

AKTIVITAS ANTIKANKER PROTEIN KAPANG *Xylaria psidii* KT30

(Anticancer Activity of Protein Fungus Xylaria psidii KT30)

Aris Munandar¹⁾, A. Zaenal Mustopa³⁾, Kustiariyah Tarman²⁾, Tati Nurhayati²⁾

¹⁾Jurusan Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Sultan Ageng Tirtayasa,
Jl. Raya Jakarta Km. 4 Pakupatan, Serang Banten

²⁾Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor

³⁾Laboratorium Protein Rekombinan, Vaksin, dan Sistem Pengantaran Terarah,
Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bioteknologi
Email: kustya@gmail.com

ABSTRACT

Previous research shows that protein of an algicolous fungus Xylaria psidii KT30 inhibited HeLa cell with an average 264.7 µg/mL. To enhance the potent anticancer activity of extracellular protein from Xylaria psidii KT30, the present research demonstrated purification of its secreted protein. Anticancer against Chang cell line (liver cell) and HeLa cell line (cervical cancer) was done by MTT cytotoxic method. Protein concentration assay was done by bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit. Anticancer assay showed protein of fungus KT30 was not toxic against Chang cell line and HeLa cell line. Based on calculation, IC₅₀ value protein of fraction ammonium sulfat 90% and fractions 11-12 were 670.86 and 1451.68 µg/mL. The protein concentration of fraction ammonium sulfat 90% and fractions 11-12 were 9.013 and 0.604 mg/mL.

Keywords : anticancer, marine fungi, Xylaria psidii

PENDAHULUAN

Penderita kanker di dunia pada tahun 2008 mencapai 12,662 juta dan 7,564 juta diantaranya meninggal dunia. Jenis kanker yang menyebabkan tingginya angka kematian pada perempuan adalah kanker leher rahim (*serviks*). Kanker *serviks* di dunia mencapai 530 ribu kasus (4,2%) dan di wilayah Asia Tenggara angka kematiannya mencapai 8,3% (Ferlay *et al.* 2010). Menurut WHO (2008), 136 laki-laki dan 109 perempuan pada tiap 100 ribu populasi penduduk di Indonesia meninggal dunia akibat kanker. Prevalensi penyakit kanker di Indonesia mencapai 0,4% berdasarkan diagnosis oleh tenaga kesehatan. Pada tahun 2004, kasus kanker *serviks* di Indonesia mencapai 3.818 (13%), dan 193 diantaranya meninggal dunia (BPPK 2008).

Pencegahan penyakit kanker dapat dilakukan menggunakan bahan alam. Makro dan mikroorganisme menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologis. Menurut Soemiati (2009), sumber bahan alam dapat diperoleh dari biota laut misalnya kapang laut endofit. Kapang laut endofit memiliki aktivitas antikanker sehingga dapat dijadikan sumber untuk bahan obat. Hasil penelitian

beberapa tahun terakhir juga menunjukkan adanya aktivitas antikanker dari kapang laut. Salah satu kapang laut endofit yang berpotensi adalah *Xylaria psidii* KT30.

Kapang endofit *Xylaria psidii* KT30 diisolasi dari rumput laut *Kappaphycus alvarezii* yang biasa dimanfaatkan sebagai penghasil karaginan. Kapang KT30 menghasilkan metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas antikanker (Tarman *et al.* 2011). Menurut Tarman *et al.* (2012), protein ekstraseluler yang diekstrak dari media kultur kapang KT30 juga memiliki aktivitas tersebut. Protein tersebut mempunyai aktivitas antikanker terhadap sel HeLa (kanker *serviks*) dengan IC₅₀ 264,7 µg/mL. Aktivitas antikanker protein yang dihasilkan kapang KT30 masih belum optimal sehingga perlu dilakukan upaya untuk meningkatkan aktivitas protein tersebut.

Peningkatan aktivitas antikanker protein kapang KT30 dilakukan melalui proses purifikasi berdasarkan sifat dan fungsi yang berhubungan dengan sisi aktifnya. Menurut Munandar *et al.* (2014), proses purifikasi protein kapang KT30 dilakukan melalui kromatografi filtrasi gel. Penelitian tersebut menunjukkan adanya peningkatan aktivitas dalam menghambat bakteri *Escherchia coli* dan *Bacillus subtilis*. Oleh karena itu, pada penelitian ini protein yang digunakan merupakan pelet dan fraksi terbaik hasil dari purifikasi tersebut. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas antikanker dan menentukan kadar protein kapang *Xylaria psidii* KT30.

