



**PENYARINGAN AKTIVITI BIOLOGI PELBAGAI EKSTRAK DAN POLISAKARIDA  
CENDAWAN TEMPATAN *Amauroderma sp.* DARIPADA ROYAL BELUM**

FATIMAH DIANA AMIN NORDIN<sup>1</sup>, ENDOM ISMAIL<sup>1</sup>, FAUZI DAUD<sup>1</sup>, MAT RASOL AWANG<sup>2</sup>,  
NAZLINA IBRAHIM<sup>1</sup>

1 Pusat Pengajian BioSains dan Bioteknologi,  
Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor

2 Agensi Nuklear Malaysia, Bangi 43000 Kajang, Selangor.

[missfatimahdiana@yahoo.com](mailto:missfatimahdiana@yahoo.com)

**ABSTRAK**

Beberapa siri kajian bagi tujuan penyingiran dilakukan ke atas ekstrak rebusan air, ekstrak metanol larut air, ekstrak etanol, ekstrak metanol dan polisakarida miselium cendawan *Amauroderma sp.* Ujian sitotoksiti di jalankan ke atas sel kanser ovari (CaOV-3) di mana tamoksifen telah digunakan sebagai kawalan. Nilai  $IC_{50}$  yang diperolehi kesemuanya mempunyai nilai yang tinggi. Penyingiran aktiviti antivirus menggunakan sel vero memberikan nilai  $LC_{50}$  bagi ekstrak kasar sebanyak 6.8 mg/ml dan ekstrak etanol 7.9 mg/ml. Walaubagaimanapun, ekstrak metanol dan polisakarida memberikan tiada nilai kepekatan membunuh 50%. Ujian antivirus menggunakan HSV-1 sebagai virus yang menjangkiti sel vero berdasarkan tiga kaedah berbeza iaitu perawatan, pencegahan dan perencatan tidak berupaya mengenalpasti mana-mana ekstrak sebagai berpotensi untuk setiap kaedah tindakan ini. Seterusnya, penyingiran aktiviti antibakteria ke atas bakteria gram negatif dan positif pada satu siri kepekatan ekstrak; 20, 10, 5, 2.5 dan 1.25 mg/ml juga tidak mengesan sebarang aktiviti antibakteria. Kesimpulannya, hasil kajian ini menguatkan lagi hipotesis asal iaitu komponen kimia pelbagai ekstrak *Amauroderma sp.* berfungsi sebagai komponen nutrisi kesihatan tanpa ciri-ciri merencat pertumbuhan sel kanser, mengawal tindakan virus atau merencat pertumbuhan bakteria.

*Kata kunci* : *Amauroderma sp.*, sitotoksiti, antivirus, antibakteria

**PENGENALAN**

Di dunia ini dianggarkan terdapat 140000 spesies cendawan. Spesies cendawan yang diketahui pula dianggarkan terdapat sebanyak 10% daripada spesies tersebut. Daripada ini, hanya 5% sahaja cendawan yang diketahui dilakukan kajian mengenainya. Ini menunjukkan masih terdapat 7000 lagi spesies cendawan yang berpotensi memberi kemanfaatan kepada manusia. Maka melalui pengetahuan dan pengalaman bidang etnoperubatan dalam penggunaan cendawan, keperluan ekologi untuk fungsi menghasilkan metabolit yang bioaktif dan memperbaiki kebarangkalian genetik, farmakologi dan analisis kimia; anggapan boleh dibuat bahawa cendawan mempunyai potensi yang tinggi untuk menjadi satu bioprospek (Lindequist et al. 2005). Cendawan *Amauroderma* adalah genus daripada famili *Ganodermataceae*. Selainnya, genus yang tergolong dalam famili ini adalah *Ganoderma*, *Hodddowia*, *Humphreya* dan *Thermophymatospora*. Famili *Ganodermataceae* ini, mempunyai ciri basidiospora yang unik di mana mempunyai dua dinding basidiospora serta biasanya bersifat keras dan berkayu. Menurut kajian Lee et al. (2008), cendawan *Amauroderma* daripada beberapa spesies telah digunakan oleh masyarakat orang asli di Semenanjung Malaysia sebagai bahan makanan dan sumber ubatan. Kajian meluas pula telah banyak dilakukan terhadap genus *ganoderma* terutamanya *ganoderma lucidum* di mana dilaporkan mempunyai aktiviti antitumor, antivirus dan antikeradangan (Lu et al. 2004). Beberapa dekad ini, bahan kimia semulajadi telah menunjukkan kemajuan yang sangat pesat melalui kemajuan sains dan teknologi. Melalui pemahaman yang lebih mengenai produk semulajadi, kini terdapat peningkatan dari segi minat dan keperluan untuk mengkaji bahan produk semulajadi yang aktif seperti dalam bidang perubatan (Wang et al. 2008), sebagai makanan kesihatan (Kujumgiev et al. 1999), sebagai bahan penambah perisa dalam makanan (Amakura et al. 2002), atau juga sebagai bahan pestisid semulajadi (Venzon et al. 2005). Contohnya *Ganoderma lucidum* sebagai salah satu produk semulajadi, juga terkenal sebagai ubatan tradisional herba yang telah digunakan lebih daripada 2000 tahun adalah salah satu contoh makanan kesihatan yang telah banyak dilakukan kajian terhadapnya (Fang & Zhong 2002). Tujuan kajian ini dijalankan adalah untuk menguji sekiranya wujud aktiviti sitotoksiti, antivirus dan antibakteria bagi ekstrak daripada *Amauroderma sp.* jenis tempatan yang belum pernah dikaji yang mungkin mempunyai nilai bioprospek yang boleh dikomersialkan.

