

**AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK DAN FRAKSI HASIL  
FERMENTASI FUNGI ENDOFIT GENUS *Cephalosporium* sp. DIISOLASI  
DARI DAUN MENIRAN (*Phyllanthus niruri* Linn.)**

***CYTOTOXIC ACTIVITY OF FERMENTATION EXTRACT AND FRACTION  
ENDOPHYTIC FUNGI GENUS *Cephalosporium* sp ISOLATED FROM  
MENIRAN LEAF (*Phyllanthus niruri* Linn.)***

**Rollando**

**Info Artikel**

**Sejarah Artikel:**

Diterima 4 April 2016  
Disetujui 12 Mei 2016  
Dipublikasikan 16 Juni  
2016

**Kata Kunci:**

Fungi endofit,  
*Cephalosporium* sp,  
sitotoksik, sel T47D,  
Sel Vero

**Keywords:**

*Endophytic* fungi,  
*Cephalosporium* sp,  
cytotoxic, T47D cell  
line, Vero Cell Line

**Abstrak**

**Latar Belakang:** Mikroba endofit merupakan mikroba yang hidup berkoloni dalam jaringan tumbuhan yang dapat memproduksi senyawa bioaktif yang sama bahkan identik dengan senyawa yang dihasilkan tumbuhan inangnya. **Tujuan:** Mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat, fraksi n-heksana, fraksi dietil eter, dan fraksi etanol hasil fermentasi fungi endofit genus *Cephalosporium* sp yang diisolasi dari tumbuhan meniran dilakukan terhadap sel kanker jenis T47D dan sel normal jenis Vero secara in vitro. **Metode:** Fungi endofit diisolasi dari daun meniran dan dilakukan analisis morfologi, fungi genus *Cephalosporium* sp dikembangkan dengan media *potatoes dextrose broth*. Pemisahan ekstrak dan miselium dilakukan dengan cara disaring. Ekstraksi menggunakan metode ekstraksi cair-cair dan pemisahan fraksi menggunakan metode kromatografi kolom menggunakan pelarut dengan kepolaran bertingkat. **Hasil:** Fraksi etanol mempunyai aktivitas sitotoksik tertinggi dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $15,47 \pm 0,71$   $\mu\text{g/mL}$  dan memiliki nilai *selectivity index* antara sel kanker jenis T47D dan sel normal Vero memenuhi syarat  $>3$  dengan nilai sebesar 23,31. **Simpulan dan saran:** Fraksi etanol mempunyai aktivitas sitotoksik yang poten dan memiliki nilai *selectivity index* antara sel kanker payudara jenis T47D dan sel normal Vero memenuhi syarat  $>3$ . Isolasi dan identifikasi senyawa aktif di dalam fraksi etanol diperlukan untuk mengetahui senyawa yang mempunyai aktivitas sitotoksik secara spesifik.

**Abstract**

**Background:** Microbes endophytic can form a living microbes colonize the plant tissues can produce the same bioactive compounds even identical compound produced by host plants. **Objective:** Determine in vitro cytotoxic activity of the ethyl acetate extract, fraction of n-hexane, diethyl ether, and ethanol genus *Cephalosporium* sp endophytic fungi isolated from meniran against cancer cell lines T47D and normal cells type Vero. **Methods:** Endophyte fungi was isolated from meniran leaves and has been morphology analyzed, fungi from genus *Cephalosporium* was growth using *potatoes dextrose broth* medium. Extract and micelium separation was conducted by using column chromatography method and graded polarity solvent. **Result:** Ethanol fraction was highest cytotoxic activity with  $IC_{50}$  values of  $15,47 \pm 0,71$   $\mu\text{g/mL}$  and *selectivity index* value between T47D cell line and Vero cell line qualify  $>3$  with a value of 23,31. **Conclusion and suggestion:** Ethanol fraction was highest cytotoxic activity and *selectivity index* value between T47D cell line and Vero cell line qualify  $>3$  with a value of 23,31. Isolation and identification of active compounds in the ethanol fraction required to determine the compounds that have specifically cytotoxic activity.

## PENDAHULUAN

Mikroba merupakan sumber senyawa bioaktif yang telah banyak diteliti memiliki aktivitas farmakologi diantaranya sebagai antibakteri, antivirus dan antikanker. Salah satu kelompok mikroba penghasil senyawa bioaktif adalah mikroba endofit. Selain senyawa bioaktif baru, mikroba endofit dapat memproduksi senyawa bioaktif yang sama bahkan identik dengan senyawa yang dihasilkan tumbuhan inangnya<sup>1</sup>.