METODOLOGI

Penelitian ini dilaksanakan pada Bulan Mei - September 2013 di Laboratorium Protein Rekombinan, Vaksin, dan Sistem Pengantaran Terarah, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bioteknologi, Cibinong, Kabupaten Bogor dan Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi, Pusat Studi Satwa Primata (PSSP), Institut Pertanian Bogor. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah pelet (fraksi amonium sulfat 90%) dan fraksi 11-12 dari hasil purifikasi protein kapang *Xylaria psidii* KT30.

MTT sitotoksik (CCRC 2009)

Sel normal dan kanker yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel Chang (sel hati) dan HeLa (kanker *serviks*). Sel Chang dan HeLa dikultur pada inkubator (37°C, CO₂ 5%) dengan media *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) yang mengandung 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS), penicillin (100 unit/mL), dan streptomycin sulfat (10 µg/mL) selama 24 jam. Komposisi DMEM adalah garam anorganik, asam amino, vitamin, D-glukosa, asam piruvat, *phenol red*, L-glutamin. Sel Chang dan HeLa yang telah *confluent*, kemudian dicuci dan dipanen.

Sel Chang dan HeLa dikultur dalam *96-well plate* dengan kepadatan 10⁴ sel/100 µL pada setiap sumur, lalu diinkubasi selama 24 jam (37°C, CO₂ 5%). Setiap sumur dicuci dengan 100 µL PBS. Sel tersebut kemudian diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi dari sampel (triplo) dan kontrol sel yang berisi media

kultur dan sel. Setelah 24 jam, sel dicuci dengan 100 µL PBS, dan ditambahkan dengan 0,01 mL MTT per sumur. *Plate* diinkubasi pada suhu 37°C dalam kondisi CO₂ 5% selama 4 jam, lalu ditambahkan 10% SDS dalam 0,01% HCl sebagai *stopper*. Setelah diinkubasi, absorbansi diukur pada 595 nm menggunakan *ELISA reader* dan dibandingkan dengan kontrol. Jumlah sel yang hidup dihitung untuk mengetahui konsentrasi IC₅₀ dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{(\text{Abs kontrol sel} - \text{Abs sampel})}{\text{Abs kontrol sel}} \times 100\%$$

Kadar protein kapang KT30 (PIERCE 2003)

Kadar protein kapang KT30 dilakukan dengan menggunakan *bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit*. Larutan standar *bovine serum albumin (BSA)* dengan konsentrasi 20-2000 µg/mL dibuat sebagai tahap persiapan. Pembuatan larutan standar BSA dengan konsentrasi 20-2000 µg/mL dapat dilihat pada Tabel 1. *Working reagent* dibuat dengan mencampurkan reagent A dan B (50:1). Protein kapang KT30 sebanyak 0,1 mL ditambahkan 2 mL *working reagent* yang dibuat sebelumnya, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Absorbansi sampel protein kapang KT30 diukur pada panjang gelombang 562 nm.

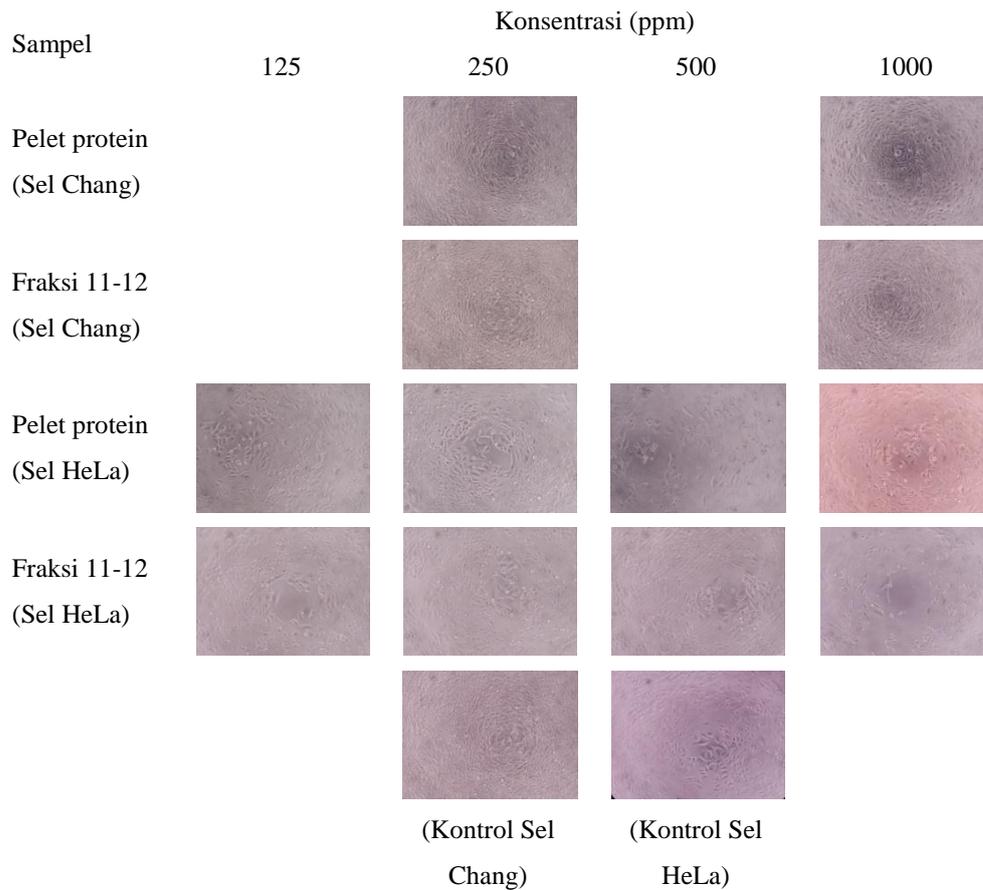
Tabel 1 Pembuatan larutan standar BSA dengan konsentrasi 20-2000 µg/mL