#### BAHAN DAN KAEDAH

Bahan yang digunakan dalam kajian ini adalah sejenis cendawan iaitu *Amauroderma sp.* Cendawan yang berasal dari Royal Belum ini disumbangkan dari koleksi Dr. Mat Rasol Awang dari Agensi Nuklear Malaysia. Miselium *Amauroderma sp.* dikultur di dalam media kultur yang terdiri daripada 50 g/l glukosa : 5 g/l pepton : 5 g/l yis : 1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O : 1 g/l MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O : 0.05 g/l vitamin B. Beberapa siri

pengekstrakkan telah dilakukan bagi memperolehi beberapa ekstrak; ekstrak rebusan air, ekstrak metanol larut air, ekstrak etanol, ekstrak metanol dan sebatian polisakarida.

Kajian penyaringan dimulakan dengan ujian sitotoksiti menggunakan kaedah pengasaian MTT bagi menyaring aktiviti antitumor. Sel kanser ovari (CaOV-3) dihidupkan di dalam media RPMI 1640 terkandung L-glutamin (Flowlab), 10% serum anak lembu (Gibco), 2g natrium bikarbonat (SIGMA-ALDRICH), 1% penisilin/streptomisin 5000 IU/mL (Flowlab), 1% asid amino tidak perlu (Flowlab) pada suhu 37C dengan 5% CO<sub>2</sub>. Sel kemudiannya dipiring dan dieram selama 24 jam ke dalam piring mikrotiter 96 telaga pada kepekatan 5X10<sup>4</sup> sel/mL bagi setiap telaga. Setelah itu, perlakuan sampel dilakukan dengan memasukkan 20µL sampel daripada satu siri pencairan yang berkepekatan akhir 4mg/mL, 1mg/mL, 0.25mg/mL, 0.0625mg/mL, 0.0156mg/mL, 0.0039mg/mL dan 0.009mg/mL bagi ekstrak rebusan air, ekstrak metanol larut air, ekstrak etanol dan ekstrak metanol. Manakala bagi sebatian polisakarida pula siri pencairan yang berkepekatan 400µg/mL, 1µg/mL, 0.25µg/mL, 0.0625µg/mL, 0.0156µg/mL, 0.0039µg/mL dan 0.009µg/mL digunakan. Penilaian perlakuan sampel ke atas sel CaOV-3 dilakukan pada tiga jangkamasa eraman yang berbeza iaitu 24jam, 48jam dan 72jam. Selepas tamat tempoh eraman, 20µL larutan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5difeniltetrazolium bromide (MTT) berkepekatan 2mg/mL ditambahkan ke dalam setiap telaga dalam keadaan gelap untuk mengkuantitikan sel yang viabel dan dieram semula selama 4jam. Selepas itu, semua medium yang terkandung di dalam piring mikrotiter dikeluarkan dan ditambah larutan 100% DMSO sebanyak 100µL. Kemudiannya piring mikrotiter tersebut dibaca dengan mesin pembaca ELISA pada jarak gelombang 540nm. Nilai IC<sub>50</sub> (nilai kepekatan perencatan sampel yang diperlukan untuk merencat 50% pertumbuhan sel) ditentukan daripada graf peratusan kemandirian sel melawan kepekatan sampel.

