papuana*, (a), Sel kaki memiliki lebar 2,5 µm (b) Vesikel dengan diameter pxl = 15 µm x 18 µm, dan konidiofor 80 µm x 2,5 µm (c), Phialida memiliki panjang 5 µm, (d) Hifa bersekat dan bercabang. Perbesaran 100X. Keterangan, FC= Sel kaki, V= Vesikel, P= Phialida, H=Hifa



Gambar 4. Morfologi konidia *A. fumigatus* daun *A. papuana* (atas). Permukaan Spora *A. fumigatus* halus dan berwarna hijau, berdiameter 2-3 µm, (bawah), Sporangium berdiameter 19-20 µm, berbentuk *globose* dan *subglobose*, Perbesaran 100X.

Berdasarkan hasil pengamatan koloni (Gambar 2a). Isolat *A.*

fumigatus daun *A. papuana* berwarna hijau di permukaan atas koloni, Pada permukaan bawahnya berwarna hijau berair dengan bagian tepi marginal atas berwarna putih, Sel kaki menghasilkan konidiofor (*stalk*) dengan dinding yang halus dan tidak berwarna (Gambar 3a). Pada ujung konidiosfornya terdapat suatu daerah yang disebut vesikel berbentuk columnar (Gambar 3b), dan didukung oleh sterigmata yang membentuk kipas dan tumbuh pada vesikelnya berbarisan tunggal (*uniseriate form*). Sterigmatanya berupa sterigmata sekunder atau dikenal dengan *phialida* yang tiap anakannya menghasilkan spora (Gambar 3c). Hifanya bercabang, berseptat dan tidak berwarna (Gambar 3d). Sedangkan spora *A. fumigatus* memiliki diameter 2-3 μm dan berwarna hijau bercahaya serta berbentuk globose dan subglobose (Gambar 4).

Sitotoksitas Ekstrak Metabolit Sekunder *A. fumigatus* dari Daun *A. papuana* terhadap Sel Kanker Payudara

Tabel 1. Nilai IC_{50} Ekstrak Etil setat dan n-butanol *A.fumigatus*

| Ekstrak <i>A. fumigatus</i> | IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) | |
|-----------------------------|--------------------------------|---------|
| | T47D | MCF-7 |
| Etil asetat | 50,44 | 59 |
| n-butanol | 103,398 | 127,188 |

Berdasarkan nilai IC_{50} , dapat dilihat bahwa ekstrak etil asetat memiliki aktifitas sitotoksik lebih baik dua kali lipat dibandingkan n-butanol. Kemungkinan hal ini terjadi dikarenakan senyawa etil asetat yang bersifat semipolar mengikat semua senyawa dari semipolar sampai polar, sehingga senyawa polar yang dapat

diikat oleh n-butanol tidak banyak lagi akibat sudah tersari pada etil asetat sebelumnya, sehingga ekstrak etil asetat memiliki aktifitas sitotoksik lebih baik dibandingkan n-butanol. Pada tabel tersebut juga terlihat bahwa kemampuan ekstrak etil asetat sebagai senyawa sitotoksik tidak terlalu berbeda nyata pada dua sel kanker payudara yaitu 50,44 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel T47D dan 59 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel MCF-7. Aktifitas sitotoksik ekstrak etil asetat *A. fumigatus* endofitik juga dipengaruhi oleh genetis tanaman hospesnya. Sebagaimana diungkapkan oleh Strobel (1998) bahwa asosiasi dengan tanaman inangnya memungkinkan terjadinya transfer genetis dari tanaman ke fungi. Hal ini dapat dilihat pada akar *A.papuana* dari Kalimantan Timur yang diteliti Widyasari, (2012) bersifat sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D. Hal ini mungkin toksisitasnya berkorelasi dengan *A. fumigatus* yang berasosiasi dengan tanaman inangnya. Akan tetapi, aktifitas sitotoksiknya endofitik daun jauh lebih rendah sepuluh kali lipat dibandingkan akar *A papuana* yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 4,418 $\mu\text{g/ml}$. Walaupun dalam penelitian ini didapatkan nilai IC_{50} yang tinggi namun hal ini dimungkinkan karena organ akar merupakan tempat berkompetisinya mikrobia patogenik dan kaya sumber nitrogen seringkali memiliki aktifitas lebih toksik dibandingkan daun.

