

KK  
KKB  
CP. 10/12  
Sug  
P

Bidang Ilmu: Mikrobiologi Farmasi

**LAPORAN  
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL  
BATCH I  
Tahun Anggaran 2011**



**PRODUKSI ANTIBIOTIKA BARU DARI  
*LECYTHOPHORA SP.*, JAMUR ENDOFIT  
TANAMAN *ALYXIA REINWARDTII* BL**

Noor Erma Sugijanto  
Gunawan Indrayanto  
Sugijanto  
Noor Cholies Zaini

**Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional  
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2011**

## HALAMAN PENGESAHAN

1. JUDUL : **Produksi antibiotika baru dari *Lecythophora sp.*, jamur endofit tanaman *Alyxia reinwardtii* BL**
2. Ketua Peneliti
- Nama : Dr. Noor Erma Sugijanto, MS, Apt.
- Jenis Kelamin : Wanita
- NIP : 195211281980022001
- Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
- Jabatan struktural : -
- Bidang keahlian : Kimia Farmasi dan Mikrobiologi Farmasi
- Fakultas/Jurusan : Fakultas Farmasi
- Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti :

No	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	INSTANSI	PERGURUAN TINGGI
1	Dr. Noor Erma Sugijanto, MS., Apt	Kimia Farmasi Mikrobiologi Farmasi	Fakultas Farmasi	UNAIR
2	Prof. Dr. rer.nat. Gunawan Indrayanto	Bioteknologi Farmasi	Fakultas Farmasi	UNAIR
3	Prof. Dr. Sugijanto MS., Apt	Kimia Farmasi	Fakultas Farmasi	UNAIR
4	Prof. Dr. Noor Cholies Zaini	Kimia Bahan Alam	Fakultas Farmasi	UNAIR

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun
- a. Biaya yang diusulkan : Rp. 100.000.000
- b. Biaya yang disetujui tahun 2010 : Rp. 77.500.000

Surabaya, 17 OCT 2011

Ketua Peneliti,

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Farmasi

(Dr. Umi Athiyah, Apt, MS)  
NIP: 195604071981032001

(Dr. Noor Erma Sugijanto, MS., Apt)  
NIP : 195211281980022001

Mengetahui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat

(Dr. Djoko Agus Purwanto, MS., Apt)  
NIP. 195908051987011001

## RINGKASAN

Mikroba endofit dapat berupa bakteri, termasuk *Actinomycetes* dan jamur yang hidup *inter* dan *intra* seluler di dalam jaringan tanaman sehat. (Tan and Zou, 2001). Aktivitas antimikroba metabolit endofit, dihasilkan sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap hama bakteri dan jamur bagi inangnya. Endofit yang paling sering diisolasi adalah jamur (Strobel and Daisy, 2003).

*A. reinwardtii* (pulasari) digunakan sebagai komponen utama jamu dan diketahui tumbuhan tersebut mendekati punah. *A. reinwardtii* BL mengandung kumarin, 5-hidroksikumarin, 8-hidroksikumarin, pinoselinol, 9  $\alpha$ -hidroksi-pinoselinol dan salisifoliol (Steffan, 2006) dan pulosariosida (Kitagawa, *et al.*, 1988). Telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi berbagai jamur endofit dari *Alyxia reinwardtii* diantaranya jamur baru *Lecythophora* sp. (Sugijanto, *et al.*, 2009)

Tujuan penelitian ini, melakukan isolasi dan elusidasi struktur metabolit jamur yang berkhasiat antimikroba khususnya dari *Lecythophora* sp. endofit dari *Alyxia reinwardtii*. Pada penelitian lanjutan ini dikaji kadar metabolit utama dari jamur *Lecythophora* sp. dan pengaruh kondisi kultivasi dalam beragam media dan sumber karbon serta kondisi fermentasi (pH, dengan dan tanpa pengocokan) terhadap kadar metabolit utama tersebut.

*A.reinwardtii* BL diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur telah diidentifikasi oleh Dr. Irawati, LIPI Biologi, Bogor dengan voucher no 710/IPH.1.02/If.8/2003). Jamur endofit *Lecythophora* sp. 30.1 dan 30.5 diisolasi dari *A. reinwardtii* BL, diidentifikasi oleh Dr. R.A.Samson (CBS Utrecht, The Netherlands, reg no 208-2003). Kultivasi dilakukan dalam media cair *Malt extract*, pH awal 6,5 pada suhu kamar selama 4 minggu.

Produksi tertinggi asam kojat *Lecythophora* sp. strain 30.5 mencapai (2238  $\pm$  62)  $\mu$ g/ml dalam media glukosa 50 g/L, *yeast extract* 5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L pH 5,6 pada suhu kamar dengan pengocokan 100 rpm selama delapan hari.

Penemuan jamur yang berpotensi dapat menghasilkan bahan alami berkhasiat membuka pendekatan baru untuk mendapatkan bahan obat dari mikroba yang tumbuh di dalam jaringan tanaman tersebut secara komersial.

## SUMMARY

An endophyte is a bacterial or fungal microorganism, which spends of its life cycle inside the healthy tissues of its host plant, (Tan and Zou, 2001).

*Alyxia reinwardtii* BL (pulasari in Indonesia) is one of the plants used in "jamu". Chemical components of this plant reported coumarin and its 5- as well as 8-hydroxy derivatives, pinoresinol, 9 $\alpha$ -hydroxypinoresinol, salicifoliol (Steffan, 2006) and pulosarioside (Kitagawa, *et al.*, 1988). Some endophytic fungal strains were isolated from this plant. Two endophytic fungal strains (specimen codes 30.1 and 30.5) which were isolated from the stem of *A. reinwardtii*, identified as *Lecythophora* sp.

The aim of this study was to identify the effects of culture condition on the major metabolite production. *Lecythophora* sp. strain 30.1 and 30.5 were grown in different type of medium and carbon sources, pH, static and shaking culture, and time of fermentation to observe the major metabolite concentration.

*A. reinwardtii* was collected from the Purwodadi Botanical Garden, in April 2003, was identified by Dr Irawati at the Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences, Bogor (voucher no 710/IPH.1.02/If.8/2003). Fungal strains 30.1 and 30.5 were identified by Dr R. A. Samson (CBS, Utrecht, The Netherlands, reg. no 208-2003) as members of the genus *Lecythophora*. Mass cultivation of the endophytes were carried out separately in Erlenmeyer (300 mL), which containing malt extract broth (15 g/L, initial pH 6.5) under static conditions at room temperature (ca 30  $\pm$  3°C) for 4 weeks. The highest level of kojic acid (2238  $\pm$  62)  $\mu$ g/ml was obtained by *Lecythophora* sp. strain 30.5 using fermentation medium 2 with initial pH 5,6 and incubated at room temperature for 8 days under rotary shaking culture (100 rpm). On the contrary, the level of kojic acid production through static culture showing lower level compared to rotary shaking culture. The highest level is at (920  $\pm$  46)  $\mu$ g/ml or 0,09 g/L after 14 days of observation.

The discovery of a fungus that produces a medically valuable plant product has opened a promising new approach to obtain rare drugs on commercial scale from microbes that grow inside plants.

**ABSTRACT**

Two endophytic fungal strains (specimen codes 30.1 and 30.5) which were isolated from the stem of *A. reinwardtii*, identified as *Lecythophora* sp.

The highest level of kojic acid ( $2238 \pm 62$ )  $\mu\text{g/ml}$  was obtained by *Lecythophora* sp. strain 30.5 using fermentation medium 2 with initial pH 5,6 and incubated at room temperature for 8 days under rotary shaking culture (100 rpm). On the contrary, the level of kojic acid production through static culture showing lower level compared to rotary shaking culture. The highest level is at ( $920 \pm 46$ )  $\mu\text{g/ml}$  or 0,09 g/L after 14 days of observation.

**ABSTRAK**

Telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi berbagai jamur endofit dari *Alyxia reinwardtii* diantaranya jamur baru *Lecythophora* sp. Produksi tertinggi asam kojat *Lecythophora* sp. strain 30.5 mencapai ( $2238 \pm 62$ )  $\mu\text{g/ml}$  dalam media glukosa 50 g/L, yeast extract 5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L pH 5,6 pada suhu kamar dengan pengocokan 100 rpm selama delapan hari.

**Keywords:** *Lecythophora* sp, *Alyxia reinwardtii*, jamur endofit, asam kojat

## PRAKATA

Puji syukur Ahamdulillah saya panjatkan ke hadirat Allah swt karena atas perkenan dan rahmat yang dilimpahkan-Nya maka penyusunan laporan kemajuan HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL BATCH I TAHUN 2011, yang berjudul **Produksi antibiotika baru dari *Lecythophora* sp. jamur endofit tanaman *Alyxia reinwardtii* BL** dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini saya menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Direktur Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (DP2M), Dirjen DikTi Depdiknas yang telah berkenan mendanai penelitian ini.

Terima kasih kami sampaikan pula kepada Rektor Universitas Airlangga dan Dekan Fakultas Farmasi UNAIR yang telah berkenan memberikan fasilitas untuk menunjang keberhasilan penelitian ini. Demikian pula kepada berbagai pihak yang telah membantu dengan ketulusan hati selama pelaksanaan dan penyusunan laporan penelitian ini disampaikan terima kasih.

Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, bermanfaat bagi masyarakat serta dapat dilanjutkan bagi upaya peningkatan daya saing bangsa menuju kemandirian.

Tim Peneliti

## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
<b>A. LAPORAN HASIL PENELITIAN</b>	
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
PRAKATA	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	9
BAB IV. METODE PENELITIAN	10
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	15
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	26
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1. Latar Belakang masalah

Penggunaan bahan alam khususnya tanaman untuk obat telah dikenal sejak ribuan tahun lalu dan hingga kini tanaman masih berperan penting pada penemuan obat baru selain mikroba dan organisme laut (Proksch *et al.*, 2003 b). Salah satu sumber utama metabolit sekunder berkhasiat obat adalah jamur. Penemuan penisilin pada tahun 1928 (Strobel and Daisy, 2003), diikuti streptomisin dan antibiotika yang lain membuka jalan mengeksplorasi metabolit sekunder berkhasiat dari jamur (Proksch *et al.*, 2003 a). Jamur merupakan sumber penting bahan baku obat seperti beragam antibiotika, alkaloida ergot, asam sitrat, siklosporin sebagai immunosupresan, lovastatin sebagai antihiperlipidaemia, dan peptida-polisakarida yang berfungsi meningkatkan sistem imun (Demain and Solomon, 1986; Morris, 2001). Saat ini di antara beragam jenis jamur, jamur endofit merupakan salah satu yang paling menarik untuk diteliti karena kekayaan kimiawi metabolit yang dihasilkan, keragaman bioaktivitasnya, berlimpahnya biodiversitas, dan kaitan pentingnya dengan fungsi ekologis (Tan and Zou, 2001).

Mikroba endofit dapat berupa bakteri, termasuk *Actinomycetes* dan jamur yang hidup inter dan intraseluler di dalam jaringan tanaman sehat (Tan and Zou, 2001). Endofit dapat berfungsi meningkatkan daya adaptasi tanaman inang dan toleransinya terhadap stres lingkungan maupun daya tahan terhadap bakteri dan jamur patogen, herbivora, hama nematoda, mamalia dan serangga (White *et al.*, 2000).

Sumber daya hayati Indonesia, khususnya mikroba belum banyak diteliti dan dimanfaatkan, padahal potensi sebagai sumber bahan aktif dan senyawa berharga ("*novel substances*") sangatlah besar. Beberapa metabolit yang dihasilkan endofit menunjukkan aktifitas sebagai antibakteri, antifungi, hormon pertumbuhan tanaman, insektisida, immuno-supresan, dan beragam bioaktivitas yang lain (Tan and Zou, 2001). Metabolit sekunder (antibiotika) dihasilkan sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap serangan bakteri, jamur lain atau hama dan predator bagi inangnya (Rayner, 1991). Arti penting kemampuan endofit dalam memproduksi senyawa berkhasiat merupakan



terobosan baru sebagai alternatif untuk memenuhi kebutuhan obat yang meningkat seiring dengan meningkatnya populasi, namun tetap dalam upaya mempertahankan keaneka-ragaman hayati dan kelestarian ekosistem. Mikroorganisme yang tersembunyi dibalik inangnya tersebut merupakan sumber yang kaya senyawa bioaktif dalam bidang obat dan pertanian. Poduksi melalui fermentasi mikroba endofit mempunyai keuntungan, reproduсібel, kemampuannya dapat ditingkatkan dan dapat diproduksi secara tidak terbatas dalam skala industri, dengan rekayasa genetika dan kondisi kultivasi yang berbeda dapat dihasilkan produk yang berbeda (Stierle and Strobel,1995).

*Alyxia reinwardtii* diketahui telah lama digunakan sebagai jamu di Indonesia karena pertumbuhannya yang lambat dan penggunaannya yang banyak tanaman tersebut mendekati punah. Melalui penelitian ini diharapkan diperoleh metabolit sekunder jamur endofit yang diisolasi dari *Alyxia reinwardtii*, yaitu *Lecythophora* sp. yang pada pengujian awal telah menunjukkan aktivitas antimikroba, dapat dielusidasi strukturnya dan dibuktikan aktifitasnya. Pada penelitian lanjutan ini dikaji seberapa besar kadar metabolit utama dari jamur *Lecythophora* sp. dan bagaimanakah pengaruh kondisi kultivasi dalam beragam media dan sumber karbon serta kondisi fermentasi (pH, dengan dan tanpa pengocokan) terhadap kadar metabolit utama tersebut.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tinjauan tentang jamur endofit dan metabolitnya

Mikroba endofit dapat berupa bakteri, termasuk *Actinomycetes* dan jamur yang hidup *inter* dan *intra*-seluler di dalam jaringan tanaman sehat. Hampir semua tanaman yang memiliki jaringan pengangkutan diketahui mengandung bakteri dan atau jamur endofit. Saat ini di antara beragam jenis jamur, jamur endofit merupakan salah satu yang paling menarik untuk diteliti karena kekayaan kimiawi metabolit yang dihasilkan, keragaman bioaktivitasnya, berlimpahnya biodiversitas, dan kaitannya dengan fungsi ekologis (Tan and Zou, 2001).

