

RINGKASAN

Penyakit tidak menular yang menyebabkan kematian global adalah kanker. Kematian akibat kanker diperkirakan menempati peringkat pertama serta kanker dapat menurunkan harapan hidup di setiap negara di dunia pada abad ke-21. Kanker kolorektal atau kanker usus besar merupakan salah satu kanker yang umum diderita oleh warga negara di dunia. Pembedahan kanker dan kemoterapi merupakan perawatan rutin untuk pasien kanker kolorektal. Terapi dari bahan alami untuk penyakit kanker dapat menjadi pilihan terapi yang memiliki efek samping lebih kecil, serta senyawa dari bahan alam terbukti dapat menghambat pertumbuhan sel kanker. Salah satu bahan alami yang dapat digunakan untuk mengatasi kanker adalah jamur *Lentinula edodes* atau jamur shiitake. Jamur shiitake merupakan *edible mushroom* yang juga dapat dimanfaatkan sebagai *medicinal mushroom* yang berpotensi sebagai bahan alam antikanker. Senyawa bioaktif dari jamur telah terbukti mampu meregulasi sistem imun dengan maturasi, diferensiasi dan proliferasi sel-sel imun, serta dapat menghambat pertumbuhan dan penyebaran kanker. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui jenis metabolit sekunder dari *L. edodes*, mengetahui jenis pelarut untuk ekstraksi metabolit sekunder *L. edodes* yang efektif untuk uji sitotoksik, antiproliferasi dan apoptosis, mengetahui efektivitas metabolit sekunder *L. edodes* dalam menghambat (IC₅₀) sel kanker kolorektal (WiDr), mengetahui efektivitas metabolit sekunder *L. edodes* dalam menghambat proliferasi sel kanker kolorektal (WiDr), serta mengetahui mekanisme kematian sel kanker kolorektal (WiDr) setelah diberikan ekstrak metabolit sekunder dari *L. edodes*.

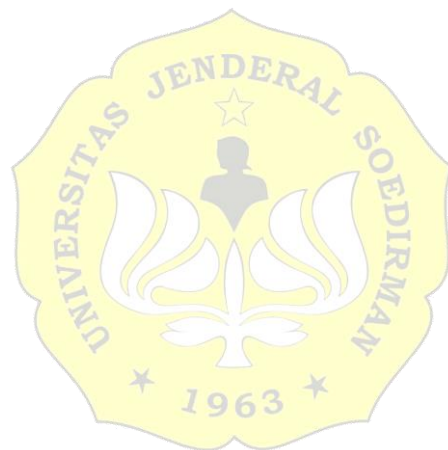
Penelitian dilakukan secara eksperimental melalui dua tahap yaitu, (1) pertumbuhan miselium *L. edodes* pada medium pertumbuhan *mushroom complete medium* (MCM) dan (2) ekstraksi metabolit sekunder dari tubuh buah, miselium dan filtrat kultur *L. edodes*. Ekstrak dari *L. edodes* diuji dengan uji sitotoksik, antiproliferasi, apoptosis serta diidentifikasi dengan KLT dan GC-MS. Data berat kering miselium *L. edodes* dianalisis menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) dan data yang berbeda nyata dilanjutkan *Duncan multiple range test* (DMRT). Data

hasil absorbansi pada uji sitotoksik yang diperoleh dikonversi menjadi persentase sel yang hidup. Data persentase sel yang hidup selanjutnya dikonversi ke IC₅₀ menggunakan analisis regresi linear. Hasil uji antiproliferasi dianalisis secara deskriptif. Hasil uji apoptosis dengan metode *flow cytometry* dihitung hasil persentase sel hidup, sel apoptosis dan sel nekrosis sesuai dengan *output* dari alat *flow cytometer*.

Penelitian pertumbuhan miselium *L. edodes* menggunakan rancangan penelitian rancangan acak lengkap (RAL) dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah konsentrasi *yeast extract* (1, 2, dan 3 g/L) dan faktor kedua adalah waktu inkubasi (5, 10, 15, 20, 25 dan 30 hari). Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi *yeast extract* 2 g/L merupakan konsentrasi terbaik untuk menumbuhkan miselium *L. edodes*. Hasil analisis DMRT menunjukkan perlakuan 5, 10, 15 dan 20 hari tidak berbeda nyata dan perlakuan 25 dan 30 hari berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan miselium *L. edodes*. Konsentrasi 2 g/L dari *yeast extract* dan waktu inkubasi 30 hari merupakan perlakuan terbaik untuk menumbuhkan miselium *L. edodes*.

Penelitian selanjutnya, ekstraksi metabolit sekunder dari tubuh buah, miselium dan filtrat kultur *L. edodes* menggunakan pelarut *n-hexane*, kloroform dan etil asetat. Berdasarkan uji sitotoksik nilai IC₅₀ terbaik untuk menghambat sel kanker kolorektal (WiDr) adalah 341,327 µg/mL dari ekstrak *n-hexane* tubuh buah *L. edodes*, ekstrak kloroform (344,15 µg/mL) dan ekstrak etil asetat (347,21 µg/mL) tubuh buah *L. edodes*. Ekstrak *n-hexane*, kloroform, dan etil asetat tubuh buah *L. edodes* dapat menurunkan proliferasi sel kanker kolorektal (WiDr) pada waktu 24 jam setelah pemberian ekstrak. Mekanisme kematian sel kanker kolorektal (WiDr) mengalami apoptosis 57,64% dan yang nekrosis 30,42% setelah pemberian ekstrak etil asetat tubuh buah *L. edodes*. Golongan metabolit sekunder diidentifikasi dengan uji KLT dan GC-MS. Senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak *n-hexane* tubuh buah *L. edodes* antara lain mirip dengan, *decanoic acid*, alkaloid (nikotin, piperidin dan irhdiamine A), terpenoid (guanidine dan cholestane), flavonoid (kumarin), serta sparsomycin. Senyawa biaktif yang terkandung dalam tubuh buah *L. edodes* berpotensi sebagai senyawa antikanker.