Sitotoksitas Ekstrak Metabolit Sekunder *A. fumigatus*

Perbandingan uji sitotoksitas ekstrak *A. fumigatus* terhadap sel kanker payudara dan sel vero sebagai sel normalnya dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Nilai IC₅₀ Ekstrak etil asetat dan n-butanol *A. fumigatus* terhadap sel Vero dan Indeks Selektifitas Ekstrak terhadap Sel Kanker Payudara.

| Ekstrak <i>A. fumigatus</i> | IS | | IC ₅₀ |
|-----------------------------|-------|-------|------------------|
| | T47D | MCF-7 | Sel Vero |
| Etil asetat | 3,872 | 3,30 | 195,314 |
| butanol | 8,716 | 7,086 | 901,29 |

Pada tabel 2 dapat dilihat bahwa ekstrak etil asetat ataupun n-butanol *A. fumigatus* memiliki tingkat keselektifan yang tinggi terhadap dua sel kanker T47D dan MCF-7 dengan nilai berturut turut sebesar 3,872 dan 3,310 pada ekstrak etil asetat serta 8,716 dan 7,086 pada ekstrak n-butanol. Menurut Masriani *et al.*, (2014) standar penetapan ekstrak yang sangat selektif dalam menghambat kematian sel kanker atau dikenal dengan Indeks Selektifitas (IS) berkisar >3. Dengan demikian, *A. fumigatus* endofitik daun *A. papuana* berpotensi dikembangkan sebagai agen sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dan MCF-7

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil pembahasan dan analisis data dapat disimpulkan sebagai berikut: *A. fumigatus* hasil isolasi daun *A. papuana* (IC₅₀. 50, 444 µg/ml dan 59 µg/ml) memiliki aktifitas sitotoksik lebih baik dibandingkan ekstrak n-butanol (IC₅₀. 103, 398 µg/ml dan 127,188 µg/ml, dan memiliki indeks selektifitas 3,872 dan 3,310 pada ekstrak etil asetat serta 8,716 dan 7,086. Kedua tidak toksik terhadap sel vero pada IC₅₀. 195,314 µg/ml. Dalam hal ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat hubungan Mutualistik dan Laten Patogenik antara *A. fumigatus* dengan daun *A. papuana* secara inplanta, pemurnian dan menemukan senyawa aktif yang larut di dalam ekstrak etil

asetat *A. fumigatus* hasil isolasi daun *A. papuana*

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Ibu Prof. Soekarti Moeljopawiro M. App. Sc., P.hD dan Ibu Rina Sri Kasiamdari, P.hD, beserta Laboran Mikrobiologi UGM, Laboran Fakultas Kedokteran Tropis UGM, dan Laboran Pengujian Terpadu (LPPT-UGM), Yogyakarta

DAFTAR PUSTAKA

- Arsenijevic, V.A S. A., Pekmezovic, M. G., Rajkovic, K. M., Vekic, B.P., Barac, A. M., Otasevic S.Tasic & Petkovic L.D.J. 2014. *In vitro* Protease Inhibition and Cytotoxicity of *Aspergillus fumigatus* Biomolecules Secreted under Long-Term Aerated Conditions *Int. J. Med. Sci.* **11** (11): 1133-1139
- Cragg, G. M., Grothaus, G. P & Newman, D. J. 2009. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents *Chem. Rev.* **109**: 3012-3043.
- Doyle, V.P., Peter, V., Oudemans., Stephen, A., Rehner & Litt, A. 2013. Habitat and Host Indicate Lineage Identity in *Colletotrichum gloeosporioides* from Wild and Agricultural Landscapes in North America. *Plos One.* **8** (5): 1-20
- Fathoni, A. 2013. Isolasi, Karakterisasi, dan Aktivitas Biologi Metabolit Jamur Endofit dari Tumbuhan *Albertisia papuana* Becc. sebagai Antibiotik. *Tesis.* Fakultas Kimia Universitas Indonesia, Jakarta.
- Gangadevi, V & Muthumary. J. 2008. Isolation of a Novel Endophytic Taxol-Producing Fungus from the Leaves of a Medicinal Plant *Justicia gendarussa*. *Mycologia Balcanica.* **5**: 1-4
- Gastebois, A., Clavaud, C., Aimaniana, V & Latgé J.P. 2009. *Aspergillus*