Indonesia sangat kaya sumber alam hayati, laut dan terrestrial, dengan keanekaragaman yang tinggi oleh karena variasi kondisi lingkungan di berbagai wilayah negeri ini. Indonesia memiliki lebih dari 30.000 spesies tumbuhan terrestrial tingkat tinggi, beberapa diantaranya merupakan tumbuhan penting yang digunakan sebagai bahan obat tradisional Indonesia (Achmad, 2003). Hal ini merupakan sumbangan yang sangat berarti bagi kemanusiaan dan ilmu pengetahuan, apabila sumber alam hayati tersebut dikembangkan dan ditingkatkan nilai tambahnya sebagai bahan obat yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah melalui penelitian. Indonesia sebagai pemilik hutan hujan tropis terbesar didunia memiliki potensi luar biasa sebagai penghasil antibiotika dari endofit berkhasiat yang tersembunyi dalam berbagai jenis tanaman obat.

Berbagai golongan senyawa fungsional dapat dihasilkan dari endofit dan atau interaksinya dengan tanaman inang antara lain alkaloida, amina dan amida, derivat indole, pyrrolozidine, steroid, terpenoid dan terpen, kuinon, flavon dan flavonoid, peptida, fenilpropanoid, fenol dan senyawa lain. Ergot alkaloida ditemukan dalam kultur *Neotyphodium*, endofit yang dikarakterisasi dari *Ergot sclerotia* (Tan and Zou, 2001). Obat kanker Taxol® sangat sulit disintesa, ataupun diisolasi dari tanaman *Taxus sp.* yang pertumbuhannya sangat lambat, ternyata dapat diperoleh dari kultur *in vitro* jamur endofit *Taxomyces andreanae* yang diisolasi dari *Taxus brevifolia* (Pulici, 1997). Akhir-akhir ini berbagai jamur endofit yang diperoleh dari *T. brevifolia*, *T. wallachiana*, *T.*

*yunnanensis*, *T. baccata*, *T. mairei*, *Taxodium distichum*, *Torreya grandifolia* dan *Wollemia nobilis* dilaporkan mampu memproduksi Taxol® dan Taxan derivat dari kultur endofitnya (Pulici, 1997). Melalui fermentasi jamur endofit dapat dihasilkan metabolit sekunder seperti inangnya, misalnya Taxol (obat kanker dari tanaman *Taxus brevifolia*) dan camptothecin (bahan baku anti kanker) dari jamur endofit tanaman *Nothapodytes foetida* (Puri, 2005).

Fungi endofit diasumsikan menghasilkan metabolit yang berkhasiat antibakteri dan atau antifungi karena diyakini bahwa endofit mampu menekan kolonisasi hostnya dari serangan spesies patogen. Beberapa fungi endofit terbukti mampu menghasilkan antibiotika, misalnya phomopsichalasin suatu sitokalasin berharga yang diproduksi endofit *Phomopsis* sp. dari tanaman *Salix gracilostyls var melanostachys* yang bersifat anti bakteri dan antifungi. Cryptocin suatu anti jamur yang sangat poten terhadap *Pyricularia oryzae* dan fitopatogen yang lain, dikarakterisasi dari kultur endofit *Cryptosporiopsis quercina* yang diisolasi dari batang *Tripterygium wilfordii* (Tan and Zou, 2001).

Penisilin N, sporiofungin A, B, C merupakan antibiotika yang diproduksi endofit *Pleurophomopsis* sp. dan *Cryptosporiopsis* sp. yang diisolasi dari tumbuhan *Cardamin heptaphylla* Schulz (Dreyfuss, 1986). Brunner dan Petrini (1992) melaporkan 75% fungi endofit dari 80 jenis yang diteliti menghasilkan antibiotika. Kelompok endofit yang terbukti mampu menghasilkan antibiotika melawan bakteri maupun fungi patogen terhadap manusia, hewan dan tumbuhan terutama dari genus *Coniothirum* dan *Microsphaeropsis*. Fungi genus *Cryptosporiopsis* dikenal sebagai penghasil antibiotika berspektrum luas. Fungi endofit xylootropik (kelompok endofit yang berasosiasi dengan tumbuhan berkayu) juga menunjukkan aktifitas antibiotika (Petrini, 1992). Satu strain *Xylaria* sp. yang diisolasi dari tumbuhan epifit di Amerika Selatan dilaporkan menghasilkan antibiotika jenis baru dari kelompok sitokalasin (Dreyfuss, 1986). Fungi endofit yang memiliki nilai komersial dalam bidang farmasi a.l *Balansia* sp. dan *Acremonium coenophialum* (Bacon, 1988). Jamur endofit dilaporkan juga dapat menghasilkan siklosporin A yang berpotensi sebagai antifungi dan bahan immunosupresif (Borel, 1976). Siklosporin dihasilkan *Acremonium luzulae* W. Gams yang diisolasi dari

buah strawberry (Moussaif, 1977). Antibiotika sefalosporin dikarakterisasi dari strain tertentu *Cephalosporium* dan *Emericellopsis (Acremonium)*, dan fungi *Anixiopsis*, *Arachnomyces*, *Diheterospora*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* dan *Spiroidium* (Morin and Gorman, 1982). Pada masyarakat tradisional seperti Aborigin, tanaman obat *Kennedia nigricans* yang digunakan secara turun temurun ditemukan endofit *Streptomyces munumbi* yang menghasilkan munumbicin A, B, C, D. yang berkhasiat antibakteri terhadap anthrax, tbc, antijamur, anti malaria dan antikanker (Strobel and Daisy, 2003).

Wiyakrutta melaporkan dari 81 tanaman obat yang diisolasi jamur endofitnya, beberapa menunjukkan hasil positif saat diuji aktivitasnya terhadap bakteri tbc, *Plasmodium falciparum* dan bersifat antiviral terhadap virus *Herpes simplex* dan antikanker terhadap sel-line tertentu (Wiyakrutta, 2004).

Pada perkembangannya, penelitian endofit ini membuka jalan melakukan riset untuk menjelaskan mengapa pada beberapa endofit dapat dihasilkan senyawa yang sangat karakteristik, seperti yang dimiliki oleh inangnya. Hal ini membuka peluang untuk meninjau kembali tentang riset khemotaksonomi dan kemungkinan mikroba endofit ini sebagai sumber yang kaya untuk mendapatkan bahan bioaktif dan senyawa berharga dengan potensi sebagai obat, dan dalam bidang pertanian, misalnya sebagai hormon pertumbuhan tanaman, fungisida, insektisida, larvasida dan sebagainya.

## 2.2 Tinjauan tentang *Alyxia reinwardtii* BL

*Alyxia reinwardtii* BL (pulasari), Apocynaceae merupakan salah satu komponen utama dalam ramuan obat tradisional Indonesia. Pemanfaatan *Alyxia reinwardtii* sebagai komponen jamu tidak disertai upaya pelestariannya sehingga terancam punah. Berdasarkan penelitian Puslitbang Farmasi, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia, *Alyxia* sp. aman digunakan, mempunyai efek farmakologi terhadap hewan coba dan memiliki data pendukung empiris untuk pengobatan batuk, disentri dan penggunaan yang ada hubungannya dengan wanita. Secara empiris *Alyxia reinwardtii* berkhasiat mengobati demam, sariawan, karminatif, dan spasmolitik. (Anonim, 1998).

### 2.3 Tinjauan tentang Genus *Lecythophora*

*Lecythophora* sp. termasuk suku Coniochaetaceae, termasuk jamur yang hifanya berseptata, mempunyai hialin, *adelophialides*, konidia dan klamidospora. *Lecythophora* termasuk jamur yang menguraikan kayu (*soft rot fungi*). Ada tiga spesies yang telah dikenal yaitu *Lecythophora hoffmannii* (*Phialophora hoffmannii*), *Lecythophora mutabilis*, dan *Lecythophora lignicola* (*Phialophora lignicola*). *Lecythophora* sp. diketahui mendegradasi asam-asam resin dalam limbah buangan industri kertas dan pulp yang toksik bagi ikan dan biota air hingga 67%. Pengolahan dengan jamur ini lebih efisien dan ramah lingkungan untuk menghilangkan asam resin yang toksik di limbah industri kayu dan kertas (Wang *et al.*, 1995).

### 2.4 Tinjauan tentang Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi merupakan metode pemisahan campuran komponen kimia yang dibawa oleh fase mobil melalui fase diam. Campuran yang dipisahkan diletakkan di fase diam sedangkan fase mobil bergerak melalui sistem tersebut. Pemisahan yang terjadi didasarkan atas interaksi selektif seperti absorpsi permukaan dan kelarutan relatif antara komponen dalam campuran dengan fase diam maupun fase mobil (Cannell, 1998). Pada Kromatografi cair kinerja tinggi (High Performance Liquid Chromatography - HPLC), pemisahan campuran senyawa dalam kolom kromatografi lebih efektif bila fase diam merupakan lapisan tipis butiran yang homogen dan mempunyai permukaan sangat kecil. Kondisi ini sangat peka terhadap aliran fase mobil, dibutuhkan tekanan untuk mengatasi hambatan tersebut agar aliran fase mobil lancar, untuk tujuan tersebut digunakan pompa. Kolom HPLC berupa tabung stainless steel yang dikemas diisi butiran silika 5  $\mu\text{m}$  yang diikat dengan gugus octadecylsilyl (C18-Si-). Saat ini pengembangan kolom HPLC sangat beragam untuk memenuhi kebutuhan analisis yang makin rumit dan canggih.

Fase mobil biasanya terdiri dari pelarut polar atau campuran pelarut polar, misalnya air dengan metanol atau asetonitril. Komposisi fase mobil dapat diprogram untuk berubah secara berkesinambungan (elusi gradien) dari kondisi polar ke kurang polar. Gas yang terlarut dapat membentuk gelembung pada fase mobil saat melewati kolom hingga menyebabkan tekanan menurun drastis, maka sebaiknya dilakukan

ultrasonikasi fase mobil sebelum digunakan. Optimasi kondisi HPLC dilakukan dengan mengubah-ubah fase mobil untuk mendapatkan pemisahan yang baik (Bidlingmeyer, 1992).

Larutan sampel dalam volume tertentu ( $\mu\text{l}$ ) disuntikkan pada injektor, maka campuran zat beserta fase mobil melalui kolom dan akhirnya mencapai detektor yang digunakan untuk menentukan adanya komponen dalam sampel. Umumnya digunakan detektor UV karena cukup sensitif pada molekul yang mengabsorpsi sinar UV. Panjang gelombang yang digunakan diatur sesuai kebutuhan analisis. Integrator dihubungkan secara *on-line* dengan detektor, untuk memonitor adanya komponen yang melewati kolom sesudah mengalami pemisahan. Puncak-puncak khromatogram menunjukkan banyaknya komponen yang tereluasi oleh sistem dan puncak tersebut sesuai absorbansi UV komponen tertentu bagian dari campuran yang dipisahkan. HPLC semi preparatif digunakan untuk memisahkan dan mengisolasi komponen dalam campuran sedangkan HPLC analitis untuk mengidentifikasi dan menentukan konsentrasi komponen dalam campuran (Bidlingmeyer, 1992).

## 2.5 Tinjauan tentang Asam Kojat dan Metode Analisisnya

Asam kojat larut dalam air, etanol, aseton dan etil asetat sehingga mudah diderivatisasi dengan beragam khasiat biologis. Hal ini didukung sifat fisiko-kimianya seperti hidrofobisitas, keasaman, dan kemampuan membentuk kompleks yang berperan penting dalam aktivitas biologis asam kojat dan turunannya. Asam kojat dapat diderivatisasi untuk sediaan anti inflamasi, bronkhodilator, anestesi lokal, fungisida, antimikroba, herbisida, insektisida atau pestisida dan digunakan dalam rekayasa senyawa baru yang bersifat bioaktif (Aytemir *et al.*, 2003; Brtko *et al.*, 2001).

Metabolit utama endofit *Lecythophora* sp. dari *Alyxia reinwardtii* dari penelitian terdahulu adalah asam kojat. Analisis kualitatif asam kojat dilakukan dengan KLT (Zeringue, 1998; Dutton, 1985); untuk analisis kuantitatif secara kolorimetri (Rofarizan, 1998) dan HPLC (Lin, *et al.*, 2007a, b; Masse *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004; Ariff *et al.*, 1996). Penentuan kadar asam kojat dan arbutin dalam kosmetik,

digunakan kolom Diol dengan fase mobil asetonitril : 0,05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (65:35, v/v) pada pH 2,5 diamati pada  $\lambda$  270 untuk asam kojat dan arbutin 286 nm (Masse *et al.*, 2001).

Huang *et al.*, (2004) melaporkan penentuan Magnesium askorbil fosfat, glukosida askorbil, asam kojat, arbutin dan hidrokuinon dalam kosmetik secara simultan dengan HPLC dengan kolom Cosmosil 5 C 18-AR-II (4,6 mm i.d.x 250 mm). Fase mobil terdiri dari campuran 0,05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH diatur 2,5 dengan asam fosfat) dan metanol dengan perbandingan 99:1. Kecepatan alir 0,9 -1,2 mL/menit, diamati pada  $\lambda$  280 nm.