Pengembangan endofit sebagai sumber obat merupakan salah satu alternatif pengendalian non kimiawi yang terus dikembangkan dalam beberapa dekade terakhir. Mikroba endofit hidup bersimbiosis dengan tanaman di dalam jaringan tanaman, mikroba tersebut mampu menghasilkan suatu agen biologis yang dapat memerangi penyakit<sup>2</sup>.

Fungi endofit dapat menghasilkan senyawa kimia seperti alkaloid, flavonoid, fenolik dan terpenoid<sup>3</sup>. Mikroba endofit dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang karakternya mirip atau sama dengan inangnya dikarenakan adanya adaptasi lingkungan hidup endofit pada inang, pengaruh lingkungan hidup dan interaksi genetik antar keduanya<sup>4</sup>. Sebagai contoh adalah fungi endofit *Diaporthe phaseolorum* yang menghasilkan senyawa antibakteri, yaitu asam 3-hidroksipropanoat yang dapat juga dihasilkan pada daun tumbuhan inangnya yaitu *Lagunacularia racemosa*<sup>5</sup>. Senyawa piperin yang aktif terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dan *Mycobacterium smegmetis* dihasilkan oleh fungi endofit *Periconia* sp. dan tumbuhan *Piper longum* Lour. sebagai tumbuhan inang<sup>6</sup>.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang pengaruh ekstrak etil asetat, fraksi heksan, dietil eter, dan etanol hasil fermentasi fungi

endofit genus *Cephalosporium* sp. dari daun meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) dengan melihat efek antikanker secara in vitro.

## METODE PENELITIAN

Fungi endofit yang dijadikan mikroorganisme target telah berhasil diisolasi dari daun meniran. Fungi endofit tersebut kemudian diidentifikasi di Laboratorium Mikologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada. Hasil analisis makroskopik dan mikroskopik menunjukkan bahwa fungi endofit tersebut merupakan genus *Cephalosporium* sp.

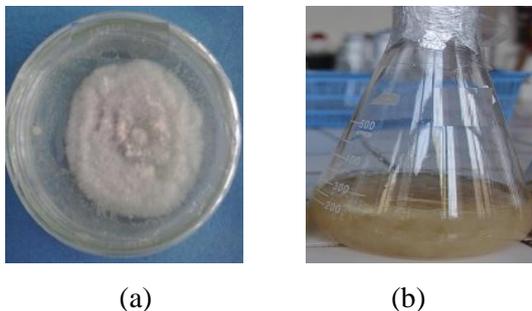
Fungi endofit ditumbuhkan pada media *potato dextrose agar* (PDA) hingga umur 9 hari. Selanjutnya, fungi ditumbuhkan pada media cair *potato dextrose broth* (PDB) dengan waktu fermentasi selama 10 hari. Miselium fungi dan media cair PDB hasil fermentasi dipisahkan dengan cara disaring. Filtrat media kemudian dipartisi menggunakan corong pisah dengan pelarut etil asetat. Filtrat etil asetat diupakan pelarutnya dengan penguap putar vakum hingga didapatkan ekstrak kasar. Ekstrak kasar pisahkan lagi menggunakan metode kromatografi kolom menggunakan pelarut bertingkat yaitu, n-heksana, dietil eter, dan etanol. Filtrat n-heksana, dietil eter, dan etanol diupakan pelarutnya hingga diperoleh fraksi n-heksana, dietil eter, dan etanol. Ekstrak kasar etil asetat, fraksi n-heksana, fraksi dietil eter, dan fraksi etanol digunakan untuk uji sitotoksik.

Uji antikanker dilakukan terhadap sel kanker payudara jenis T47D dan sel normal jenis Vero. Uji sitotoksitas menggunakan metode MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Sel kanker payudara T47D ditumbuhkan dengan media kultur RPMI, sel normal Vero dalam media kultur M199, masing-masing berisi FBS 10%,

penisilin-streptomisin 1%, dan fungizon 0,5%. Konsentrasi larutan uji yang digunakan adalah 7,81 ; 15,62 ; 31,25 ; 62,5 ; 125 ; 250 ; 500 µg/ml. Viabilitas sel ditentukan dengan absorbansi pada  $\lambda$  595 nm menggunakan ELISA reader. Data absorbansi perlakuan dikonversi ke dalam persen viabilitas dan digunakan untuk menghitung  $IC_{50}$ . *Selectivity Index* (SI) merupakan hasil bagi antara  $IC_{50}$  sel Vero dan  $IC_{50}$  sel kanker payudara T47D.