Tabung	Volume Dilusi (µL)	Volume dan Sumber BSA (µL)	Konsentrasi BSA (µg/mL)
A	0	300 dari stok	2.000
B	125	375 dari stok	1.500
C	325	325 dari stok	1.000
D	175	175 dari dilusi tabung B	750
E	325	325 dari dilusi tabung C	500
F	325	325 dari dilusi tabung E	250
G	325	325 dari dilusi tabung F	125
H	400	100 dari dilusi tabung G	25
I	400	0	0

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas antikanker protein kapang KT30

Hasil uji antikanker terhadap sel Chang menunjukkan bahwa protein KT30 bersifat tidak toksik. Inhibisi fraksi amonium sulfat 90% dengan konsentrasi 500 dan 1.000 ppm mencapai 3,30% dan 19,78%, sedangkan pada fraksi 11-12 tidak ada inhibisi terhadap sel Chang. Hasil tersebut berarti protein KT30 aman digunakan sebagai bahan obat. Sel Chang pada uji antikanker dapat dilihat pada Gambar 1. Haglund (2011) menyatakan bahwa toksisitas agen antikanker biasanya mempengaruhi sel misalnya sel pembentuk darah, sel epithelium, hati, dan ginjal. Dalam pengembangan obat, antikanker baru harus memiliki efek klinis yang baik dan toksisitasnya rendah terhadap sel normal.



Gambar 1 Sel Chang dan HeLa pada uji antikanker

Berdasarkan hasil uji antikanker protein kapang KT30 terhadap sel HeLa, fraksi amonium sulfat 90% dan fraksi 11-12 bersifat tidak toksik. Menurut National Cancer Institute (NCI), suatu senyawa memiliki potensi sebagai antikanker apabila memiliki nilai $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$. Berdasarkan perhitungan, nilai IC_{50} fraksi amonium sulfat 90% dan fraksi 11-12 adalah 670,86 dan 1451,68 $\mu\text{g/mL}$. Sel HeLa pada uji antikanker dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil uji antikanker protein KT30 pada media NaCl 0% selama 15 hari tersebut masih rendah dibandingkan dengan penelitian terdahulu. Tarman *et al.* (2012) melaporkan bahwa pelet dan fraksi 1 protein kapang KT30 pada media NaCl 3% selama 7-9 hari memiliki aktivitas antikanker terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} 450,8 dan 264,7 $\mu\text{g/mL}$.

Berdasarkan hasil tersebut, maka protein yang dibutuhkan untuk membunuh 50% sel HeLa jumlahnya banyak, tetapi tidak bermasalah karena protein kapang KT30 tidak bersifat toksik terhadap sel normal. Penggunaan protein sebagai bahan obat memiliki keunggulan yaitu dapat diterima dengan baik oleh tubuh dan efek sampingnya sedikit (Arifudin *et al.* 2001). Aktivitas protein antikanker dari kapang *Cordyceps militaris* (CMP) juga dilaporkan oleh Park *et al.* (2009). CMP memiliki nilai IC_{50} 9,3 μM untuk kanker payudara dan 8,1 μM untuk kanker kandung kemih. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kapang merupakan sumber protein baru yang dapat diaplikasikan dalam bidang biologi dan pengobatan.