Metode HPLC untuk penentuan kadar asam kojat dalam kultur jamur dilaporkan Ariff *et al.*, (1996) dengan kolom Hibar prepacked column RT 250-4 Lichrosorb RP-18 (10  $\mu$ m). Fase mobil terdiri dari campuran 50 mM dapar fosfat pH 3 dan metanol (95:5) dengan detektor UV pada  $\lambda$  265 nm. Analisis asam kojat dalam fermentasi *Aspergillus oryzae* dilakukan pada kolom C18, sebagai fase mobil digunakan metanol - 0,01 mol/L disodium hidrogen fosfat dan 2 mmol tetrabutylammonium bromida (4:96) dideteksi dengan UV pada  $\lambda$  226 nm. Rekoveri didapatkan pada kultur wort-yeast, wort-peptone dan potato-yeast-sugar masing-masing 98,2%, 103,4 %, 97,2 % dengan RSD 0,51%, 0,45% dan 0,43% (Zhao *et al.*, 2003).

## BAB III

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 3.1 TUJUAN PENELITIAN

Tujuan penelitian ini melakukan isolasi dan elusidasi struktur metabolit jamur yang berkhasiat antimikroba khususnya dari *Lecythophora* sp. endofit dari *Alyxia reinwardtii* BL. Pada penelitian lanjutan ini dikaji kadar metabolit utama dari jamur *Lecythophora* sp. dan pengaruh kondisi kultivasi dalam beragam media dan sumber karbon serta kondisi fermentasi (pH, dengan dan tanpa pengocokan) terhadap kadar metabolit utama tersebut.

#### 3.2 MANFAAT PENELITIAN

Antimikroba baru sangat diperlukan untuk terapi beragam penyakit infeksi pada manusia, hewan ternak dan agroindustri, mengingat telah terjadi resistensi pada beragam mikroba penyebab penyakit misalnya tbc. Jamur endofit berpotensi ekonomi penting sebagai sumber bahan baku obat, antibiotika, enzim, insektisida, dan hormon pertumbuhan tanaman di masa depan. Adanya potensi jamur endofit sebagai sumber bahan berkhasiat membuka terobosan baru dalam hal ini merupakan alternatif metode baru dalam penyediaan bahan baku obat. Beragam antibiotika dapat diproduksi jamur endofit, a.l.: siklosporin A, sefalosporin, munumbicin, sitokalsin, penicillin N, sporiofungin dan sebagainya. Diharapkan dari penelitian yang dilakukan, dapat diisolasi berbagai senyawa berkhasiat antimikroba dari endofit *Lecythophora* sp. yang diisolasi dari *Alyxia reinwardtii* dan dapat ditingkatkan kapasitas produksinya melalui optimasi kondisi kultivasi.

Tujuan jangka panjang penelitian ini, diperoleh temuan antimikroba baru yang poten dan berkhasiat, tapi aman digunakan sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat dan dipatenkan.



## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Bahan

##### 4.1.1 Bahan penelitian

Tumbuhan inang *Alyxia reinwardtii* BL diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur pada bulan April 2003, dan telah diidentifikasi oleh Dr. Irawati, LIPI Biologi, Bogor dengan voucher no 710/IPH.1.02/If.8/2003. Jamur endofit *Lecythophora* sp. 30.1 dan 30.5 diisolasi dari *Alyxia reinwardtii* BL menurut prosedur Sugijanto *et al.*, 2009 dan telah diidentifikasi oleh Dr. R.A.Samson (CBS Utrecht, The Netherlands, reg no 208-2003).

##### 4.1.2 Bahan kimia

Bahan kimia digunakan untuk ekstraksi meliputi: etil asetat, metanol, *n*-heksan p.a (Mallinckrodt Baker Inc. Philipsburg, NJ), *n*-butanol (tehnis diredestilasi). Etanol (pharmaceutical grade) dan NaCl (E Merck). Pemurnian dan KLT digunakan Plate KLT *Silicagel 60 F<sub>254</sub>*, dan *Silicagel 60 G for colum* (E. Merck), *n*-heksan, etil asetat, diklorometan, metanol p.a. (Mallinckrodt Baker Inc. Philipsburg, NJ), dan kloroform (E. Merck). Pereaksi penampak noda digunakan: anisaldehyd- $H_2SO_4$ . Pelarut untuk HPLC digunakan air steril (Otsuka), dan metanol pro HPLC (E Merck). Natrium heksan sulfonat (JT Baker) sebagai pereaksi pada HPLC dan  $Na_2HPO_4$  (E Merck) sebagai komponen dapar fase mobil.

##### 4.1.3 Bahan Media

Agar (food grade), Malt extract (E. Merck), Saboroud 2% dextrose broth (Oxoid, CMI), Potatoes Dextrose Agar (Difco), Nutrient broth (Oxoid, CMI). Media cair digunakan *Malt extract*, dan untuk fermentasi digunakan media cair *Malt extract* (E. Merck), *Saboroud*, *Potatoes Dextrose Broth* dan *Czapek*. Media produksi untuk fermentasi digunakan Glukosa (pharmaceutical grade), *Yeast Extract* (Difco),  $KH_2PO_4$  (E.Merck), dan  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (E.Merck).

## 4.2 Alat

Alat yang digunakan meliputi: *Autoclave* (Huxley HL – 340 Speedy), *Laminair Air Flow Cabinet* (Dalton), timbangan analitik (Mettler Toledo AB 204-s), pH-meter (Fischer Accumet Model 230A). Erlenmeyer 300 ml, *Chamber* kromatografi (Camag), Lampu UV, *ultrasonic, vortex, soccorex*, spektrofotometer UV-Vis (Lambda EZ 201-Perkin Elmer) dan Hitachi F-4000. HPLC untuk analisis kualitatif digunakan Dionex P580A LPG, detektor Dionex, photoarray detector UVD 340S, autosampler ASI-100T, programme Chromelon Ver 6.3. Analisis kuantitatif menggunakan seperangkat Agilent 1100 HPLC Series (Waldbronn, Germany) detektor Photo Diode Array (DAD), auto sampler dan Agilent Chem Station Plus for LC 2002. Kolom digunakan LiChrospher 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ; Cat. 1.50983, E.Merck, Darmstadt, Germany). Ultipor N (Pall, Washington, USA 0, 45  $\mu\text{m}$ ) digunakan untuk menyaring fase mobil.

## 4.3 Kultivasi jamur endofit pada kultur *in-vitro*

Jamur endofit diambil satu  $\check{\text{O}}$ se dari kultur persediaan, ditumbuhkan dalam media *malt extract* agar selama 7 hari sebagai inokulum. Kultivasi massal jamur endofit dilakukan dalam Erlenmeyer 300 ml, yang masing-masing mengandung 40 ml media cair (*Malt extract* 15 gram per liter air) dengan pH awal 6,5. Jamur dikultivasi dalam kondisi gelap, pada suhu kamar selama 4 minggu.

## 4.4 Penentuan kadar metabolit utama secara HPLC

### 4.4.1 Optimasi kondisi kromatografi asam kojat

Analisis kadar asam kojat diawali dengan optimasi kondisi kromatografi, ditentukan waktu retensi, banyaknya pelat (N), faktor asimetri, resolusi dan selektifitas. Kondisi kromatografi dioptimasi dengan kolom LiChrospher 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ; Cat. 1.50983, E.Merck) dengan mengubah-ubah eluen antara lain: metanol-dapar fosfat, asetonitril-metanol-dapar fosfat dan metanol-dapar natrium heksan sulfonat pada berbagai perbandingan dan suhu kolom. Kecepatan alir digunakan 1 mL/menit.

#### 4.4.2 Pembuatan natrium heksan sulfonat 0,05 M pH 2,4

Ditimbang Natrium heksan sulfonat 4,7125 g dan 0,345 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  dilarutkan air suling steril 400 mL, ditambah  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% diatur pH nya hingga 2,4 dan ditambah air suling steril hingga 500 mL diaduk dan disaring sebelum digunakan.

#### 4.4.3 Pembuatan larutan baku asam kojat

Larutan baku induk dibuat dengan menimbang asam kojat 50 mg, dilarutkan dalam labu ukur 50,0 ml dengan pelarut fase mobil (1000  $\mu\text{g}/\text{m}$ ). Dibuat seri pengenceran dari larutan induk hingga didapatkan konsentrasi 2, 4, 10, 15, 30 hingga 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Penimbangan baku dilakukan minimal dua macam untuk mencegah kesalahan (Yuwono and Indrayanto, 2005).

#### 4.4.4 Validasi metode analisis kromatografi dengan HPLC

Selektivitas metode dinyatakan oleh identifikasi dan uji kemurnian puncak analit, dianalisis menggunakan software sistem pada rentang  $\lambda$  210 nm hingga 400 nm. Validasi metode dilakukan terhadap selektivitas, linieritas, akurasi, limit deteksi dan limit kuantitasi, presisi dan rentang kadar (Yuwono and Indrayanto, 2005).

#### 4.4.5 Pembuatan inokulum untuk beragam kondisi fermentasi

Kultur induk *Lecythophora sp.* strain 30.1 dan 30.5 dalam media *malt extract* agar berumur tujuh hari diambil satu  $\ddot{\text{O}}\text{se}$  ditumbuhkan dalam 10 mL. media cair *malt extract* dalam tabung. Kultur cair dalam tabung tersebut dikocok 100 rpm dengan *rotary shaker* pada suhu kamar selama tiga hari. Selanjutnya seluruhnya dituang dan digunakan sebagai inokulum pada *seed culture* yaitu kultur yang terdiri dari 50 mL media cair *malt extract* dalam Erlenmeyer 300 mL yang dikocok 100 rpm juga selama tiga hari. *Seed culture* ini sebagai inokulum fermentasi dengan berbagai media setelah diukur *optical density*-nya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm hingga didapat *Transmittance* 25 %. Pengukuran jumlah sel dalam inokulum dilakukan secara *plating*. *Seed culture* yang digunakan inokulum fermentasi dipipet 1,0 ml diencerkan berurutan dari  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  s/d  $10^{-6}$  dalam tabung yang berisi air suling steril. Masing-masing

pengenceran tsb dipipet 1,0 mL untuk ditanam pada media padat *malt extract* agar dalam cawan petri dan diinkubasi selama tiga hari selanjutnya dihitung koloni yang tumbuh pada masing-masing cawan petri (Lim, 1998).

#### 4.4.6 Penentuan kadar asam kojat hasil fermentasi dengan beragam media

Media cair *Malt extract* (pH 5,4), *Saboroud* (pH 5,6), *Potato Dextrose Broth* (pH 5,6) dan *Czapex* (pH 5,6) dibuat dua liter yang kemudian dibagikan ke-tiap Erlenmeyer masing masing 40 mL dan disterilkan. Ke dalam tiap Erlenmeyer ditambahkan 10 mL inokulum *Lecytophora sp.* strain 30.1 dan 30.5 *seed culture* dengan Transmittan 25 % seperti yang telah disiapkan pada pembuatan inokulum. Kultur jamur difermentasi pada suhu kamar secara kultur diam (*static culture*). Pada tiap minggu masing-masing *Lecytophora sp.* strain 30.1 dan 30.5 dari tiap media dilakukan sampling tiga sampel untuk ditentukan kadar metabolit utama (asam kojat), pH kultur dan berat massa sel.

#### 4.4.7 Penyiapan sampel untuk analisis kuantitatif asam kojat

Kaldu fermentasi dipisahkan dari massa sel melalui penyaringan dengan Büchner. Dipipet 1,0 ml diencerkan dengan fase mobil dalam labu ukur 10,0 ml dan disaring dengan Ultipor N 0,45  $\mu\text{m}$ , bila perlu diencerkan lagi hingga konsentrasi metabolit berada dalam rentang kurva baku. Melalui perbandingan luas area sampel terhadap persamaan linier kurva baku, konsentrasi sampel diketahui. Kandungan asam kojat dinyatakan dalam  $\mu\text{g}$  / liter, pH kultur diukur dengan pH-meter dan dinyatakan dalam satuan angka pH. Pertumbuhan jamur diukur secara gravimetri dengan menimbang berat sel kering setelah dikeringkan pada suhu 50 °C selama 48 jam dinyatakan dalam mg.

#### 4.4.8 Optimasi kondisi fermentasi

##### 4.4.8.1 Pengaruh pH pada kadar asam kojat dalam fermentasi *Lecytophora sp.* strain 30.5 dengan media produksi 1

Pengaruh pH 5 dan 3,5 terhadap kadar asam kojat yang dihasilkan *Lecytophora sp.* strain 30.5 dalam media produksi 1 yang terdiri glukosa 100 g, *yeast extract* 5 g,

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g dan  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g per liter (Rosfarizan, 2000) diukur secara HPLC. Erlenmeyer 1000 mL diisi 400 mL media. diinokulasikan 100 mL *seed culture* dengan *Transmittance* 25 % pada suhu kamar dikultivasi secara kultur diam (*static culture*). Sampling dilakukan setiap minggu, dianalisis kadar asam kojat, pH dan berat massa sel.

#### **4.4.8.2 Pengaruh pengocokan terhadap kadar asam kojat dalam fermentasi**

##### ***Lecythophora sp.* strain 30.5 dengan media produksi 2**

Media produksi 2 dibuat dari glukosa 50 g, *yeast extract* 5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g dan  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g per liter (Ariff, 1996) dengan pH 5,6 masing-masing 40 mL diisikan ke dalam Erlenmeyer 300 mL ditutup dan disterilkan. Inokulum *seed culture Lecythophora sp.* strain 30.5 dengan *Transmittance* 25 % diinokulasikan 10 mL selanjutnya difermentasi pada suhu kamar dengan pengocokan 100 rpm dan sebagian tanpa pengocokan. Pada tiap dua hari masing-masing perlakuan dilakukan sampling, dianalisis kadar asam kojat, pH dan berat massa sel kering.