### HASIL PENELITIAN

Fungi endofit genus *Cephalosporium* sp. yang diisolasi dari daun meniran (memiliki karakteristik yaitu koloni fungi berwarna putih (Gambar 1).



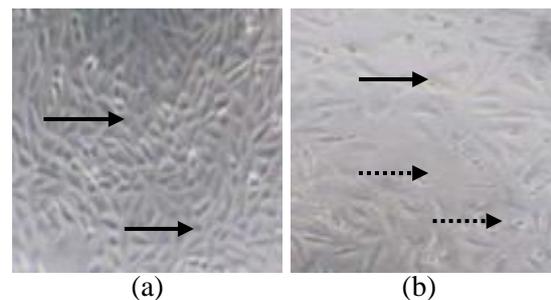
Gambar 1. Fungi *Cephalosporium* sp. umur 7 hari pada media PDA (a), Kultur fungi *Cephalosporium* sp. hari ke-10 pada media PDB (b)

Data tabel 1 menunjukkan parameter nilai  $IC_{50}$ , bahwa fraksi etanol mempunyai aktivitas sitotoksik yang lebih poten dari pada ekstrak etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi dietil eter terhadap sel T47D. Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh pada perlakuan fraksi n-heksan, dietil eter dan etanol menunjukkan bahwa semua fraksi poten sebagai agen sitotoksik karena didapatkan nilai  $IC_{50}$  yang lebih kecil dari 100 µg/mL.<sup>8</sup> Pada perlakuan terhadap sel normal (Vero), ekstrak etil asetat mempunyai nilai  $IC_{50}$  yang paling besar. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat mempunyai efek toksik yang kecil terhadap sel normal.

**Tabel 1. Hasil uji sitotoksik ekstrak dan fraksi**

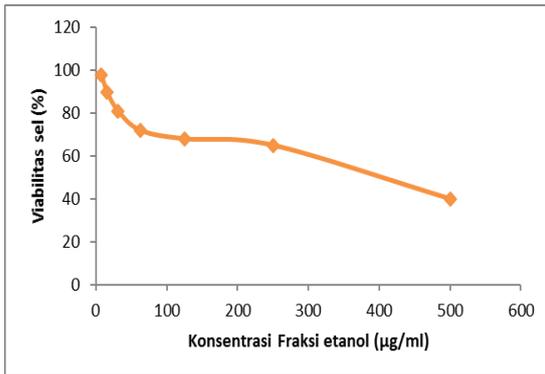
Perlakuan	$IC_{50}$ T47D (µg/ml)	$IC_{50}$ Vero (µg/ml)	<i>Selectivity index</i> (SI)
Ekstrak etil asetat	139,43 ± 1,23	398,98 ± 0,98	2,86
Fraksi n-heksan	67,91 ± 0,12	156,23 ± 0,34	2,30
Fraksi dietil eter	34,68 ± 1,65	232,76 ± 0,19	6,71
Fraksi etanol	15,47 ± 0,71	360,54 ± 0,65	23,31

Profil morfologi sel akibat perlakuan fraksi etanol diamati. Perlakuan fraksi etanol menyebabkan perubahan morfologi pada sel T47D yaitu inti sel mengerut, terlihat sel yang mengalami kematian, dan jumlah sel berkurang (Gambar 2a), sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal (Gambar 2b).



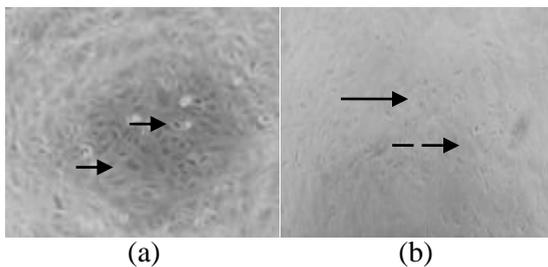
Gambar 2. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop *inverted* dengan pembesaran 100x. (a) kontrol sel (tanpa perlakuan); (b) perlakuan fraksi etanol 15 µg/mL. Morfologi sel T47D yang hidup ditunjukkan dengan gambar panah (→) dan sel yang mengalami perubahan morfologi ditunjukkan dengan tanda panah putus (- -▶).