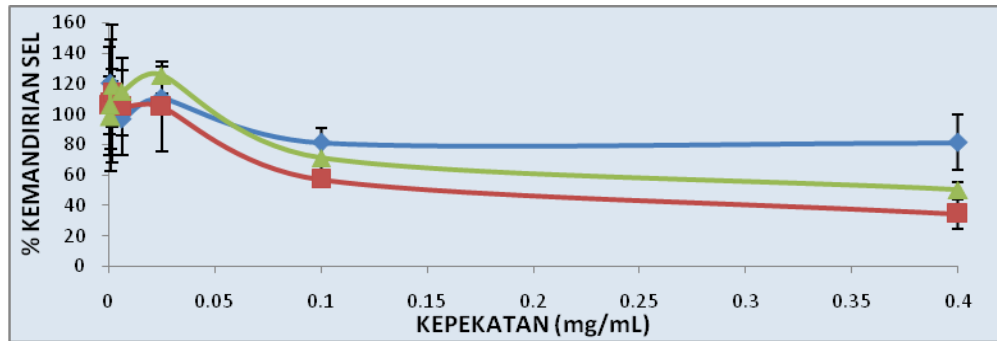
Seterusnya kajian penyaringan aktiviti antivirus dilakukan dengan menggunakan kaedah pengasaian MTT juga tetapi terhadap sel Vero dengan satu siri pencairan pada kepekatan 10mg/mL, 5mg/mL, 2.5mg/mL, 1.25mg/mL, 0.625mg/mL, 0.3125mg/mL dan 0.15625mg/mL dalam jangkamasa perlakuan selama 24jam bagi memperolehi nilai LC<sub>50</sub> (nilai kepekatan ekstrak yang diperlukan untuk membunuh 50% pertumbuhan sel). Sel vero dihidupkan di dalam media DMEM (Flowlab), 10% serum anak lembu (Gibco), 2.15g natrium bikarbonat (SIGMA-ALDRICH), 1% natrium piruvat, 1% penisilin/streptomisin 5000 IU/mL (Flowlab), pada suhu 37C dengan 5% CO<sub>2</sub>. Seterusnya daripada nilai LC<sub>50</sub> yang diperolehi, ujian aktiviti antivirus dilakukan dengan tiga jenis kaedah perawatan iaitu, rawatan I; sel, ekstrak dan virus diberi perlakuan serentak, S+(E+V), rawatan II; sel diinokulat dengan virus selama 2jam sebelum dirawat dengan ekstrak (S+V)+E dan rawatan III; sel dan ekstrak dieram selama 24jam sebelum diinokulat dengan virus, (S+E)+V.

Ujian aktiviti antibakteria dilakukan dengan menggunakan dua bakteria gram positif iaitu *Bacillus subtilis* (Bc) dan *Staphylococcus aureus* (Sa) serta dua bakteria gram negatif iaitu *Escherichia coli* (Ec) dan *Shigella dysenteriae* (Sd). Inokulum bakteria ujian disediakan dengan menginokulat bakteria ujian di dalam kaldu Mueller Hinton (MHB). Bakteria diinokulat ke dalam 10mL MHB dan dieram pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Dengan menggunakan putik kapas steril, ampaian bakteria ujian disebarkan pada permukaan medium agar Mueller Hinton (MHA) secara tiga hala untuk mendapatkan pertumbuhan bakteria yang seragam. Enam cakera diletakkan di atas permukaan agar tersebut dan 10µL sampel ekstrak dengan satu siri kepekatan akhir sebanyak 20mg/mL, 10mg/mL, 5mg/mL, 2.5mg/mL dan 1.25mg/mL diperlakukan termasuk satu kawalan dH<sub>2</sub>O dan kawalan DMSO bagi polisakarida. Satu cakera antibiotik diletakkan di tengah-tengah permukaan agar. Streptomisin digunakan sebagai kawalan antibiotik terhadap bakteria gram negatif dan penisilin sebagai kawalan antibiotik terhadap bakteria gram positif. Diameter zon perencatan diukur selepas eraman selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