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Kultivasi dan Ekstraksi Metabolit Jamur Endofit

Kultivasi 32 L *Lecythophora* sp. strain 30.1 didapatkan 10.36 g ekstrak etil asetat dan dengan biomassa kering 44,54 g didapatkan 1,87 g ekstrak n-heksan dan 2,09 g ekstrak n-butanol. *Lecythophora* sp. strain 30.5 dari 30 L dihasilkan 9.93 g ekstrak etil asetat dan dengan biomassa kering 60,73 g diperoleh 2,65 g ekstrak heksan dan 2,94 g ekstrak butanol.

Kultivasi dilakukan dalam malt extract cair pH 6,5 pada suhu kamar sebagai kultur diam. Disebutkan di pustaka, waktu inkubasi dua hingga enam minggu namun dalam hal ini dilakukan selama 4 minggu, (Ebel, 2003; Pulici *et.al.*,1997). Hal ini didasarkan asumsi pembentukan metabolit umumnya terjadi pada fase stationer dan ditinjau dari pertumbuhan *Lecythophora* sp. pada penelitian sebelumnya, fase stationer dicapai pada minggu ke-empat, sehingga dipilih waktu kultivasi 4 minggu.

Ekstraksi dilakukan dengan berbagai pelarut yang memiliki kepolaran berbeda-beda dengan asumsi beragam senyawa metabolit yang dihasilkan dapat terekstraksi dengan pelarut penyari yang digunakan (Marjorie, 1999).

#### 5.2 Penentuan Kadar Metabolit Utama *Lecythophora* sp 30.1 dan 30.5 (Asam Kojat) Pada Berbagai Kondisi Fermentasi

##### 5.2.1 Optimasi Kondisi Analisis Kadar Asam Kojat dengan HPLC

Analisis asam kojat dilakukan dengan kolom LiChrospher 100 RP-18, eluen metanol : dapar natrium heksan sulfonat 0,05 M pH 2,4 (15:85) (v/v) suhu kolom 20<sup>0</sup>C. Kecepatan alir 1 mL/menit dengan detektor Diode Array pada  $\lambda$  260 dan 280 nm. Volume baku maupun sampel yang disuntikkan 5  $\mu$ l. Didapatkan waktu retensi (tr)

3,336 menit, faktor simetri 0,68, jumlah pelat teoritis (N) 2956, resolusi 2,96 dan selektivitas 1,31 (Lampiran 1).

### 5.2.2 Validasi Metode Analisis Kadar Asam Kojat dengan HPLC

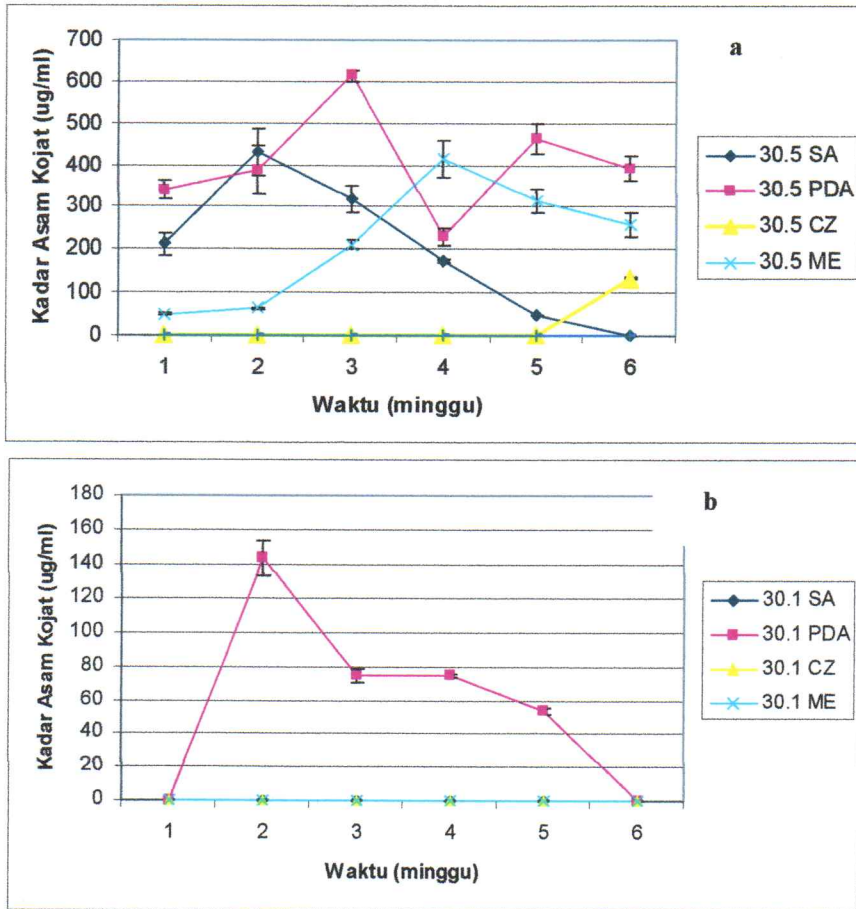
Hasil validasi metode asam kojat (HPLC) dirangkum dalam Tabel 5.1 Kendala optimasi analisis asam kojat secara HPLC ini, puncak yang tailing, kondisi kromatografi optimal dengan kolom LiChrospher 100 dan validasinya memenuhi persyaratan.

Tabel 5.1 Validasi metode analisis asam kojat dengan HPLC

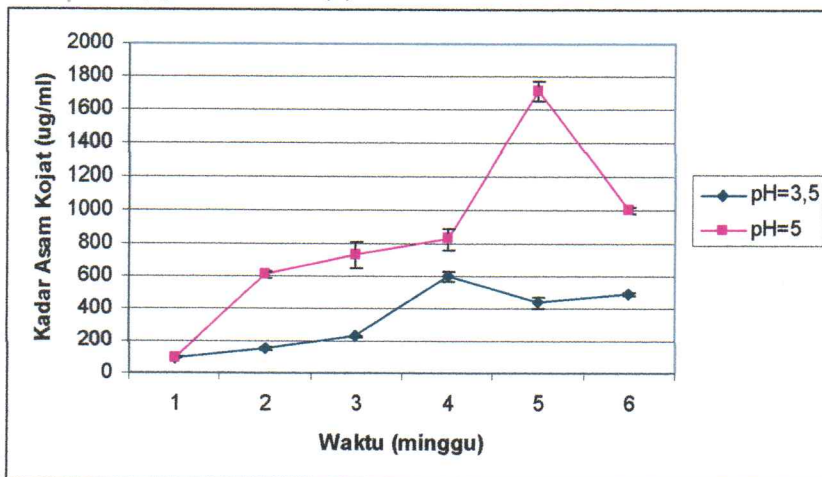
Parameter Validasi	Hasil yang diperoleh	Kriteria yang diterima (Yuwono & Indrayanto, 2005)
Selektivitas	1,31 dengan MF 999 dan PF 997, faktor simetri 0,68, N=2956	1,05–2,00, MF dan PF > 990, faktor simetri >0,50, N>2000
Resolusi	2,96	> 1,5
Linieritas (Korelasi)	r=0,99997, $V_{x_0}$ 1,5%, $X_p$ <8,4	r>0,999, $V_{x_0}$ <5%, $X_p$ <Kadar terkecil
Akurasi	91,7-104,5% (recovery), membran filter tidak menyerap asam kojat	90 –110 % (sampel biologis)
LOD dan LOQ	0,120 dan 0,360 $\mu$ g/ml.	
Presisi	5,48 %	10 – 15 % (sampel biologis)
Kestabilan analit dalam penyimpanan	93,15 % (42 hari)	Analog akurasi 90 –110 % (sampel biologis)

### 5.2.3 Kadar Asam Kojat *Lecythophora* sp. strain 30.1 dan 30.5 dalam media Malt extract (ME), Saboroud (SA), Potato Dextrose (PDA), Czapek (Cz) dan berbagai kondisi fermentasi

Kadar asam kojat *Lecythophora* sp. strain 30.1 dan 30.5 dalam 4 media disajikan di Gambar 5.1 dan Lampiran 2 Tabel 1. Hasil kadar asam kojat *Lecythophora* sp. strain 30.5 dalam media produksi 1 kondisi pH 5 dan pH 3,5 disajikan di Gambar 5.2 dan Lampiran 2 Tabel 2. Kadar asam kojat *Lecythophora* sp 30.5 dalam media produksi 2, dikultur dengan dan tanpa pengocokan disajikan di Gambar 5.3 - 5.4 dan Lampiran 2 Tabel 3.

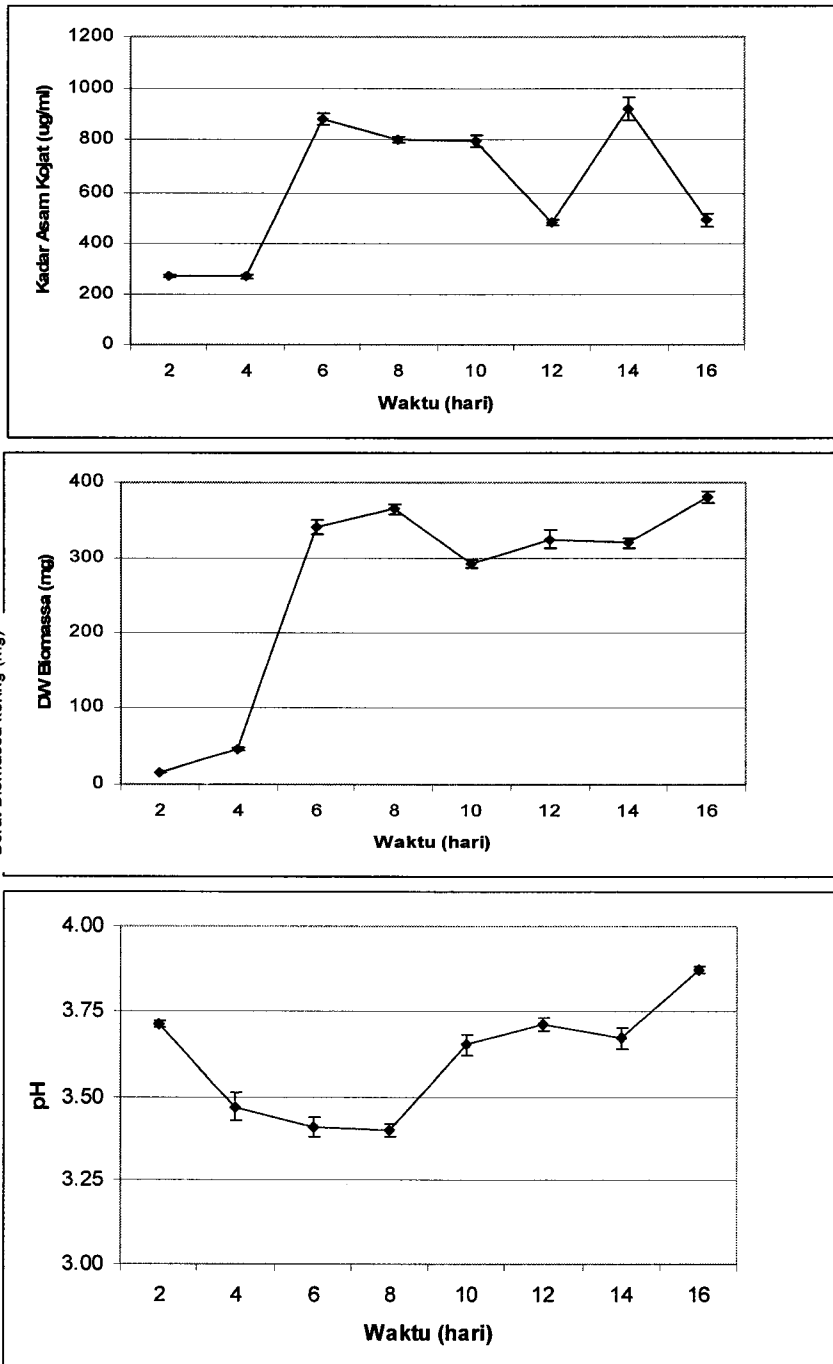


Gambar 5.1 Kadar asam kojat rata-rata (n=3) vs waktu (minggu) *Lecythophora* sp. strain 30.5 (a), strain 30.1(b) dalam 4 macam media.

