

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iii
PRAKATA .....	iv
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
DAFTAR SINGKATAN .....	xvii
INTISARI .....	xx
ABSTRCT .....	xxii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Permasalahan .....	4
1.3 Tujuan .....	5
1.4 Manfaat .....	5
1.5 Keaslian Penelitian .....	5
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2.1 Biologi Kapang .....	7
2.2 Isolasi Kapang .....	10
2.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Kapang	11
2.4 Kapang yang Berasal dari Lingkungan Laut ( <i>Marine         Derived Fungi</i> ) .....	14
2.5 Identifikasi Kapang .....	16
2.6 Senyawa Bahan Alam dari Kapang Laut .....	18
2.7 Asosiasi Mikroba dengan Invertebrata Laut .....	24
2.8 Kanker .....	28

2.9 Siklus Sel .....	32
2.10 Siklus Sel dan Kanker .....	38
2.11 Apoptosis .....	40
2.12 Uji Sitotoksik, Analisis Siklus Sel dan Deteksi Apoptosis .....	45
2.13 Sel Lestari .....	48
2.13.1 Sel T47D .....	48
2.13.2 Sel HeLa .....	49
2.13.3 Sel HepG2 .....	49
2.13.4 Sel Vero .....	50
2.14 Landasan Teori .....	50
<b>BAB III. CARA PENELITIAN</b> .....	53
3.1 Bahan Penelitian .....	53
3.2 Alat Penelitian .....	54
3.3 Cara Kerja .....	55
3.3.1 Sampling Hospes .....	55
3.3.2 Identifikasi Kapang dan Hospes .....	56
3.3.3 Isolasi Kapang .....	57
3.3.4 Kultivasi dalam Media Cair dan Skrining Aktivitas Sitotoksik .....	58
3.3.5 Kultivasi Kapang Terpilih (Strain Aktif) .....	60
3.3.6 Ekstraksi Metabolit .....	61
3.3.7 Fraksinasi dan Isolasi .....	64
3.3.8 Pengukuran Data Spektroskopik .....	68
3.3.9 Pembuatan Media Kultur Sel Lestari .....	69
3.3.10 Perbanyakkan Sel Lestari .....	70
3.3.11 Panen Sel dan Perhitungan Sel .....	70
3.3.12 Pembuatan Larutan Uji .....	71
3.3.13 Uji Sitotoksik .....	72
3.3.14 Analisis Siklus Sel .....	73
3.3.15 Uji Apoptosis .....	74

<b>BAB IV. HASIL DAN BAHASAN</b>	77
4.1 Skrining Kapang Penghasil Senyawa Sitotoksik	77
4.2 Identifikasi Kapang MFW39	81
4.3 Profil Metabolit Kapang MFW39	84
4.4 Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Miselium dan <i>Broth</i> Kapang MFW39	86
4.5 Fraksinasi Ekstrak Miselium	87
4.6 Isolasi Senyawa Sitotoksik	92
4.7 Identifikasi Senyawa Aktif	98
4.8 Aktivitas Sitotoksik Emestrin	106
4.9 Efek Emestrin Terhadap Siklus Sel T47D	109
4.10. Induksi Apoptosis Emestrin	110
4.11. Pembahasan	112
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	127
5.1 Kesimpulan	127
5.2 Saran	128
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	129
<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN</b>	140

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Beberapa contoh senyawa sitotoksik yang dihasilkan oleh kapang laut .....	21
Tabel 2. Isolat kapang dan bobot ekstrak kasar yang diperoleh dari 100 ml kultur cair .....	78
Tabel 3. Ringkasan spektrum <sup>1</sup> H-NMR dan <sup>13</sup> C-NMR senyawa aktif dibandingkan dengan emestrin menurut Herath <i>et al.</i> , (2005) ....	101
Tabel 4. Nilai IC <sub>50</sub> emestrin terhadap beberapa jenis sel lestari dan indeks selektivitasnya (IS) .....	109
Tabel 5. Substrat atau hospes kapang <i>Emericella</i> dari berbagai lokasi ..	114
Tabel 6. Senyawa ETP dari berbagai kapang .....	119
Tabel 7. Metabolit sekunder dari kapang yang berhubungan dengan proses sporulasi dan perkembangan kapang .....	124