#### HASIL DAN PERBINCANGAN

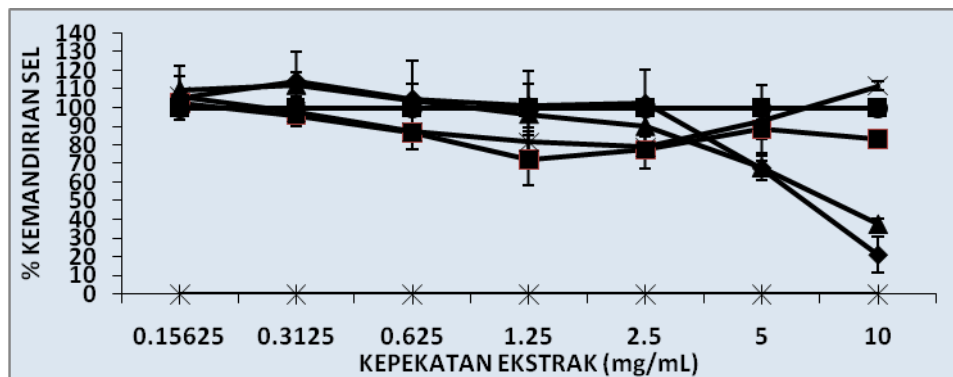
Berdasarkan keputusan ujian, nilai IC<sub>50</sub> diperolehi oleh ekstrak etanol dan ekstrak metanol larut air dalam jangkamasa perlakuan 24jam iaitu 3.07 mg/mL dan 3.7mg/mL masing-masing. Dalam jangkamasa perlakuan 48jam pula, sebatian polisakarida memperoleh nilai IC<sub>50</sub> yang terendah sekali iaitu sebanyak 0.155mg/mL. Seterusnya diikuti oleh ekstrak etanol iaitu 2.25mg/mL, ekstrak metanol larut air iaitu 2.82mg/mL dan ekstrak rebusan air iaitu 3.95mg/mL. Ekstrak metanol tidak memperoleh nilai IC<sub>50</sub> dalam jangkamasa perlakuan ini. Walaubagaimanapun, kesemua ekstrak memperoleh nilai IC<sub>50</sub> dalam jangkamasa perlakuan 72jam iaitu 0.4mg/mL bagi polisakarida yang memperoleh nilai IC<sub>50</sub> yang terendah, diikuti oleh ekstrak etanol sebanyak 2.4,g/mL, ekstrak metanol larut air sebanyak 2.5mg/mL, ekstrak metanol sebanyak 3mg/mL dan ekstrak rebusan air sebanyak 3.75mg/mL. Yuan et al. (2008) telah melakukan kajian ke atas beberapa komponen tulen polisakarida yang diekstrak dari *Ligusticum chuanxiong* Hort. iaitu sejenis tumbuhan herba yang biasa digunakan dalam perubatan tradisional cina. Dalam kajian ini sebatian polisakarida menunjukkan kesan aktiviti perecatan ke atas sel kanser hati (HepG2) pada nilai IC<sub>50</sub> serendah 0.085 mg/mL dan setinggi 0.385 mg/mL. Sehubungan dengan itu, menurut Wasser (2002) polisakarida daripada cendawan tidak bertindak ke atas sel kanser secara langsung, tetapi menghasilkan kesan antitumor melalui pengaktifan tapak jalan alternatif sistem imun di dalam hos. Sebagai kawalan positif bagi kajian sitotoksiti antitumor ini, tamoksifen telah digunakan. Kawalan positif, tamoksifen iaitu dadah antikanser terkini dalam perawatan pesakit kanser memberikan

nilai  $IC_{50}$   $8.7\mu\text{g/mL}$ (24jam),  $8.8\mu\text{g/mL}$ (48jam) dan  $8.4\mu\text{g/mL}$ (72jam). Berdasarkan nilai  $IC_{50}$  yang diperolehi, kesemua ekstrak dari *Amauroderma sp.* terhadap sel kanser berdasarkan kepekatan yang digariskan oleh NCI iaitu  $20\mu\text{g/mL}$  dalam ujian pengesanan aktiviti sitotoksiti, tidak memberi perencatan terhadap pertumbuhan sel kanser yang berkesan.