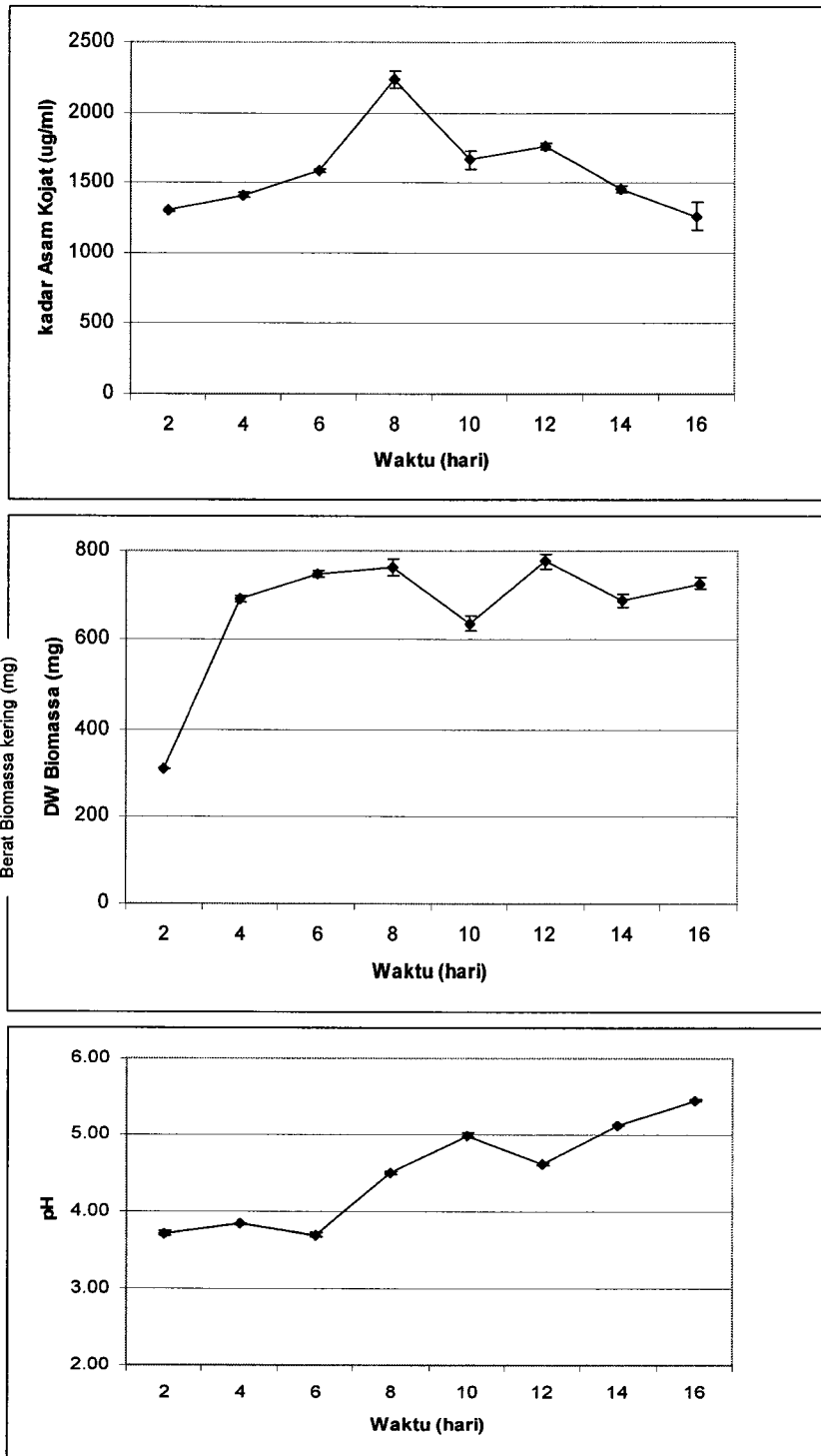


Gambar 5.2 Kadar asam kojat rata-rata (n=3) vs waktu (minggu) *Lecythophora* sp. strain 30.5 dalam media produksi 1 pada pH awal 5 dan 3,5.

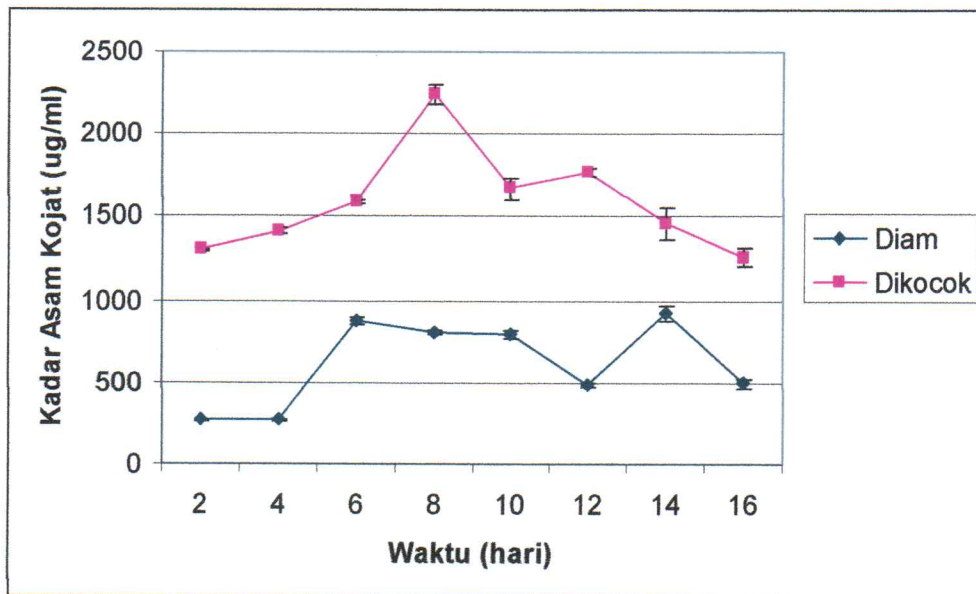




Gambar 5.3 Kadar asam kojat, berat biomassa sel kering dan pH (rata-rata pengukuran, n=3) vs waktu (hari) dari *Lecythophora* sp. strain 30.5 dalam media produksi 2 pH awal 5,6 dan tanpa pengocokan.



Gambar 5.4 Kadar asam kojat, berat biomassa kering dan pH (rata-rata pengukuran, n=3) *Lecythophora* sp 30.5 dalam media produksi 2 pH awal 5,6 dengan pengocokan.



Gambar 5.5 Kadar asam kojat rata-rata ( $n=3$ ) dari *Lecythophora* sp. strain 30.5 dalam media produksi 2 pH awal 5,6 dengan dan tanpa pengocokan.

Kadar asam kojat *Lecythophora* sp. strain 30.1 dan 30.5 di Lampiran 2 Tabel 1 dan Gambar 5.1 menunjukkan strain 30.1 hanya menghasilkan asam kojat dalam media PDA, sementara strain 30.5 memproduksi asam kojat pada media PDA, ME, SA dan Cz dan kadar tertinggi pada media PDA minggu ketiga.

Glukosa merupakan sumber karbon terbaik untuk produksi asam kojat, sebab asam kojat disintesis langsung dari glukosa sebagai jalur utama karena kemiripan strukturnya (Mohamad and Ariff, 2007), dalam hal ini glukosa digunakan sebagai sumber karbon pada media PDA dan SA. Asam kojat mulai diproduksi saat pertumbuhan mencapai stasioner, ditandai tidak ada peningkatan berat sel, tetapi dengan sumber karbon glukosa produksi sudah dimulai hari ke 2 (Mohamad *et al.*, 2002) dan berhenti bila glukosa dalam media habis (El-Aasar, 2006). Saat awal fermentasi glukosa dalam medium PDA diubah *Lecythophora* sp. menjadi asam kojat, setelah habis kemungkinan digunakan glukosa hasil hidrolisis amilum. Medium Saboroud terdiri dari glukosa dan pepton, memberi hasil kadar asam kojat yang tinggi pada minggu kedua tapi kemudian menurun. Pada media malt extract sumber karbon dari karbohidrat kompleks malt, dibutuhkan lebih lama untuk mengubahnya menjadi asam kojat. Sumber karbon

Czapek adalah sakarosa, dalam media ini pertumbuhan sel *Lecythophora* sp kurang optimal terlihat dari rendahnya berat sel kering, namun tetap dapat diproduksi asam kojat.

*Lecythophora* sp 30.5 terbukti dapat menggunakan berbagai jenis sumber karbon untuk fermentasi asam kojat seperti glukosa (PDA dan SA), amilum (PDA), sakarosa (Czapek), malt (ME). Berbagai jenis sumber karbon tersebut, ternyata glukosa memberi hasil tertinggi, diperoleh pada media PDA (Gambar 5.1). *Lecythophora* sp. strain 30.5 dapat melakukan fermentasi asam kojat dalam empat macam media (PDA, SA, ME, Cz) dengan kadar tertinggi  $615 \pm 14 \mu\text{g/ml}$  dalam PDA, strain 30.1 hanya melakukan fermentasi di satu macam media (PDA) dengan kadar tertinggi  $143 \pm 10 \mu\text{g/ml}$ .

Kemampuan *Lecythophora* sp. 30.5 menggunakan beragam sumber karbon termasuk amilum untuk fermentasi asam kojat mempunyai prospek ekonomi penting untuk diteliti dan dikembangkan sebagai media produksi asam kojat dalam skala besar. Amilum atau tepung merupakan sumber karbon yang murah dan mudah didapat. Dalam skala industri, asam kojat dapat diproduksi dari *Aspergillus* spp. dan *Penicellium* spp. (Rosfarizan *et al.*, 1998). Faktor yang harus diperhatikan pada penggunaan tepung sebagai media produksi yaitu viskositas, aerasi dan pH, sebab pH tidak hanya mempengaruhi pertumbuhan sel tetapi juga sekresi enzim amilolitik yang menghidrolisa tepung menjadi glukosa untuk disintesis menjadi asam kojat (Rosfarizan *et al.*, 1998).

Enzim untuk produksi asam kojat terikat pada sel (mengacu pada fermentasi *Aspergillus flavus*, Mohamad and Ariff, 2007), sehingga pertumbuhan sel mempengaruhi kondisi fermentasi. Pada sisi lain dapat pula terjadi pertumbuhan sel meningkat pesat tetapi kemampuan sel mengubah glukosa menjadi asam kojat rendah (Rosfarizan *et al.*, 2000).

*Lecythophora* sp. strain 30.5 memberi hasil asam kojat lebih baik pada empat macam media daripada strain 30.1. Telah diketahui, pada strain tertentu kemampuan produksi asam kojat ini tidak konsisten, hal ini terjadi pada *Aspergillus flavus* strain S33-2 (Rosfarizan *et al.*, 1998). Selanjutnya, pada penelitian ini optimasi kondisi fermentasi hanya dilakukan pada *Lecythophora* sp. strain 30.5. dengan pH awal 3,5 dan 5 dengan asumsi sistem enzim konversi asam kojat memiliki kemiripan dengan

penelitian Mohamad *et al.* (2002) dan El-Aasar (2006) yang dilaporkan optimal pada pH 3,5 dan 5. Pada pertumbuhan *A. flavus* link 44-1 pH kultur diatur 3,3–3,7 pH fase pertumbuhan ini merupakan salah satu titik kritis produksi asam kojat (Mohamad *et al.*, 2002). Diketahui pula bahwa pH awal 5 optimal untuk produksi asam kojat oleh *Aspergillus parasiticus* (El-Aasar, 2006). Dibutuhkan pH optimum untuk pertumbuhan sel jamur dan peningkatan sekresi sistem enzim untuk sintesis asam kojat, hal ini lebih sensitif daripada pH optimum untuk aktivitas dan stabilitas enzim pada waktu produksi (Mohamad *et al.*, 2002).

*Lecythophora* sp. strain. 30.5 pada pH awal 5 menghasilkan asam kojat lebih tinggi ( $1710 \pm 60$ )  $\mu\text{g/ml}$  dibandingkan pH awal 3,5 ( $597 \pm 29$ )  $\mu\text{g/ml}$ . *Lecythophora* sp. strain 30.5 terbukti tumbuh dan menghasilkan asam kojat lebih baik pada pH 5 daripada 3,5 hal ini didukung data berat sel kering. Pada kedua percobaan fermentasi (pH awal 5 dan 3,5), pH media yang diukur waktu sampling menjadi sangat asam, rata-rata sekitar pH 3, hal ini juga terjadi pada *A. flavus*. Penurunan pH ini kemungkinan akibat akumulasi asam kojat dan asam organik yang lain seperti asam oksalat, suksinat, laktat, asetat, dan sitrat yang juga diproduksi selama fermentasi. Pada kondisi kadar glukosa menurun, asam kojat dipecah menjadi asam oksalat dan asetat (Rosfarizan, 2000). Pengaruh pH terhadap kultur dipengaruhi juga oleh jenis sumber karbon dan nitrogen yang digunakan (El-Aasar, 2006). Sumber nitrogen berpengaruh pada efektivitas fermentasi asam kojat, yeast extract dan pepton memberi hasil lebih baik daripada amonium sulfat dan amonium nitrat (El-Aasar, 2006). Glukosa sumber karbon terbaik untuk produksi asam kojat, untuk itu digunakan media produksi 1 yang mengandung glukosa 100 g/L (Rosfarizan, 2000) secara *static culture* dengan pH awal 3,5 dan 5 pada suhu kamar.

Kadar asam kojat *Lecythophora* sp. relatif kecil pada pH 3,5 maupun 5, kemungkinan karena pH kultur tidak sesuai untuk sekresi enzim dan tidak optimum untuk aktivitas enzim yang terlibat dalam jalur metabolik asam kojat.pada spesies ini. Kemungkinan kedua pH kultur menyebabkan pemecahan asam kojat yang berlebihan dan ketiga glukosa yang ada lebih digunakan untuk pertumbuhan, sehingga jumlah yang dikonversi ke asam kojat menjadi kecil (Rosfarizan, 2000). Faktor kelemahan *static*

*culture* yang digunakan, medium menjadi kurang dapat bereaksi secara homogen, kemungkinan juga menjadi penyebab kecilnya hasil.

Digunakan dua macam pH merupakan alternatif meningkatkan hasil produksi, misalnya selama fase pertumbuhan pH diatur tertentu sehingga pertumbuhan sel cukup baik, tapi selama fase produksi pH dipertahankan 3. Pada *A. flavus* cara ini menghasilkan asam kojat 31,23 g/l (Mohamad *et al.*, 2002). Pada *A. flavus* dengan pH awal bervariasi antara 4 sampai 7 diperoleh asam kojat antara 2,50 g/L hingga 19,20 g/L dan pH awal 3 didapatkan 30,20 g/L (Rosfarizan, 2000).

Kadar asam kojat *Lecytophora* sp. 30.5 pada media produksi 2 pH 5,6 kondisi dengan dan tanpa pengocokan ditentukan dengan HPLC, hasilnya produksi asam kojat dalam kondisi fermentasi statis *Aspergillus* sp. lebih efektif dari pada dalam labu dengan pengocokan (Ariff *et al.*, 1996, Aytemir *et al.*, 2003, Lin *et al.*, 1976). Umumnya jamur berfilamen mempunyai pH optimum 5-6 untuk tumbuh dan menjalankan aktivitas metaboliknya (Rosfarizan, 2000). Kedua hal diatas mendasari penelitian ini untuk membandingkan kondisi statis dan dikocok, pH media dibuat 5,6 dengan pertimbangan bahwa pH 5 dan 3,5 tidak memberikan hasil asam kojat yang cukup tinggi.