Kadar protein kapang KT30

Kadar protein kapang KT30 dihitung pada setiap tahap pemurnian yang meliputi ekstrak kasar (supernatan), fraksi amonium sulfat 90%, dan fraksi fraksi 11-12 karena memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi dibandingkan fraksi lainnya. Tabel 2 menunjukkan kadar protein kapang *X. psidii* KT30. Berdasarkan perhitungan, kadar protein pada fraksi amonium sulfat 90% adalah 9,013 mg/mL. Penambahan amonium sulfat pada saturasi tinggi diduga menyebabkan interaksi air pada protein menurun dan protein akan saling berinteraksi, agregat, dan mengendap (*salting out*). Pada umumnya, protein yang mengendap pada saturasi amonium sulfat tinggi adalah protein dengan bobot molekul rendah (Widyarti 2006).

Tabel 1 Kadar protein kapang *X. psidii* KT30

Sampel	Volume (ml)	Kadar protein (mg/ml)	Total Protein (mg)
Ekstrak Kasar (Supernatan)	150	5,715	857,297
Fraksi Amonium Sulfat 90%	3	9,013	27,038
Fraksi 11-12 (Sephadex G-50)	1	0,604	0,604

Fraksi 11-12 memiliki kadar protein sebesar 0,604 mg/mL, nilai tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan protein dari kapang *Cordyceps militaris* (CMP). Park *et al.* (2009) melaporkan bahwa CMP memiliki kadar protein sebesar 0,2 mg/mL. CMP diperoleh dari hasil pemurnian dengan metode kromatografi penukar ion dan filtrasi gel. Haghbeen *et al.* (2004) juga melaporkan mengenai kadar protein dari jamur komersial. Fraksi protein dari hasil kromatografi filtrasi gel memiliki kadar protein sebesar 0,394 mg/mL dengan total protein sebesar 10,4 mg.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Protein kapang KT30 tidak toksik terhadap sel Chang dan memiliki aktivitas terhadap sel HeLa dengan nilai IC_{50} 670,86 μ g/mL pada fraksi amonium sulfat 90% dan 1451,8 μ g/mL pada fraksi 11-12. Fraksi amonium sulfat 90% dan fraksi 11-12 memiliki kadar protein sebesar 9,189 mg/mL dan 0,604 mg/mL.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian, perlu dilakukan purifikasi dengan metode yang berbeda dan lebih lanjut untuk mendapatkan protein yang murni dengan aktivitas yang tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifudin, Patong R dan Ahmad A. 2001. Penelusuran protein bioaktif dalam makroalga sebagai bahan antibakteri dan antijamur. *Mar. Chim Acta.* 2(2): 11-18.

- [BPPK] Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2008. *Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2007*. Jakarta (ID): Depatemen Kesehatan.
- [CCRC] Cancer Chemoprevention Research Center. 2009. *Uji Sitotoksik Metode MTT*. Yogyakarta (ID): Universitas Gajah Mada.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C dan Parkin DM. 2010. *GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10*. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer [Internet]. [diunduh Jun 11 2012]. Tersedia pada: <http://www.globocan.iarc.fr>.
- Haghbeen K, Jazi FR, Karkhane AA dan Borojerdi SS. 2004. Purification of tyrosinase from edible mushroom. *Iran J Biotechnol*. 3(2): 189-194.
- Haglund C. 2011. *Integrating efficacy and toxicity in preclinical anticancer drug development [disertasi]*. Uppsala (SE): Uppsala University.
- Munandar A, Mustopa AZ, Tarman K, dan Nurhayati T. 2014. Aktivitas Antibakteri Protein Kapang *Xylaria psidii* KT30 terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. *JTIP*. 25 (2): 146-151.
- Park BT, Na KH, Jung EC, Park JW dan Kim HH. 2009. Antifungal and anticancer of a protein from the mushroom *Cordyceps militaris*. *Korean J Physiol Pharmacol*. 13: 49-54.
- Pierce. 2003. *Instruction BCATM Protein Assay Kit*. Rockford (US): Pierce Biotechnology Inc.
- Soemiati A. 2009. *Mikroba Endofit : Solusi Bahan Baku Obat yang Murah dan Ramah Lingkungan*. Jakarta(ID): Universitas Indonesia.
- Tarman K, Lindequist U, Wende K, Porzel A, Arnold N dan Wessjohan LA. 2011. Isolation of a new natural product and cytotoxic and antimicrobial activities of extracts from fungi of Indonesian marine habits. *Mar. Drugs*. 9: 294-306. doi: 10.3390/md9030294.