- fumigatus*: Cell Wall Polysaccharides, Their Biosynthesis and Organization. *Future Microbiol.* 4 (5):583-95.
- Juliette, A. A, Sheng-X., Lin-m. Aka, J.A & Lin,S.X .2012. Correction: Comparison of Functional Proteomic Analyses of Human Breast Cancer Cell Lines T47D and MCF7. *Plos One.* 7(4):1-9
- Kinghorn, A. D., Pan, L., Fletcher, J.N & Chai, H. 2011. The Relevance of Higher Plants in Lead Compound Discovery Programs. *J. Nat. Prod.* 74: 1539-1555.
- Kuddus, R., Oakes, J., Sharp, C., Scott, J., Slater., K., Kirsi, J., Kopp, O & Bur.W. 2014. Isolation of Medically Important Fungi from *Ginkgo biloba* Leaves and Crude Ginkgo Supplements. *Internet Journal of Microbiology.* 1 (7): 1-7
- Kumaran, R. S & and Hur, B.K. 2009. Screening of Species of the Endophytic Fungus *Phomopsis* for the Production of the Anticancer Drug Taxol. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 54: 21-30
- Kusari, K., Zuhlke, S & Spiteller, M. 2009. An Endophytic Fungus from *Camptotheca acuminata* that Produces *Camptothecin* and Analogues. *J. Nat. Prod.* 72: 2-7.
- Kusari, S., Hertweck, C & Spiteller, M. 2012. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chemistry and Biology.* 19: 792-796.
- Latge, J.P. 2001. The Pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends In Microbiology.* 9 (8) : 382-389
- Lusiana, H. 2009. Isolasi dan Uji Anti Plasmodium secara Invitro Senyawa Alkaloid dari *Albertisia papuana* Becc. *Tesis.* Institut Pertanian Bogor.
- Marie, L., Jean, B. Adrien, C., Kai, C.C., Jean, R.D., Thierry, S & Helena, G. 1987. Alcaloi'des *Bisbenzylisoquinolei* ques de *Albertisia* cf. *A. papuana*. *J. Chem.* 65: 343-347.
- Masriani, Mustofa, Jumina, Sunarti & Enawaty,E. 2014. Cytotoxic and Pro-Apoptotic Activities of Crude Alkaloid from Root of Sengkubak (*Pycnarrhena cauliflora* (Miers) Diels) in human breast cancer T47D *Cell Line.* *J. Biosci.* 2(5): 336-340.
- Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Method.* 65 (1-2): 55-63.
- Newman. D. J & Cragg, G. M. 2012. Natural Products as Sources of New Drugs Over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75: 311-335
- Petrini, O., Sieber, N, T., Toti, L & Viret, O. 1992. Ecology, Metabolite, Production and Substrate Utilization in Endophytic Fungi. *Natural Toxins.*8:185-196
- Prabavathy D & Valli, N.C. 2013. Cytotoxic Potential and Phytochemical Analysis of *Justicia beddomei* and Its Endophytic *Aspergillus sp. J. Pharm Clin. Res.* 6 (5): 159-161.
- Ruma, K., Sunil, K & Prakash, H. S. 2014. Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antimicrobial and Cytotoxic Properties of Fungal Endophytes from *Garcinia* Species. *Int J Pharm Pharm Sci.* 5 (3): 889-897
- Saikkonen, K., Wali, P., Helander, M & Faeth, S. H. 2004. Evolution of Endophyte-Plant Symbioses. *Science Direct.* 9 (6): 275-280
- Samson, R.A., Hong, S., Peterson, S.W., Frisvad, J. C & Varga, J. 2007. Polyphasic Taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and Its Teleomorph *Neosartorya* Studies in Mycology 59: 147-203.
- Schulz, B & Boyle, C. 2006. The Endophytic Continuum. Review. *Mycol.Res.* 109 (6): 661-686.

- Strobel, G.A & Long, D. L. 1998. Endophytic Microbes Embody Pharmaceutical Potential. *ASM News*. **64**(5): 263-268.
- Susiarti, S & Setyowati, F. M. 2005. Bahan Rempah Tradisional dari Masyarakat Dayak Kenyah di Kalimantan Timur. *Biodiversitas*. **6** (4): 289-291
- Widyasari. 2012. Efek Sitotoksik, Proliferasi dan Apoptosis Fraksi Aktif Akar Tumbuhan Mekai (*Albertisia papuana* Becc.) terhadap Sel Kanker Payudara (T47D). *Tesis*. Fakultas Biologi Pascasajana UGM. Yogyakarta.
- Xiong, Z., Yang, Y., Zhao, N & Wang, Y. 2013. Diversity of Endophytic Fungi and Screening of Fungal Paclitaxel Producer from Anglojap Yew, *Taxus x Media*. *BMC Microbiology*. **13**: 1-10.
- Yunianto, P., Rosmalawati, S., Rachmawati, I., Suwarso, W. P & Sumaryono, W. 2012. Isolation And Identification of Endophytic Fungi from Srikaya Plants (*Annona Squamosa*) Having Potential Secondary Metabolites as Anti-Breast Cancer Activity. *Microbiol Indones*. **6** (1): 23-29.