Produksi tertinggi asam kojat *Lecytophora* sp. strain 30.5 mencapai  $(2238 \pm 62)$   $\mu\text{g/ml}$  dengan pengocokan 100 rpm selama delapan hari, dalam kondisi tanpa pengocokan mencapai  $(920 \pm 46)$   $\mu\text{g/ml}$  dalam media produksi 2 yaitu glukosa 50 g/L, yeast extract 5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L pH 5,6 pada suhu kamar selama 14 hari. Kondisi dengan pengocokan memberi hasil asam kojat lebih tinggi dan dari waktu fermentasi lebih singkat, hal ini sejalan dengan penelitian menggunakan *A. parasiticus* yang kadar tertinggi dicapai 30,45 dan 34,38 g/l masing masing dari kultur diam dan dikocok. (El-Aasar, 2006).

Kecepatan agitasi tinggi dilaporkan dapat merusak sel miselium, struktur dan sistem enzim (Mohamad and Ariff, 2007). Pada *A. flavus* dengan sel miselia yang dihancurkan (*disrupted cell mycelia*) dan extract enzyme untuk konversi asam kojat yang dibuat dari sel miselia yang dihancurkan ternyata gagal mengubah glukosa menjadi asam kojat (Mohamad and Ariff, 2007). Hal ini menunjukkan bahwa enzim yang terlibat

dalam produksi asam kojat terikat sel, sehingga pertumbuhan sel mempengaruhi efektifitas fermentasi.

Kemungkinan peningkatan produksi asam kojat dapat ditempuh dengan menambahkan glukosa secara bertahap (*fed batch*) ke kultur fermentasi yang mengandung enzim untuk konversi asam kojat (Rosfarizan, 2000). Pada *A. flavus*\_link 44-1, dengan sago sebagai sumber karbon, cara *fed batch* memberikan hasil asam kojat 4 kali lebih tinggi dari pada *batch fermentation*, atau pilihan yang lain meningkatkan hasil dengan memberikan sumber karbon secara berkala (*intermittent fed-batch*) ke dalam kultur (Mohamad *et al.*, 2002; Mohamad and Ariff, 2007). Enzim untuk sintesis asam kojat stabil dalam waktu inkubasi yang lama dan pada kadar glukosa yang tinggi hingga 200 g/L, mengindikasikan reaksi enzim tidak dihambat oleh konsentrasi glukosa yang sangat tinggi, sesuai untuk *intermittent fed-batch* dan dapat menghasilkan produk asam kojat dengan kadar tinggi yaitu 45,3 g/l (Mohamad and Ariff, 2007). Produksi asam kojat tinggi hingga 80 g/l dilaporkan Kwak dan Rhee pada penggunaan sel amobil *A. oryzae* dengan *repeated batches fermentation* namun diperlukan waktu produksi yang lebih lama (Rosfarizan and Ariff, 2007). Pada *A. flavus* link 44-1 diketahui bahwa sistem enzim yang terikat pada sel stabil bila diresuspensikan dengan bufer dengan pH yang beragam (Rosfarizan and Ariff, 2007; Ariff *et al* 1996). Hal ini dimanfaatkan mengatasi masalah pigmen pengotor yang perlu dimurnikan pada fermentasi asam kojat secara konvensional, dengan menggunakan sistem *resuspended cel*, biaya pemurnian dapat ditekan (Mohamad and Ariff, 2007).

Perbedaan spesies dan strain tentu juga mempengaruhi produksi asam kojat. *Lecythophora* sp yang digunakan dalam penelitian ini, merupakan jamur endofit yang tumbuhnya relatif lama dan *wild strain* tanpa pengembangan melalui manipulasi genetika, kadar metabolit asam kojat yang dihasilkan relatif kecil. Hal ini disadari karena umumnya isolat mikroorganisme alami menghasilkan produk metabolit dalam konsentrasi yang sangat rendah (Stanbury and Whitaker, 1984). Peningkatan hasil dapat dicapai dengan melakukan optimasi media kultivasi dan kondisi pertumbuhan tetapi pendekatan ini dibatasi oleh kemampuan maksimal organisme untuk mensintesa metabolit. Potensi produktivitas organisme diatur oleh genomnya, untuk meningkatkan

potensi hasil haruslah dilakukan modifikasi genome mikroorganisme atau dilakukan seleksi genotip unggul terhadap kultur yang ada. Proses pemberdayaan strain unggul meliputi modifikasi genetik terhadap berbagai sifat yang mempengaruhi produksi secara berkelanjutan, dievaluasi hasil yang dicapai dan keunggulan tersebut harus dapat terus dipertahankan (Stanbury and Whitaker, 1984).



## BAB VI.

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### KESIMPULAN

Produksi tertinggi asam kojat *Lecythophora sp.* strain 30.5 mencapai  $(2238 \pm 62)$   $\mu\text{g/ml}$  dalam media glukosa 50 g/L, yeast extract 5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L pH 5,6 pada suhu kamar dengan pengocokan 100 rpm selama delapan hari.

#### SARAN

Jamur endofit lain yang telah berhasil diisolasi dari *Alyxia reinwardtii* BL memiliki peluang dan prospek untuk diteliti lebih lanjut dan dikembangkan sebagai sumber bahan obat berkhasiat antimikroba dan beragam aktivitas biologis yang lain.

**DAFTAR PUSTAKA**

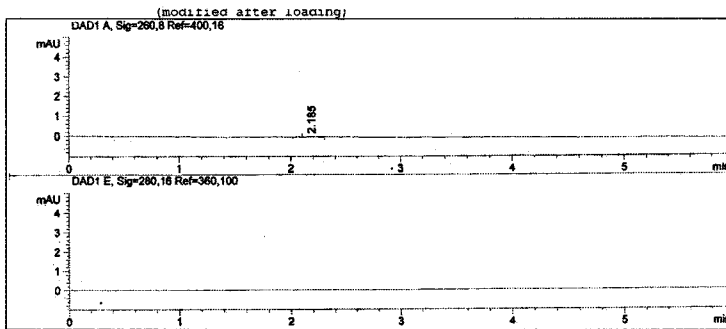
- Achmad, S.A., Hakim, E.H., Makmur, L., Yuliawati, L.D., Syah, Y.M., 2003. Ilmu Kimia dari Keanekaragaman Hayati Indonesia, Simposium Nasional Kimia Bahan Alam XIII, Bandung.
- Ariff, A.B., Salleh, M.S., Ghani, B., Hassan, M.A., Rusul, G., Karim, M.I.A., 1996. Aeration and Yeast Extract requirements for Kojic Acid Production by *Aspergillus flavus* Link, *Enzyme Microb. Technol.* 19, 545-550.
- Aytemir, M.D, Erol, DD., Hider, R.C, Özalp, M., 2003. Synthesis and evaluation of anti microbial activity of new 3 Hidroxy-6-methyl-4-oxo-4H-pyran-2-carboxamide derivatives. *Turk J. Chem* 27, 757-764.
- Bacon, C.W 1988. Procedure for Isolating the endophyte from *Tall fescue* and screening isolates for Ergot Alkaloids. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 11 p 2615-2618.
- Bidlingmeyer, B.A., 1992. *Practical HPLC Methodology and Applications*, John Wiley& Sons, Inc New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Brunner, F. and Petrini, O., 1992. Taxonomy of some *Xylaria sp.* and Xylariceous Endophytes by Isozime Electrophoresis. *Mycol. Res.* 96: 723 – 733.
- Bugos, R.C., Sutherland, J.B., and Adler, J.H., 1988. Phenolic Compound Utilization by the soft rot fungus *Lecythophora hoffmannii*, *Appl. Environ. Microbiol.* 54,7, 1882-1885.
- Demain, A.L. and Solomon, N.A., 1986. *Manual of industrial microbiology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Dreyfuss, M.E, Hoffman, H.H, Kobel, H, Pache, W, Tsecherter, H., 1986. Cyclosporin A and C: New Metabolites from *Trichoderma polysporum* ( Link Experts ) Rifai. *Appl. Environ. Microbiol.* 3, 125 – 133.
- Ebel R., 2003. Heinrich Heine Institute of Pharmaceutical Biology, **University of Duesseldorf Germany**. Personal communications.
- El-Aasar, S.A., 2006. Cultural Conditions Studies on Kojic Acid Production by *Aspergillus parasiticus*. *Int. J. Agri. Biol.*, 8, 4, 468-473.

- Harborne, JB, 1987, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Edisi kedua, Diterjemahkan: Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro, Penerbit ITB Bandung.
- Huang, S.C, Lin, C. C, Huang, M. C., Wen, K.C., 2004. Simultaneous determination of Magnesium Ascorbyl Phosphate, Ascorbyl Glucoside, Kojic acid, Arbutin and Hydroquinone in Skin Whitening Cosmetics by HPLC. *J. Food Drug Anal.* 12, 1, 13-18.
- Kitagawa I, Shibuya H, Beak NI, Yokokawa Y, Nitta A, Wiriadinata H, Yoshikawa M. (1988) Pulosarioside, a new bitter trimeric-iridoid diglucoside, from an Indonesian jamu the bark of *Alyxia reinwardtii* BL. Apocynaceae. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 36, 4232-4235.
- Marjorie, M.C. 1999. *Plant products as antimicrobial agents*. *Clinical Microbiology Review*, 12 (4). p.564-582
- Morris, K.N., 2001. Endophytic fungi offer several advantages to grasses. However advances in this field are hard to come maintenance good infection. <http://grounds-mag.com/ar/grounds>. Tgl diakses 23 Maret 2003
- Mohamad, R., and Ariff, A..B., Hassan, M.A., Karim, M.I.A., Shimizu, H., Shioya, S., 2002. Importance of Carbon Source Feeding and pH Control Strategies for Maximum Kojic acid Production from Sago Strach by *Aspergillus flavus*. *J. Biosci. Bioeng.* 94,2, 99-105.
- Mohamad R., and Ariff, A.B., 2007. Biotransformation of various carbon sources to kojic acid by cell bound enzyme of *Aspergillus flavus* Link 44-1, *Biochem. Eng. J.* 35, 203 –209
- Moore, B.S., and Hertweck, C., 2002. Biosíntesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Nat. Prod. Rep.* 19, 70 – 99.
- Petrini, O., Sieber, T. N., Toti, L. and Viret, O., 1992. Ecology metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat. Toxins*, 1, 185 -196.
- Proksch, P., Edrada, R.A., and Ebel, R., 2003 a. Review: Drugs from the Sea – Opportunities and Obstacles. *Mar. Drugs* 1, 5-17.

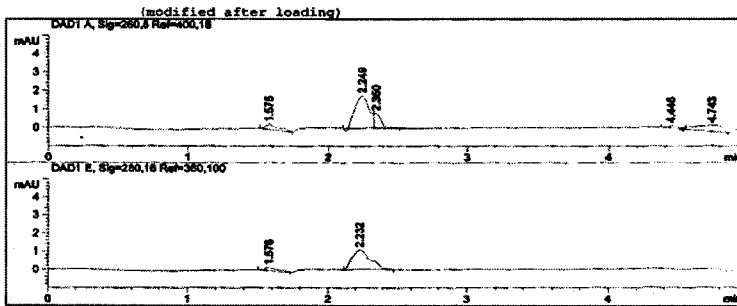
- Proksch, P., Ebel, R., Edrada, R.A., Schupp, P., Lin, W.H., Sudarsono, Wray V., Steube, K., 2003 b. Detection of pharmacologically active natural products using ecology. Selected examples from Indopacific marine invertebrates and sponge-derived fungi. *Pure Appl. Chem.*, 75, 2-3, 343-352.
- Pulici, M., Sugawara, F., Koshino, H., Okada, G., Esumi, Y., Uzawa, J., Yoshida, S., 1997. Metabolites of *Pestalotiopsis spp.* Endophytic fungi of *Taxus braevifolia*, *Phytochemistry*, 46, 2, 313-319.
- Puri, S.P., Verma, V., Amna, T., Qazi, G.N., 2005. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces Camptothecin. *J. Nat. Prod.* Published on Web 00/00/0000 page est 2,6
- .Puri, S.C., Nazir, A., Chawla, R., Arora, R., Hasan, S.R., Amna, T., Ahmed, B., Verma, V., Singh, S., Sagar, R., Sharma, A., Kumar, R., Sharma, R.K., Qazi, G.N., 2006. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. *J. Biotechnol.*, 122, 494-510.
- Rayner ADM, 1991. The challenge of the individualistic mycelium. *Mycologia* 83: 48 – 71.
- Rosfarizan, M., Mahidah, S., Ariff, A.B., 1998. Isolation of a kojic acid – producing fungus capable of using starch as a carbon source. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 27-30.
- Rosfarizan, M., and Ariff, A.B., Hassan, M.A., Karim, M.I.A , 2000. Influence of pH on Kojic Acid Fermentation by *Aspergillus flavus*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 3, 6, 977-982.
- Stanbury, P.F., and Whitaker, A., 1984. *Principles of Fermentation Technology*, Pergamon Press. Oxford, New York, Toronto, Sidney, Paris, Frankfurt.
- Steffan, B., 2006. *Inhaltsstoffe aus Pflanzen der indonesischen Volksmedizin (Jamu): Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften.* Inaugural-Dissertation zue Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Stierle, A., and Strobel, G., 1995. The search for a Taxol producing microorganism among the endophytic fungi of the Pasific Yew, *Taxus brevifolia*. *J. Nat. Prod.* 58, 9, 1315-1324.
- Sugijanto, N. E., Diesel A., Ebel R., Indrayanto, G., Cholies, N., 2009, Chemical Constituents of the Endophytic Fungus *Lecythophora* sp. Isolated from *Alyxia reinwardtii*, *Natural Product Communications*, 4, 2009
- Strobel, G., and Daisy, B., 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 4, 491-502.
- Tan, R.X., and Zou, W.X., 2001, Endophytes a rich source of fungsional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18, 448 – 459.
- White, J.F., Reddy, P.V., Bacon, C.W., .2000. Biotrophic endophytes of grasses a systematic appraisal. In Bacon C.W., White J.F. Jr., (Eds) *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker, Inc. 49 - 62.
- Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrunsi, N., Meevootisom, V., 2004. Endophytic fungi with antimicrobial, anti cancer and anti malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 3, 265 - 272.
- Yuwono, M., Indrayanto, G., 2005. Validation method of analysis by using Chromatography, *Profiles of Drugs Substances, Excipients and Related Methodology*, Vol. 32, Elsevier Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. 243-258.
- Zeringue, H.J. Jr., Shih, B.Y., 1998. Extraction and separation of the bright-greenish-yellowish fluorescent material from aflatoxigenic *Aspergillus* sp. Infected cotton lint by HPLC-UV/FL. *J. Agric. Food Chem* 46, 1071-1075.