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Diagram skematis gen rRNA fungi menurut Sugita & Nishikawa (2003) .....	18
Gambar 2. Senyawa sitotoksik dari kapang laut .....	22
Gambar 3. Kemiripan struktur antara metabolit yang dihasilkan oleh invertebrata laut dan mikroba (Proksch <i>et al.</i> , 2003) ....	26
Gambar 4. Contoh metabolit aktif yang dihasilkan oleh invertebrata laut dan mikroba (Proksch <i>et al.</i> , 2003) .....	27
Gambar 5. Gambar skematik siklus sel eukaryotik (Lodish <i>et al.</i> , 2003) .....	33
Gambar 6. Kompleks <i>cyclin-Cdks</i> yang mengatur siklus sel (Garret, 2001) .....	34
Gambar 7. Aktivitas <i>cyclin-Cdks</i> selama siklus sel (modifikasi dari McGowan, 2003) .....	36
Gambar 8. Dua jalur utama apoptosis .....	45
Gambar 9. Reaksi pemecahan MTT menjadi formazan .....	46
Gambar 10. Kerangka umum pendekatan penelitian .....	52
Gambar 11. Lokasi pengambilan sampel hospes .....	55
Gambar 12. Proses isolasi kapang .....	59
Gambar 13. Diagram alir skrining aktivitas sitotoksik dan kultivasi kapang .....	62
Gambar 14. Diagram alir ekstraksi metabolit kapang .....	64
Gambar 15. Diagram alir fraksinasi dan isolasi senyawa aktif .....	67
Gambar 16. Diagram alir pelaksanaan penelitian .....	76
Gambar 17. Contoh jenis kapang yang diisolasi selama penelitian ...	78
Gambar 18. Penghambatan pertumbuhan sel T47D (%) setelah diberi perlakuan ekstrak kapang selama 24 jam .....	80

Gambar 19.	Morfologi sel T47D akibat perlakuan ekstrak kasar MFW39 (A) selama 24 jam pada dosis 30 µg/ml (A) dan morfologi sel T47D tanpa perlakuan (B) .....	80
Gambar 20.	<i>Ascidia Aplidium longithorax</i> .....	81
Gambar 21.	Permukaan koloni kapang MFW39 dalam media MEA (A), sebalik koloni (B) dan gambaran mikroskopisnya (C) .....	82
Gambar 22.	Hasil elektroforesis DNA kapang MFW39 .....	83
Gambar 23.	Pohon filogenetik kapang MFW39 .....	83
Gambar 24.	Kultivasi kapang MFW39 dalam media SWS .....	84
Gambar 25.	Profil KLT ekstrak miselium (M) dan <i>broth</i> (B) .....	84
Gambar 26.	Kromatogram KCKT ekstrak miselium (A) dan <i>broth</i> (B) .....	85
Gambar 27.	Efek ekstrak miselium dan <i>broth</i> MFW39 pada dosis 5 µg/ml terhadap morfologi sel T47D (tanda panah) .....	86
Gambar 28.	Penghambatan sel T47D setelah diberi ekstrak miselium dan <i>broth</i> selama 24 jam ( $\pm$ simpangan baku) .....	86
Gambar 29.	Profil KLT ekstrak miselium kapang MFW39 yang dihasilkan dari kultivasi 1L x 20 .....	87
Gambar 30.	Kromatogram KCKT ekstrak miselium kapang MFW39 yang dihasilkan dari kultivasi 1L x 20 .....	88
Gambar 31.	Profil KLT fraksi F1, F2, F3 dan F4 .....	89
Gambar 32.	Mortalitas sel T47D setelah diberi perlakuan fraksi F1, F2, F3 dan F4 pada dosis 30 µg/ml ( $\pm$ simpangan baku) .....	90
Gambar 33.	Kromatogram KLT hasil fraksinasi F3 sebelum penggabungan (A) dan setelah penggabungan (B) ....	91
Gambar 34.	Mortalitas sel T47D setelah diberi perlakuan fraksi F3.1, F3.2, F3.3, F3.4, F3.5, F3.6 dan F3.7 pada dosis 30 µg/ml .....	92
Gambar 35.	Kromatogram KLT preparatif fraksi F3.3 dan F3.4 ....	94
Gambar 36.	Kromatogram KCKT fraksi F3.3.1/isolat1 (A), F3.4.1/isolat1 (B) dan F3.4.2/isolat 2 (C) .....	95