Kata Kunci: *Lentinula edodes*, Uji Antiproliferasi, Uji Flow Cytometry, Uji Sitotoksik, WiDr cell



SUMMARY

Cancer is one of the non-communicable diseases that causes global death. Death caused by cancer is estimated to occupy the first rank. In addition, cancer can reduce life expectancy in every country in the 21st century. Colorectal or colon cancer is one of the most common cancers worldwide. Cancer surgery and chemotherapy are routine treatments for colorectal cancer patients. Therapy from natural ingredients for cancer can be an alternative therapy with fewer side effects, and bioactive compounds from natural ingredients have been shown to inhibit the growth of cancer cells. Meanwhile, *Lentinula edodes*, shiitake, is an edible and well-known medicinal mushroom that potentially acts as an anticancer. Mushroom bioactive compounds can regulate the immune system by affecting the maturation, differentiation and proliferation of immune cells and can inhibit cancer cell growth and metastasis. Mushroom bioactive compound can be used as anticancer by apoptosis and decrease inflammation. So, this study aimed to know secondary metabolites compound can be used as anticancer colon cells (WiDr). The objectives of this study to determine the type of secondary metabolite compound from *L. edodes*, to determine the type of solvent for the extraction of secondary metabolite compounds that were effective for cytotoxic, anti-proliferative, and apoptotic tests, to determine the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of the secondary metabolite compound to inhibit colorectal cancer cells (WiDr), to determine the effectiveness of secondary metabolites of *L. edodes*, to inhibit the proliferation of colorectal cancer cells (WiDr) and to determine the mechanism of colorectal cancer cell death (WiDr) after treats by secondary metabolites extract of *L. edodes*.

The study was experimentally methods through two stages, (1) growing *L. edodes* on mushroom complete medium (MCM) and (2) extracting secondary metabolites from fruit bodies, culture filtrate, and mycelium of *L. edodes*. Extracts from *L. edodes* were tested by cytotoxic assay, anti-proliferative and apoptotic tests and were identified by TLC methods and GC-MS. *L. edodes* mycelium dry weight data were analyzed using analysis of variance (ANOVA). The significant ANOVA results were followed by the Duncan Multiple Range Test (DMRT). The

absorbance data obtained in the cytotoxic assay were converted to the percentage of living cells. The live cell percentage data will be converted to IC_{50} using linear regression analysis. The results of the anti-proliferation test were analyzed descriptively. The results of the apoptosis test using the flow cytometry method were calculated as the percentage of live cells, apoptotic cells, and necrotic cells according to the output of the flow cytometer.

On first stage to growth the mycelium of *L. edodes* it used factorial complete randomized research design that used 2 factors. First factor are yeast extract concentration (1, 2 and 3 g/L) and second factor are incubation time (5, 10, 15, 20, 25 and 30 days). The data shows that 2 g/L of yeast extract concentration in MCM is the best medium for growing the *L. edodes* mycelium. The DMRT analysis showed that the incubation time treatments (5, 10, 15 and 20 days) were not significantly different, and treatments 25 and 20 days significantly affected the mycelium growth of *L. edodes*. So, 2 g/L of yeast extract concentration and 30 days of incubation time is the best treatment to growth *L. edodes* mycelium.

On second stage of this research were extracted fruit body, mycelium and culture filtrate of *L. edodes*. n-hexane, chloroform and ethyl acetate were used for extraction solvent. The best extract was from fruit body of *L. edodes*. The best value of cytotoxicity assay or IC_{50} value to inhibit colorectal cancer cells (WiDr) was 341.327 $\mu\text{g/mL}$ from the n-hexane fruit body extract of *L. edodes* and then chloroform (344,15 $\mu\text{g/mL}$) and ethyl acetate (347,21 $\mu\text{g/mL}$) fruit body extract of *L. edodes*. In addition of this study were using anti proliferative test and the result were n-hexane, chloroform and ethyl acetate fruit body extract of *L. edodes* can reduce the proliferation of WiDr cells 24 hours after treatment. Although the best cytotoxic effect for inhibit WiDr cells growth were n-hexane fruit body extract of *L. edodes*, but we found that ethyl acetate fruit body extract of *L. edodes* was the best extract to causing death of WiDr cells with 57.64% apoptosis and 30.42% necrosis. The fruit body extract were identified with TLC test and GC-MS. The result were the fruit body extract of *L. edodes* mushroom contains alkaloid (nicotine, piperidine and irehdiamine A), terpens (guanidine and cholestane),

flavonoid (coumarin) and sparsomycin. The bioactive from *L. edodes* fruit body was potentially as anticancer agent.

Keywords: *Anti-proliferative assay, Cytotoxic assay, Flow cytometry test, Lentinula edodes, WiDr cell*