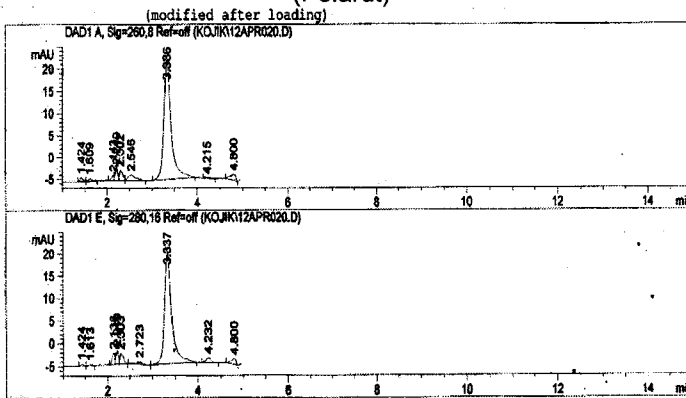
Lampiran 1  
Selektivitas analisis asam kojat



(Blanko)



(Pelarut)



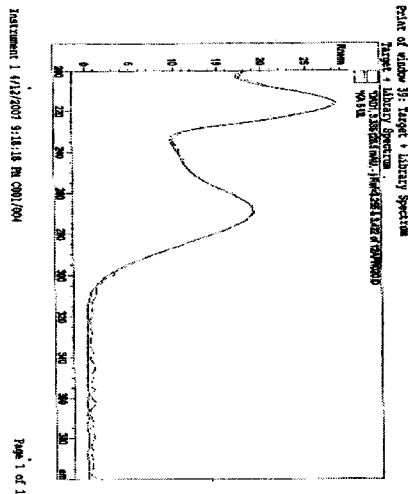
RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Selectivity
1.424	-	3.81359	9.37128e-1	0.83	0.0630	2828	-	-
1.609	-	2.55435	6.02362e-1	0.90	0.0719	2779	1.61	1.13
2.143	-	5.00383	1.19810	2.47	0.0593	7229	4.78	1.33
2.219	-	10.76575	2.86485	1.29	0.0632	6834	0.72	1.04
2.302	-	12.61102	2.40674	0.43	0.0826	4303	0.67	1.04
2.546	-	16.57884	1.32765	0.67	0.1693	1252	1.14	1.11
3.336	-	304.30392	27.19899	0.68	0.1444	2956	2.96	1.31
4.215	-	1.36627	2.09459e-1	0.50	0.1022	9421	4.19	1.26
4.800	-	10.59389	1.37016	2.19	0.1675	4550	2.55	1.14

Lampiran 1 (lanjutan) Kemurnian puncak (Match Factor = MF dan Purity Factor = PF ) pada validasi parameter selektivitas

Library search results

#	Match	Entry	Time (min)	ID	ID Name
1	999.2748	1	3.334	0	KOJIK

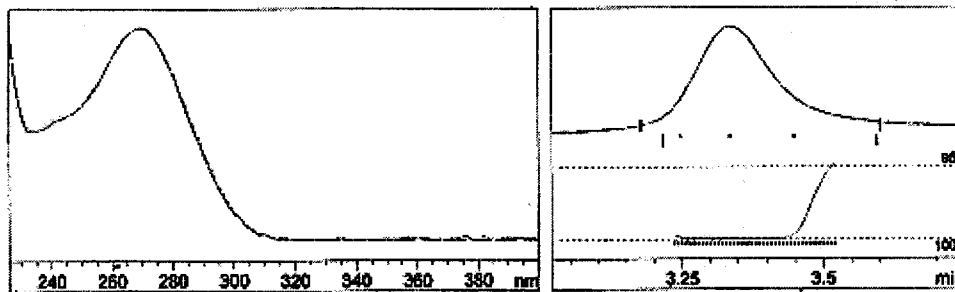
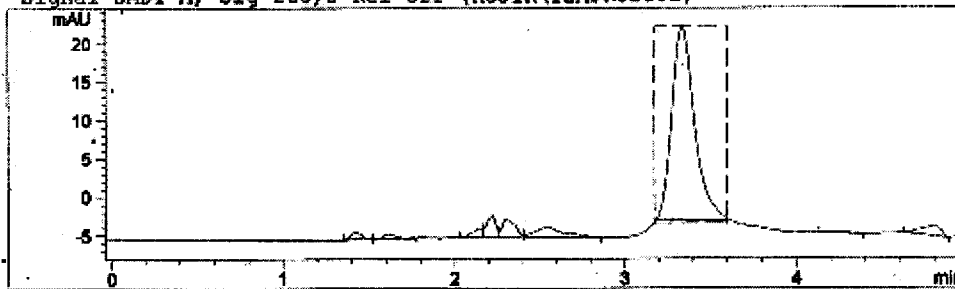
\*\*\* End of Report \*\*\*



Lampiran 1 lanjutan

Purity results peak 7 at 3.336 min.

Signal DAD1 A, Sig=260,8 Ref=off (KOJIK\12APR02G.D)



-> The purity factor is within the threshold limit. <-

Purity factor : 997.115 (42 of 44 spectra are within the threshold limit.)  
 Threshold : 950.000 (Set by user)  
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (3.215 / 3.595)  
 Spectra : 3 (Selection automatic, 3)

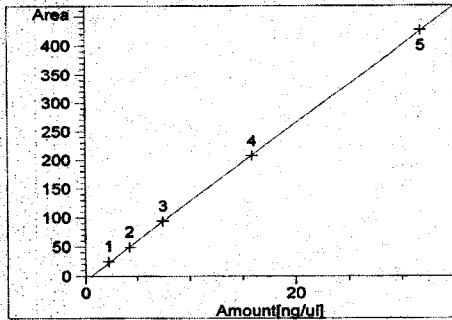
Lampiran 1 (lanjutan). Linearitas dan Kurva baku kojic acid

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [ng/ul]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
3.355	1	2.24000	24.74231	9.05332e-2	KOJIK Ac
	2	4.28000	49.42196	8.66012e-2	
	3	7.46000	93.90945	7.94382e-2	
	4	15.90000	207.57857	7.65975e-2	
	5	31.80000	425.96704	7.46537e-2	

Peak Sum Table

\*\*\*No Entries in table\*\*\*

Calibration Curves



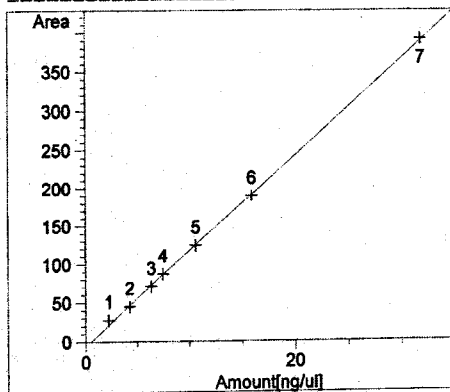
KOJIK Ac at exp. RT: 3.355  
 DAD1 A, Sig=260,8 Ref=400,16  
 Correlation: 0.99997  
 Residual Std. Dev.: 1.53024  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 13.61324  
 b: -7.60903  
 x: Amount [ng/ul]  
 y: Area

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [ng/ul]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
3.366	1	2.24000	27.04539	8.28237e-2	Kojic Acid
	2	4.28000	44.69460	9.57610e-2	
	3	6.36000	70.60587	9.00775e-2	
	4	7.48000	86.76392	8.62109e-2	
	5	10.60000	124.19550	8.53493e-2	
	6	15.90000	189.36099	8.39666e-2	
	7	31.80000	391.05527	8.13184e-2	

Peak Sum Table

\*\*\*No Entries in table\*\*\*

Calibration Curves



Kojic Acid at exp. RT: 3.366  
 DAD1 E, Sig=280,16 Ref=off  
 Correlation: 0.99974  
 Residual Std. Dev.: 3.14384  
 Formula:  $y = mx + b$   
 m: 12.44696  
 b: -6.47943  
 x: Amount [ng/ul]  
 y: Area



???????????????

X	Y
2.24000	31.84818
4.28000	62.14923
7.46000	116.44720
15.90000	264.04260

???????????????

Method : Linearity  
 Probability : 95%  
 Number of data : 4  
 Line equation :  $Y = -9.31710400 + 17.12703000X$   
 Corelation coefficient : 0.99974400  
 Sy value : 2.85611200  
 Vx0 value : 2.23240300%  
 Xp value : 1.26181700

The **Corelation coefficient** is fullfilled the requirement ( > 0.99 )  
 The **Vx0 value** is fullfilled the requirement ( 0% to 5% )  
 The **Xp value** is **OK** ( < 2.24000000 )

Lampiran 1 (lanjutan) Perhitungan harga LOD dan LOQ

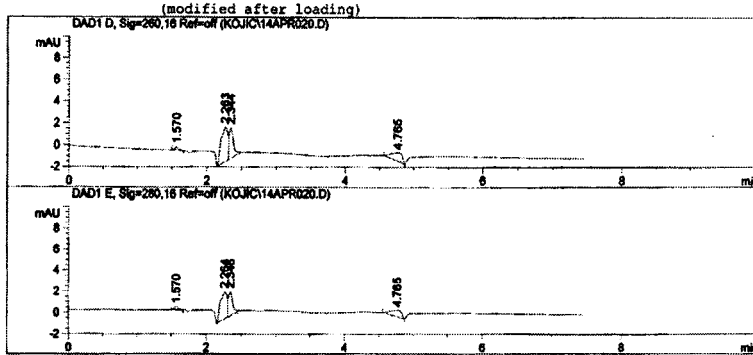
?????????????????

X	Y
1.50000	17.24596
1.12000	13.42497
0.74600	7.98108
0.56000	6.25238
0.37300	4.14294
0.28000	3.19315
0.18600	1.80487
0.14000	1.19718

?????????????????

Method : DL - QL  
 Number of data : 8  
**DL value** : **0.12016490 ppm**  
**QL value** : **0.36049480 ppm**

Lampiran 1 (lanjutan). Akurasi



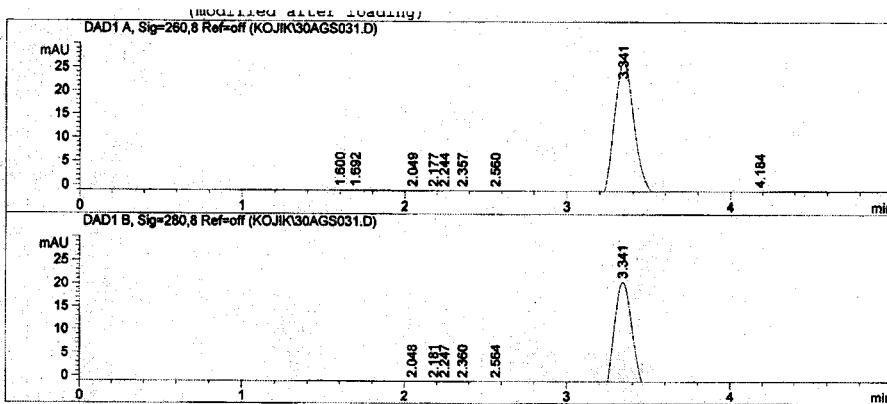
External Standard Report with Performance

Calib. Data Modified : 4/14/2007 4:34:26 PM  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 D, Sig=260,16 Ref=off  
 Signal 2: DAD1 E, Sig=280,16 Ref=off  
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Sig	Amount [ng/ul]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Name
3.366	-	1	20.71265	0.00	-	-	-	Kojic Acid

Kromatogram HPLC dari kertas saring bekas yang digunakan, terbukti tidak menyerap asam kojat



RetTime [min]	k'	Sig	Amount [ng/ul]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol ution	Name
3.341	-	1	20.71265	0.71	0.1383	3232	2.71	

Lampiran 1. Presisi

??????  
 X  
 ??????  
 20.56991  
 20.13422  
 19.78381  
 18.10528  
 ??????