Gambar 37.	Mortalitas sel T47D (%) setelah diberi perlakuan isolat 1 dan 2 pada dosis 30 µg/ml .....	96
Gambar 38.	Diagram alir proses isolasi senyawa sitotoksik dari ekstrak miselium kapang <i>Emericella nidulans</i> .....	97
Gambar 39.	Spektrum UV senyawa aktif dalam MeOH .....	98
Gambar 40.	Spektrum FT-IR (KBr pelet) senyawa aktif .....	99
Gambar 41.	Puncak ion molekul ( $m/z$ ) dan analisis elemental senyawa aktif (rumus molekul ditunjukkan oleh tanda panah) ...	100
Gambar 42.	Spektrum $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz) .....	102
Gambar 43.	Spektrum $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz) .....	103
Gambar 44.	Spektrum $^{13}\text{C}$ -NMR senyawa aktif dengan teknik DEPT (125 MHz) .....	104
Gambar 45.	Spektrum 2D NMR senyawa aktif dengan teknik HMQC	105
Gambar 46.	Struktur senyawa emestrin .....	106
Gambar 47.	Efek emestrin pada dosis 1,0 µg/ml terhadap morfologi beberapa jenis sel (tanda panah) .....	107
Gambar 48.	Profil penghambatan sel T47D, HepG2, HeLa dan Vero setelah diberi perlakuan emestrin selama 24 jam .....	108
Gambar 49.	Efek emestrin terhadap siklus T47D .....	110
Gambar 50.	Jumlah sel T47D yang mengalami apoptosis dan nekrosis setelah diberi perlakuan emestrin .....	111
Gambar 51	Kerangka utama <i>epidithiodioxopiperazine</i> (Anonim <sup>d</sup> , 2012) .....	118
Gambar 52.	Biosintesis senyawa gliotoxin (a) dan sirodesmin (b) (Gardiner <i>et al.</i> , 2005) .....	122
Gambar 53.	<i>Cluster</i> gen biosintesis sirodesmin pada kapang <i>Leptosphaeria muculans</i> dan gliotoxin pada kapang <i>Aspergillus nidulans</i> .....	123

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Kapang laut yang berasal dari TNL Wakatobi, SULTRA .....	141
Lampiran 2. Kapang laut yang berasal dari perairan Binuangeun, Banten .....	142
Lampiran 3. Kapang laut yang berasal dari perairan Manado, SULUT .....	143
Lampiran 4. Kapang laut yang berasal dari TNL Kepulauan Seribu, Jakarta .....	144
Lampiran 5. Morfologi sel T47D setelah diberi perlakuan ekstrak kasar kapang hasil kultivasi dalam media cair 100 ml .....	145
Lampiran 6. Kristal formazan yang terbentuk 4 jam setelah pemberian MTT pada sel T47D yang diberi ekstrak kasar dari kapang hasil kultivasi dalam media cair 100 ml .....	147
Lampiran 7. Morfologi sel T47D dan kristal formazan yang terbentuk setelah perlakuan ekstrak miselium dan <i>broth</i> kapang MFW39 .....	149
Lampiran 8. Morfologi sel T47D akibat perlakuan emestrin pada berbagai dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) .....	150
Lampiran 9. Morfologi sel HepG2 akibat perlakuan emestrin pada berbagai dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) .....	151
Lampiran 10. Morfologi sel HeLa akibat perlakuan emestrin pada berbagai dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) .....	152
Lampiran 11. Morfologi sel Vero akibat perlakuan emestrin pada berbagai dosis ( $\mu\text{g/ml}$ ) .....	153
Lampiran 12. Pensejajaran sekuens gen ITS1-5.8S-ITS2 kapang MFW39 dengan <i>Emericella nidulans</i> GQ461904.1 .....	154