Efek perlakuan fraksi etanol terhadap viabilitas sel T47D ditunjukkan pada Gambar 3.



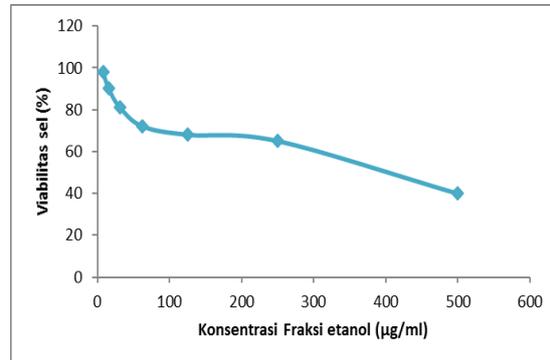
Gambar 3. Efek perlakuan fraksi etanol terhadap sel T47D. Nilai  $IC_{50}$  didapatkan dari perhitungan regresi linier konsentrasi dibandingkan dengan % viabilitas sel dengan taraf kepercayaan 95% ( $p < 0,05$ ).

Perlakuan fraksi etanol juga menyebabkan sel Vero mengalami perubahan morfologi, yaitu sel mengecil dan membulat, namun diperlukan konsentrasi yang lebih tinggi untuk menghasilkan efek yang sama terhadap sel T47D, sedangkan sel tanpa perlakuan menunjukkan morfologi yang normal (Gambar 4).



Gambar 4. Efek perlakuan fraksi etanol terhadap sel Vero. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop *inverted* dengan pembesaran 100x. (a) kontrol sel; (b) 500 µg/mL. Perubahan morfologi sel Vero ditunjukkan dengan gambar panah (••►)

Efek perlakuan fraksi etanol terhadap viabilitas sel Vero ditunjukkan oleh Gambar 5.



Gambar 5. Efek perlakuan fraksi etanol terhadap sel Vero. Nilai  $IC_{50}$  didapatkan dari perhitungan regresi linier konsentrasi dibandingkan dengan % viabilitas sel dengan taraf kepercayaan 95% ( $p < 0,05$ )

## PEMBAHASAN

Fungi endofit genus *Cephalosporium* sp. yang diisolasi dari daun meniran (memiliki karakteristik yaitu koloni fungi berwarna putih (Gambar 1). Genus *Cephalosporium* sp. memiliki ciri-ciri, yaitu: miselium yang memadat, tersusun atas pigmen hifa yang berwarna gelap, dan memproduksi sklerotia dengan bentuk tidak seragam. Ciri-ciri tersebut sesuai dengan yang dipaparkan oleh Sharma yang menunjukkan fungi genus *Cephalosporium* sp<sup>7</sup>.

Fraksi etanol mempunyai aktivitas sitotoksik yang lebih poten dari pada ekstrak etil asetat, fraksi n-heksan dan fraksi dietil eter terhadap sel T47D. Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh pada perlakuan fraksi n-heksan, dietil eter dan etanol menunjukkan bahwa semua fraksi poten sebagai agen sitotoksik karena didapatkan nilai  $IC_{50}$  yang lebih kecil dari 100 µg/mL<sup>8</sup>.

Prinsip metode MTT assay adalah MTT direduksi menjadi garam formazan oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat di dalam mitokondria sel hidup. Kemudian ditambahkan reagen stopper yang akan melisis membran sel dan melarutkan garam formazan. Garam formazan yang terbentuk diukur dalam bentuk absorbansi. Semakin tinggi absorbansi, semakin banyak sel yang hidup (viabilitas sel tinggi).

Beberapa kriteria dalam memilih senyawa antikanker adalah dengan memperhatikan potensi sitotoksik, selektivitasnya terhadap sel normal, dan ketersediaan bahan baku. Potensi antikanker dapat dilihat dari nilai  $IC_{50}$ . Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  maka potensi sitotoksiknya semakin besar. Parameter nilai *Selectivity index* suatu senyawa ditetapkan untuk mengetahui tingkat keamanan suatu senyawa antikanker terhadap sel normal. Nilai *Selectivity index* diperoleh dengan membagi nilai  $IC_{50}$  pada sel jenis Vero dengan sel jenis T47D. Nilai *selectivity index* yang disyaratkan adalah  $>3$ , yang menandakan bahwa ekstrak atau fraksi mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker tanpa mempengaruhi sel normal, dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen kemopreventif<sup>9</sup>.