Method : Precision  
 Number of data : 4  
 SD value : 1.07773700  
 RSD value : 5.48514200%

The RSD value is not fulfilled the requirement

Please make new measurement once more

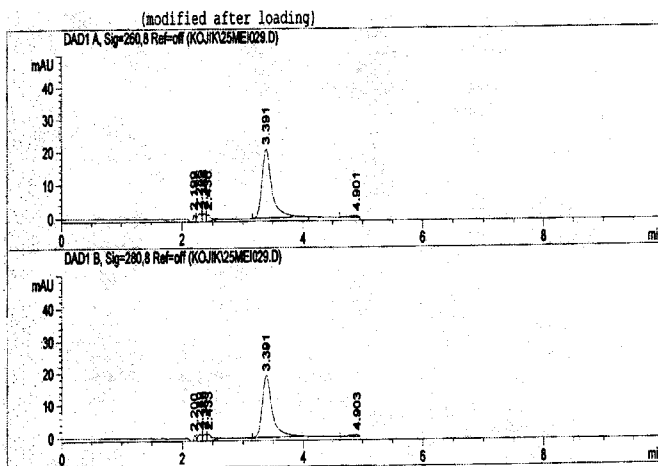
Please remember, there are three categories of precision tests :

1. Repeatability
2. Intermediate precision
3. Reproducibility

Kestabilan kojic acid disimpan 42 hari dalam media fermentasi

MF 999.953

PF 999.898



External Standard Report with Performance

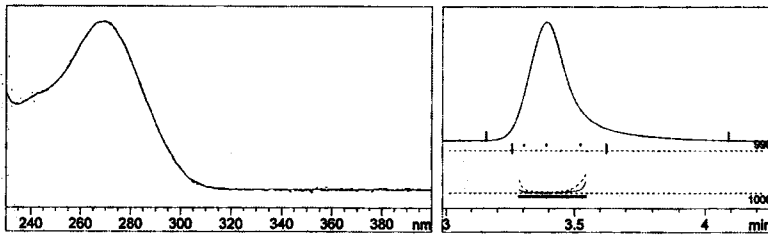
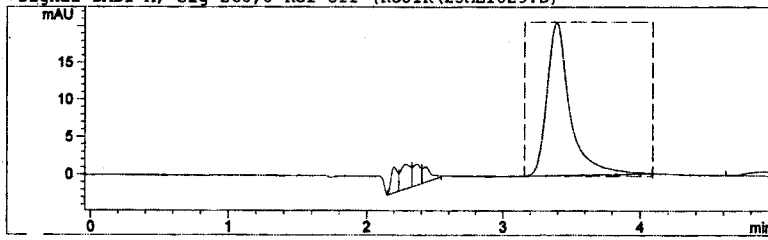
Calib. Data Modified : Friday, May 25, 2007 7:12:24 PM  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=260,8 Ref=off  
 Signal 2: DAD1 B, Sig=280,8 Ref=off  
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Sig	Amount [ng/ul]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol- ution	Name
3.391	-	2	17.62975	0.66	0.1533	2710	-	KOJIK

Purity results peak 5 at 3.391 min.

Signal DAD1 A, Sig=260,8 Ref=off (KOJIK\25MEI029.D)



-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 999.898 (40 of 40 spectra are within the calculated threshold limit.)  
 Threshold : 999.692 (Calculated with 40 of 40 spectra)  
 Reference : Peak start and end spectra (integrated) (3.258 / 3.625)  
 Spectra : 3 (Selection automatic, 3)  
 Noise Threshold: 0.037 (12 spectra, St.Dev 0.0187 + 3 \* 0.0062)

Lampiran 2 Kadar asam kojat dalam beragam kondisi fermentasi  
 Tabel 1. Kadar asam kojat *Lecythophora* sp. dalam 4 macam media.

Media	Minggu	Asam kojat( $\mu\text{g/ml}$ )	pH	Berat Biomassa kering (mg)
ME 30.1	0	*	$4,35 \pm 0,00$	$7,7 \pm 1,0$
	1	*	$3,48 \pm 0,09$	$46,9 \pm 4,2$
	2	*	$3,54 \pm 0,03$	$59,1 \pm 4,2$
	3	*	$3,50 \pm 0,03$	$98,9 \pm 3,7$
	4	*	$6,62 \pm 0,48$	$116,4 \pm 3,4$
	5	*	$7,16 \pm 0,04$	$102,0 \pm 6,9$
	6	*	$7,25 \pm 0,03$	$101,6 \pm 8,6$
ME 30.5	0	*	$4,35 \pm 0,00$	$11,2 \pm 0,5$
	1	$50,0 \pm 3,0$	$3,48 \pm 0,04$	$44,7 \pm 3,2$
	2	$63,0 \pm 1,0$	$3,68 \pm 0,06$	$63,0 \pm 2,0$
	3	$210 \pm 11$	$4,94 \pm 1,28$	$84,5 \pm 4,4$
	4	$415 \pm 43$	$3,86 \pm 0,25$	$101,5 \pm 3,1$
	5	$315 \pm 28$	$6,68 \pm 0,20$	$89,7 \pm 2,2$
	6	$258 \pm 29$	$6,72 \pm 0,08$	$85,6 \pm 4,8$
PDA 30.1	0	*	$5,46 \pm 0,00$	$7,6 \pm 0,8$
	1	*	$7,70 \pm 0,11$	$80,4 \pm 7,9$
	2	$143 \pm 10$	$4,04 \pm 0,17$	$123,2 \pm 9,6$
	3	$75,0 \pm 4,0$	$7,46 \pm 0,23$	$276,0 \pm 28,3$
	4	$75,0 \pm 1,0$	$7,55 \pm 0,37$	$147,5 \pm 20,5$
	5	$54,0 \pm 2,0$	$8,13 \pm 0,05$	$201,8 \pm 3,8$
	6	*	$8,04 \pm 0,02$	$127,4 \pm 0,5$

Lanjutan Lampiran 2. (Tabel 1)				
Media	Minggu	Asam kojat ( $\mu\text{g/ml}$ )	pH	Berat Biomassa kering (mg)
PDA 30.5	0	*	$5,46 \pm 0,00$	$3,3 \pm 0,1$
	1	$339 \pm 22$	$3,99 \pm 0,10$	$154,8 \pm 14,8$
	2	$388 \pm 58$	$7,08 \pm 0,17$	$297,2 \pm 42,8$
	3	$615 \pm 14$	$7,40 \pm 0,09$	$314,1 \pm 14,7$
	4	$230 \pm 21$	$7,22 \pm 0,13$	$186,4 \pm 11,5$
	5	$462 \pm 37$	$7,65 \pm 0,08$	$223,1 \pm 18,2$
	6	$392 \pm 29$	$7,69 \pm 0,10$	$203,8 \pm 8,9$
SA 30.1	0	*	$4,76 \pm 0,00$	$7,3 \pm 0,8$
	1	*	$3,75 \pm 0,02$	$72,3 \pm 5,3$
	2	*	$4,08 \pm 0,04$	$128,4 \pm 3,4$
	3	*	$4,66 \pm 0,61$	$204,1 \pm 26,1$
	4	*	$7,52 \pm 0,82$	$195,0 \pm 18,6$
	5	*	$8,17 \pm 0,01$	$189,9 \pm 17,3$
	6	*	$8,16 \pm 0,12$	$200,4 \pm 15,2$
SA 30.5	0	*	$4,76 \pm 0,00$	$11,2 \pm 0,5$
	1	$213 \pm 26$	$3,94 \pm 0,02$	$88,9 \pm 3,9$
	2	$432 \pm 56$	$4,33 \pm 0,06$	$137,0 \pm 17,3$
	3	$317 \pm 32$	$4,87 \pm 0,29$	$207,3 \pm 7,5$
	4	$174 \pm 4,0$	$8,13 \pm 0,06$	$161,5 \pm 18,6$
	5	$49,0 \pm 1,0$	$8,00 \pm 0,06$	$166,1 \pm 17,9$
	6	*	$7,82 \pm 0,21$	$145,6 \pm 3,1$

Lanjutan Lampiran 2. (Tabel 1)				
Media	Minggu	Asam kojat ( $\mu\text{g/ml}$ )	pH	Berat Biomassa kering (mg)
Czapek 30.1	0	*	$6,05 \pm 0,00$	$5,8 \pm 0,1$
	1	*	$5,06 \pm 0,15$	$14,0 \pm 1,4$
	2	*	$4,48 \pm 0,23$	$21,2 \pm 0,7$
	3	*	$4,92 \pm 0,74$	$29,1 \pm 1,8$
	4	*	$6,07 \pm 0,47$	$30,5 \pm 3,4$
	5	*	$6,06 \pm 0,01$	$25,3 \pm 3,7$
	6	*	$6,06 \pm 0,79$	$29,8 \pm 4,4$
Czapek 30.5	0	*	$6,05 \pm 0,00$	$5,3 \pm 0,3$
	1	*	$4,87 \pm 0,32$	$15,2 \pm 2,2$
	2	*	$4,72 \pm 0,12$	$21,1 \pm 0,7$
	3	*	$4,75 \pm 0,11$	$25,4 \pm 0,8$
	4	*	$5,59 \pm 0,41$	$26,8 \pm 3,0$
	5	*	$5,26 \pm 0,79$	$28,0 \pm 3,2$
	6	*	$4,70 \pm 0,06$	$26,6 \pm 2,0$

Keterangan : \* Asam kojat tidak terdeteksi

Lanjutan Lampiran 2 Kadar asam kojat dalam beragam kondisi fermentasi

Tabel 2. Kadar asam kojat fermentasi *Lecytophora* sp. strain 30.5 dalam media produksi 1 pH awal 5 dan 3,5

Media Produksi 1	Minggu	Asam kojat ( $\mu\text{g/ml}$ )	pH pengamatan	Berat Biomassa kering(mg)
pH =3,5	0	*	$3,42 \pm 0,01$	$39,6 \pm 4,3$
	1	$94,0 \pm 5,0$	$3,08 \pm 0,03$	$484,3 \pm 17,3$
	2	$149 \pm 10$	$3,00 \pm 0,02$	$970,8 \pm 7,5$
	3	$226 \pm 3,0$	$2,98 \pm 0,05$	$1115,8 \pm 15,7$
	4	$597 \pm 29$	$3,01 \pm 0,01$	$1383,2 \pm 20,2$
	5	$436 \pm 37$	$3,05 \pm 0,01$	$1182,0 \pm 10,2$
	6	$489 \pm 9,0$	$3,03 \pm 0,02$	$1074,0 \pm 9,8$
pH = 5	0	*	$4,74 \pm 0,01$	$40,6 \pm 4,1$
	1	$91,0 \pm 5,0$	$3,54 \pm 0,02$	$728,3 \pm 15,2$
	2	$608 \pm 22$	$3,33 \pm 0,02$	$1447,7 \pm 21,2$
	3	$728 \pm 81$	$3,24 \pm 0,03$	$1219,2 \pm 18,2$
	4	$826 \pm 65$	$3,30 \pm 0,01$	$1408,0 \pm 11,5$
	5	$1710 \pm 60$	$3,42 \pm 0,02$	$1408,4 \pm 17,9$
	6	$998 \pm 18$	$3,49 \pm 0,03$	$1471,5 \pm 15,8$



Lanjutan Lampiran 2 Kadar asam kojat dalam beragam kondisi fermentasi

Tabel 3. Kadar asam kojat fermentasi *Lecytophora* sp.30.5 dalam media produksi 2 pH awal 5,6 kondisi dengan dan tanpa pengocokan.

Media Produksi 2	Hari	Asam kojat ( $\mu\text{g/ml}$ )	pH pengamatan	Berat Biomassa kering (mg)
Tanpa pengocokan	0	*	$5,21 \pm 0,01$	$7,3 \pm 0,01$
	2	$272 \pm 6,0$	$3,71 \pm 0,01$	$15,2 \pm 0,3$
	4	$268 \pm 7,0$	$3,47 \pm 0,04$	$44,9 \pm 2,1$
	6	$881 \pm 22$	$3,41 \pm 0,03$	$341,3 \pm 9,1$
	8	$802 \pm 12$	$3,4 \pm 0,02$	$365,4 \pm 5,8$
	10	$793 \pm 23$	$3,65 \pm 0,03$	$291,5 \pm 4,9$
	12	$484 \pm 12$	$3,71 \pm 0,02$	$325,4 \pm 12,1$
	14	$920 \pm 46$	$3,67 \pm 0,03$	$320,4 \pm 6,9$
	16	$493 \pm 27$	$3,87 \pm 0,01$	$381,1 \pm 7,8$
	Dengan pengocokan	0	*	$5,21 \pm 0,01$
2		$1299 \pm 8,0$	$3,71 \pm 0,02$	$308 \pm 0,7$
4		$1413 \pm 17$	$3,83 \pm 0,01$	$690 \pm 7,9$
6		$1591 \pm 12$	$3,69 \pm 0,03$	$747 \pm 6,9$
8		$2238 \pm 62$	$4,5 \pm 0,02$	$763,1 \pm 18,1$
10		$1666 \pm 62$	$4,98 \pm 0,03$	$635,1 \pm 16,5$
12		$1766 \pm 22$	$4,6 \pm 0,02$	$775,6 \pm 15,8$
14		$1461 \pm 97$	$5,12 \pm 0,01$	$688,2 \pm 14,9$
16		$1260 \pm 56$	$5,44 \pm 0,01$	$726,3 \pm 12,7$

## Lampiran 3. Komposisi media

*Malt extract agar* terdiri dari:

agar	15 g,
<i>malt extract</i>	15 g,
air suling hingga	1 liter.

Media *Malt extract agar* untuk isolasi jamur endofit dari tanaman terdiri dari:

agar	15 g
<i>malt extract</i>	15 g
serbuk kering tanaman inang (daun)	15 g
kloramfenikol	0,2 g
air suling hingga	1 liter

Media PDA Broth, terdiri atas

kentang	300 g
dextrose	20 g
air suling	1 L, pH 5,6.

Media Czapek, terdiri atas

Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,01 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
KCl	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
NaNO <sub>3</sub>	3,0 g
sucrose	30 g
air suling	1 L, pH 5,6.

Untuk fermentasi/isolasi metabolit :

- media cair (tanpa agar) *Malt extract*, *Saboroud*, *Potato Dextrose* dan *Czapek*; Media cair *Malt extract* (pH 5,4), *Saboroud* (pH 5,6), *Potato Dextrose Broth* (pH 5,6) dan *Czapex* (pH 5,6)
- media produksi 1, terdiri atas glukosa 100 g, *yeast extract* 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g dan MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O 0,5 g per liter (Rosfarizan, 2000). dengan pH awal 5 dan 3,5.
- media produksi 2, yang terdiri atas glukosa 50 g, *yeast extract* 5 g, MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O 0,5 g dan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g per liter (Ariff,1996) dengan pH 5,6