<b>Lampiran 13.</b>	<b>Analisis Probit Ekstrak Kasar Miselium MFW39 vs Sel T47D .....</b>	<b>155</b>
<b>Lampiran 14.</b>	<b>Analisis Probit Ekstrak Kasar <i>Broth</i> MFW39 vs Sel T47D .....</b>	<b>156</b>
<b>Lampiran 15.</b>	<b>Analisis Probit Emestrin vs Sel T47D .....</b>	<b>157</b>
<b>Lampiran 16.</b>	<b>Analisis Probit Emestrin vs Sel HepG2 .....</b>	<b>158</b>
<b>Lampiran 17.</b>	<b>Analisis Probit Emestrin vs Sel HeLa .....</b>	<b>159</b>
<b>Lampiran 18.</b>	<b>Analisis Probit Emestrin vs Vero .....</b>	<b>160</b>
<b>Lampiran 19.</b>	<b>Hasil identifikasi hospes W-02-08 dan B-10-09 .....</b>	<b>161</b>
<b>Lampiran 20.</b>	<b>Hasil pengukuran LC-ESI-ToF-MS .....</b>	<b>162</b>
<b>Lampiran 21.</b>	<b>Hasil pengukuran <sup>1</sup>H-NMR emestrin (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ..</b>	<b>163</b>
<b>Lampiran 22.</b>	<b>Hasil pengukuran <sup>13</sup>C-NMR emestrin (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ..</b>	<b>167</b>
<b>Lampiran 23.</b>	<b>Hasil pengukuran <sup>13</sup>C-NMR emestrin dengan teknik DEPT (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) .....</b>	<b>170</b>
<b>Lampiran 24.</b>	<b>Spektrum 2D NMR dengan teknik HMQC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) .....</b>	<b>172</b>
<b>Lampiran 25.</b>	<b>Kromatogram sekuensing produk PCR ITS1 dan ITS4 kapang MFW39 .....</b>	<b>175</b>

## DAFTAR SINGKATAN

ASW	: <i>Artifisial Seawater</i>
ACN	: <i>Acetonitrile</i>
CIP	: <i>Cdk inhibitory protein</i>
CAM	: <i>Cell Adhesion Molecules</i>
Cdk	: <i>Cyclin-dependent kinase</i>
Cak	: <i>Cdk-activating kinase</i>
CKI	: <i>Cdk inhibitor</i>
CLL	: <i>B-cell chronic lymphocytic leukemia</i>
CYA	: <i>Czapek Yeast Agar</i>
CDCl <sub>3</sub>	: <i>Deuterized chloroform</i>
DCM	: <i>Dichloromethane</i>
DMSO	: <i>Dimethyl sulfoxide</i>
DEPT	: <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DNA	: <i>Deoxyribosa Nucleic Acid</i>
ET-743	: <i>Ecteinascidin 743</i>
ETP	: <i>Epithiodioxopiperazine</i>
EtOAc	: <i>Ethyl Acetate</i>
FBS	: <i>Fetal bovine serum</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FTIR	: <i>Fourier Transform Infra Red</i>
FasL	: <i>Fas ligand</i>
GPY	: <i>Glucose Yeast Agar</i>
HPLC	: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HMQC	: <i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
ITS	: <i>Internal transcribed spacer</i>
KCKT	: <i>Kromatografi Cair Kinerja Tinggi</i>
KLT	: <i>Kromatografi Lapis Tipis</i>
LSU	: <i>Large Subunit</i>

LC-ESI-ToFMS	: <i>Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Time of Flight-Mass Spectrophotometri</i>
MS	: <i>Mass Spectra</i>
MEA	: <i>Malt Extract Agar</i>
MFM	: <i>Minimum Fungi Medium</i>
MTT	: <i>MTT{3-(4,4-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide}</i>
MEB	: <i>Malt Extract Broth</i>
NHL	: <i>Follicular non-Hodgkin lymphoma</i>
NMR	: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
MEGA	: <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MeOH	: <i>Methanol</i>
NRPS	: <i>Non-Ribosomal Peptide Synthetase</i>
<i>NFκB</i>	: <i>Nuclear factor kappa B</i>
<i>PI3K/Akt</i>	: <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDA	: <i>Potato Dextrose Agar</i>
PDA	: <i>Photo Diode Array</i>
PMA	: <i>Phospho Molybdic Acid</i>
PI	: <i>Propidium iodide</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
PS	: <i>Phosphotidylserine</i>
RPMI	: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>R<sub>f</sub></i>	: <i>Retention Factor</i>
Rb	: <i>Retinoblastoma Protein</i>
SCUBA	: <i>Self Contained Underwater Breathing Apparatus</i>
SSU	: <i>Small Subunit</i>
<i>SiO<sub>2</sub></i>	: <i>Silica gel</i>
SDS	: <i>Sodium dodecyl sulphate</i>
SWS	: <i>Soluble starch Water Soytone</i>
TGF-β	: <i>Transferring Growth Factor-β</i>

<i>TNF</i>	: <i>Tumor necrosis factor</i>
TNL	: Taman Nasional Laut
TLC	: <i>Thin Layer Chromatography</i>
TRAIL R1	: <i>Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand receptor</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>