Rajah 1: Graf kesan polisakarida ke atas sel kanser CaOV-3. Simbol:  $\nabla$  24jam ! 48jam % 72jam

Dadah yang spesifik sangat diperlukan bagi merawat penyakit yang diinfeksi virus. Kajian antivirus terhadap cendawan merangkumi bukan sahaja keseluruhan ekstrak-ekstrak cendawan malah juga sebatian yang dapat dipencilkan daripada cendawan. Bahan ujian boleh bertindak secara langsung kepada virus, merencat enzim virus atau juga sintesis asid nukliek virus. Bahan ujian juga seharusnya tidak toksik kepada dos yang aktif. Maka ujian penyaringan antivirus dilakukan terlebih dahulu sebelum ujian lanjutan dijalankan. Di dalam ujian penyaringan ini nilai  $LC_{50}$  ditunjukkan oleh ekstrak rebusan air ( $6.8\text{mg/mL}$ ) dan ekstrak etanol ( $7.9\text{mg/mL}$ )(Rajah 2). Maka ujian lanjutan menggunakan kedua-dua ekstrak ini dilakukan.



Rajah 2: Graf kesan polisakarida ke atas sel kanser CaOV-3. Simbol:  $\nabla$  Ekstrak rebusan air ! Ekstrak metanol larut air % Ekstrak etanol  $\Gamma$  Ekstak metanol M Kawalan negatif ) Kawalan sel

Hasil ujian antivirus yang diperolehi dalam rawatan I, II dan III bagi ekstrak rebusan air dan ekstrak etanol menunjukkan aktiviti yang tidak ketara iaitu ketiga-tiga rawatan ini pada kepekatan 4mg/mL, 6mg/mL dan 8mg/mL serta 6mg/mL, 8mg/mL dan 10mg/mL masing-masing memberikan nilai darjah keberkesanan yang negatif iaitu masing-masing memperolehi nilai serapan optik yang lebih rendah daripada kawalan (0.195) iaitu nilai serapan optik sel yang diinfeksi virus sahaja (S+V) kecuali bagi rawatan I pada kepekatan 8mg/mL nilai darjah keberkesanannya adalah lebih tinggi (0.207) daripada nilai serapan optik S+V pada peratus kemandirian sel sebanyak 21.6% (Jadual 1). Loizzo et al. (2008) telah membuat kajian terhadap ekstrak etanol dari *Cerdrus Libani* A.Rich di mana ujian antivirus sel, ekstrak dan virus yang diberi perlakuan serentak menunjukkan nilai 50% kepekatan yang merencat pertumbuhan virus pada kadar 0.5 mg/mL hingga 0.66 mg/mL. Perbezaan yang dapat dilihat menunjukkan kajian yang telah dilakukan tidak membawa kepada perencatan 50% pertumbuhan virus walaupun pada kadar kepekatan yang tinggi.

Jadual 1: Rawatan 1; sel, ekstrak dan virus diberi perlakuan serentak, S+(E+V).

S+V(sel dan virus), S+V+R(sel, virus dan Ribavirin)

KEPEKATAN EKSTRAK	SERAPAN OPTIK	% KEMANDIRIAN SEL	KAWALAN NEGATIF S+V (0.195)	KAWALAN POSITIF S+V+R (0.315)
6	0.153	14.9	-	-
8	0.207	21.6	+	-
10	0.194	20	-	-

Bagi ujian antibakteria pula, hasil kajian yang diperolehi menunjukkan tiada aktiviti antibakteria ditunjukkan oleh semua ekstrak di mana tiada zon perencatan diperolehi daripada setiap piring petri ujian. Streptomisin bertindak sebagai kawalan positif terhadap bakteria gram negatif menghasilkan zon perencatan berdiameter 15mm dan 20mm bagi bakteria gram negatif iaitu *Escherichia coli* dan *Shigella dysenteriae* masing-masing. Penisilin iaitu kawalan positif terhadap bakteria gram positif dengan *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* memberikan bacaan zon perencatan berdiameter sebanyak 15mm dan 40mm masing-masing (Jadual 2). Kajian yang telah dilakukan oleh Roberts (2004) terhadap ekstrak rebusan air dan ekstrak metanol miselium *Ganoderma Lucidum* Australia juga mendapati tiada zon

perencatan diperolehi dari bakteria *E.coli*. Walaubagaimanapun, aktiviti antibakteria terhadap *B.subtilis* hanya kelihatan pada ekstrak rebusan air sahaja dengan memperoleh nilai zon perencatan iaitu 7mm.