Fraksi etanol dan dietil eter lebih selektif membunuh sel kanker payudara jenis T47D dibandingkan fraksi n-heksan dan ekstrak etil asetat. Hal tersebut terlihat dari nilai *Selectivity index* fraksi dietil eter dan fraksi etanol dengan nilai 6,71 dan 23,31. Efek sitotoksik fraksi etanol terhadap sel Vero berdasarkan nilai  $IC_{50}$  dan profil morfologi sel menunjukkan efek yang lebih rendah jika dibandingkan dengan efeknya terhadap sel T47D. Sel menunjukkan adanya perubahan morfologi yang dimungkinkan karena protein yang berperan dalam perlekatan sel tidak mengalami polimerisasi sehingga ikatan sel

terlepas dan membran lipid akan membulat dan sitoskeleton terpotong. Penurunan viabilitas sel dan kepadatan sel terlihat pada semakin tinggi dosis yang digunakan, serta dengan perubahan morfologi yang mengalami pengerutan merupakan penanda sel yang menuju kematian.

Faktor jumlah dan potensi senyawa bioaktif yang kompleks dalam ekstrak dan fraksi bisa menjadi penyebab efek sitotoksiknya rendah. Salah satu strategi untuk mengatasi hal ini adalah dengan melakukan fraksinasi dari ekstrak dan isolasi senyawa dari fraksi. Senyawa yang terkandung dalam fraksi lebih sedikit dibandingkan yang terkandung dalam ekstrak sehingga fraksi diharapkan memiliki efek sitotoksik dan selektivitas yang lebih baik dibandingkan ekstraknya.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa fraksi etanol mempunyai aktivitas sitotoksik yang poten dengan nilai  $IC_{50}$   $15,47 \pm 0,71$   $\mu\text{g/mL}$  dan memiliki nilai *selectivity index* antara sel kanker payudara jenis T47D dan sel normal Vero memenuhi syarat  $>3$  dengan nilai 23,31.

## SARAN

Diperlukan isolasi dan identifikasi senyawa aktif di dalam fraksi etanol untuk mengetahui senyawa yang mempunyai aktivitas sitotoksik secara spesifik.

## REFERENSI

1. Selim, K. A., El-Beih, A. A., Abdel-Rahman, T. M., dan El-Diwany, A. I., 2012. Biology of endophytic fungi. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.* 2(1).
2. Wulandari, H., Zakiatulyaqin, dan Supriyanto. 2012. Isolasi dan Pengujian Bakteri Endofit dari Tanaman Lada (*Piper*

- nigrum* L.) sebagai Antagonis Terhadap Patogen Hawar Beludru (*Septobasidium* sp.). *J. Perkebunan & Lahan Tropika* 2.
3. Pirttilä, A.M. dan Frank, A.C. 2011. *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications*. Springer.
  4. Cheplick, G.P. dan Faeth, S.H. 2009. *Ecology and Evolution of the Grass-Endophyte Symbiosis*. Oxford University Press.
  5. Sebastianes, F.L.S., Cabedo, N., El Aouad, N., Valente, A.M.M.P., Lacava, P.T., Azevedo, J.L., dkk. 2012. 3-hydroxypropionic acid as an antibacterial agent from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum*. *Current microbiology* 65.
  6. Verma, V.C., Lobkovsky, E., Gange, A.C., Singh, S.K., dan Prakash, S., 2011. Piperine production by endophytic fungus *Periconia* sp. isolated from *Piper longum* L. *The Journal of antibiotics* 64.
  7. Sharma, O.P., 1898. *Textbook of Fungi*. Tata McGraw-Hill Education.
  8. Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M.B., Sasse, F., Jansen, R., and Murali, T.S., 2009. Fungal Endophytes and Bioprospecting. *Fungal Biology Reviews* 23.
  9. Prayong, P., Barusrux, S., and Weerapreeyakul, N., 2008. Cytotoxic Activity Screening of Some Indigenous Thai Plants. *Fitoterapia* 79.