Jadual 2: Aktiviti antibakteria oleh ekstrak dari *Amauroderma sp.* (R=ekstrak rebusan air, H=ekstrak akues metanol larut air, E=ekstrak etanol M=ekstrak metanol, P=sebatian polisakarida). Diameter cakera=6.0mm

EKSTRAK ( KEPEKATAN mg/mL )	DIAMETER ZON PERENCATAN (mm)			
	<i>E.coli</i>	<i>S.dysenteriae</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>
R(10)	6.0	6.0	6.0	6.0
R(5)	6.0	6.0	6.0	6.0
R(2.5)	6.0	6.0	6.0	6.0
R(1.25)	6.0	6.0	6.0	6.0
R(0.625)	6.0	6.0	6.0	6.0
H(10)	6.0	6.0	6.0	6.0
H(5)	6.0	6.0	6.0	6.0
H(2.5)	6.0	6.0	6.0	6.0
H(1.25)	6.0	6.0	6.0	6.0
H(0.625)	6.0	6.0	6.0	6.0
M(10)	6.0	6.0	6.0	6.0
M(5)	6.0	6.0	6.0	6.0
M(2.5)	6.0	6.0	6.0	6.0
M(1.25)	6.0	6.0	6.0	6.0
M(0.625)	6.0	6.0	6.0	6.0
E(10)	6.0	6.0	6.0	6.0
E(5)	6.0	6.0	6.0	6.0
E(2.5)	6.0	6.0	6.0	6.0
E(1.25)	6.0	6.0	6.0	6.0
E(0.625)	6.0	6.0	6.0	6.0
P(10)	6.0	6.0	6.0	6.0
P(5)	6.0	6.0	6.0	6.0
P(2.5)	6.0	6.0	6.0	6.0
P(1.25)	6.0	6.0	6.0	6.0
P(0.625)	6.0	6.0	6.0	6.0
STREPTOMISIN ( 10IU )	15.0	20.0	–	–
PENISILIN (10IU )	–	–	15.0	40.0

## KESIMPULAN

Melalui ujian penyaringan pelbagai ekstrak daripada cendawan tempatan *Amauroderma sp.* ini, kesimpulan dapat dibuat bahawa komponen kimia *Amauroderma sp.* ini tidak mempunyai ciri-ciri sitotoksik terhadap sel kanser CaOV-3 dan sel Vero, tiada kawalan tindakan yang berkesan terhadap virus, serta tiada tindakan merencat pertumbuhan bakteria. Ciri-ciri ini boleh mengesahkan bahawa pelbagai ekstrak *Amauroderma sp.* sebagai makanan kesihatan. Oleh itu, ia berpotensi dijadikan makanan kesihatan salah satu sumber bahan semulajadi di Malaysia.

## RUJUKAN

Amakura, Y., Umino, Y., Tsuji, S., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T. and Tonogai, Y. 2002. J. Food. Chem. 77, 47-56.

Fang, Q.H. and Zhong, J.J. 2002. Process Biochemistry. 37, 769-774.

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedijeva, Y., Christov, R and Popov, S. 1999. Journal of Ethnopharmacology. 64, 235-240.

Lee, S.S, Chang, Y.S and Noraswati, M.N.R. 2008. Forest Ecology and Management. FORECO 11335. 4.

Loizzo, M.R., Saabb, A., Tundisa, R., Stattia, G.A., Lamprontic, I., Menichinia, F., Gambarid, R., Cinatle, J., Doerre, H.W. 2008. Phytomedicine 15, 79-83.

Lu Q.Y., Jin, Y.S, Zhang, Q., Zhang, Z., Heber, D, Goa, V.L.W, Lid, F.P and Rao, J.Y. 2004. Cancer Letters. 216, 9-20.

Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J. and Julich, W.D. 2005. The pharmacological potential of mushroom. 2(3), 285-299.

Roberts, L.M. 2004. Australian Ganoderma: Identification, Growth and Antibacterial Properties. Thesis Doctor of Philosophy. Swinburne University of Technology.

Venzon, M., Rosado, M.C., Fadini, M.A.M., Ciociola, A.I. and Pallini, A. 2005. Crop Protection. 24, 213-219.

Wang, Y., Ye, L. and Leung, L.K. 2008. Toxicology. 248, 130-135.



Wasser, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. 2002. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 60, 258-274.

Yuan, J.F., Zhang, Z.Q., Fan, Z.C., and Yang, J.X. 2008. Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from *Ligusticum chuanxiong* Hort. *Carbohydrate polymers* 74, 822-827.