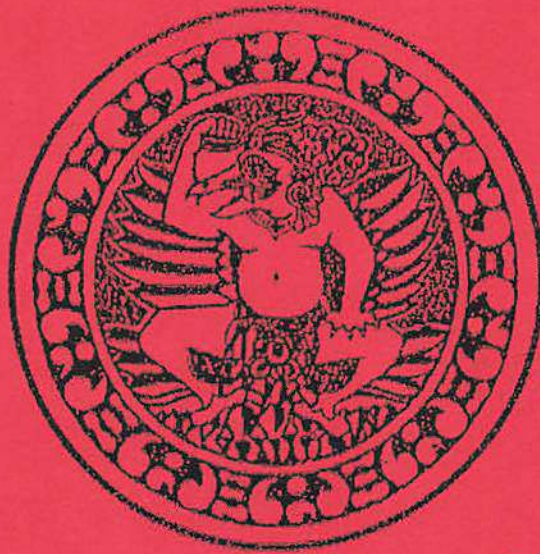


Bidang Ilmu: Mikrobiologi Farmasi

**LAPORAN
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN
SESUAI PRIORITAS NASIONAL BATCH I
(Klaster Gizi dan Kesehatan)
Tahun Anggaran 2009**



M I I K
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

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

**Dr. Noor Erma Sugijanto, MS
Prof.Dr. Gunawan Indrayanto
Prof.Dr. Noor Cholies Zaini**

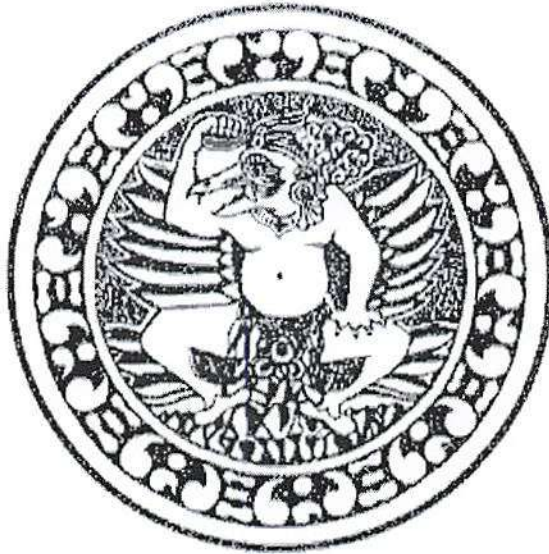
Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional
No: 171/SP2H/PP/DP2M/V/2009, Tanggal 30 Juli 2009

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
Desember 2009**

Bidang Ilmu: Mikrobiologi Farmasi

**LAPORAN
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN
SESUAI PRIORITAS NASIONAL BATCH I
(Klaster Gizi dan Kesehatan)
Tahun Anggaran 2009**

KKB
KK-2
Lp. 112/10
Erm
P



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

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

**Dr. Noor Erma Sugijanto, MS
Prof.Dr. Gunawan Indrayanto
Prof.Dr. Noor Cholies Zaini**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional
No: 171/SP2H/PP/DP2M/V/2009, Tanggal 30 Juli 2009

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
Desember 2009**

b. HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL BATCH I 2009.

1. Judul Penelitian :Produksi antibiotika baru dari *Lecythophora* sp. dan *Kabatiela caulivora*, jamur endofit dari tanaman *Alyxia reinwardtii* BL.

2. Ketua Peneliti

a. Nama : Dr. Noor Erma Sugijanto, MS
 b. Jenis Kelamin : Wanita
 c. NIP : 130 809 075
 d. Pangkat/Golongan : Pembina Utama Muda/ IV c
 e. Jabatan : Lektor Kepala
 f. Bidang Keahlian : Kimia Farmasi / Mikrobiologi Farmasi
 g. Fakultas/Jurusan/Puslit : Farmasi UNAIR/Kimia Farmasi
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 Tim Peneliti :

No	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	Fakultas/Jurusan	PERGURUAN TINGGI
1.	Dr. Noor Erma Sugijanto, MS.	Kimia Farmasi/ Mikrobiologi Farmasi	Fakultas Farmasi	Universitas Airlangga
2.	Prof. Dr. Gunawan Indrayanto	Bioteknologi Farmasi/Elusidasi Struktur	Fakultas Farmasi	Universitas Airlangga
3.	Prof. Dr. Noor Cholies Zaini	Kimia Bahan Alam	Fakultas Farmasi	Universitas Airlangga

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian:

a. Jangka waktu penelitian : 10 bulan.
 b. Biaya yang diusulkan : Rp. 100.000.000
 c. Biaya yang disetujui tahun 2009 : Rp. 94.500.000

Mengetahui
 Dekan Fakultas Farmasi

Surabaya, 1 Desember 2009.
 Ketua Peneliti,

Prof. Dr. H. Achmad Syahrani, Apt M.S.
 NIP: 130 809 077

Dr. Noor Erma Sugijanto, MS.
 NIP : 130 809 075

Mengetahui
 Ketua Lembaga Penelitian

(Prof. Dr. Bambang Sektlari L., DEA, drh)
 NIP. 131 837 004

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 (Rayner, 1991). Endofit yang paling sering diisolasi adalah jamur (Strobel and Daisy, 2003). Telah diisolasi dan diidentifikasi jamur endofit dari *Alyxia reinwardtii* (Sugijanto, et al., 2003). *A. reinwardtii* (pulasari) digunakan untuk jamu dan diketahui tumbuhan tersebut mendekati punah.

Tujuan penelitian ini mengelucidasi struktur metabolit yang berkhasiat antimikroba dari *Lecythophora* sp. 30.1 dan 30.5, dan *Kabatiella caulivora* endofit yang diisolasi dari *A.reinwardtii* sehingga diperoleh temuan antimikroba baru yang poten, berkhasiat, dan dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat antibiotika.

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/lf.8/2003). Jamur endofit *Lecythophora* sp. 30.1 dan 30.5 diisolasi dari *A. reinwardtii* BL menurut prosedur Sugijanto et al., 2009 dan telah diidentifikasi oleh Dr. R.A.Samson (CBS Utrecht, The Netherlands, reg no 208-2003) dan *Kabatiella caulivora* diidentifikasi oleh Dr. Arnulf Diesel dari Universitas Düsseldorf. Kultivasi dilakukan dalam media cair *Malt extract* 15 gram perliter, pH awal 6,5 pada suhu kamar selama 4 minggu. Metabolit dielucidasi strukturnya menggunakan spektroskopi ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H¹HCOSY, ¹H ¹³C COSY, dan Mass spektrometri.

Disimpulkan ekstrak jamur endofit *Lecythophora* sp. 30.1 & 30.5 dan *Kabatiella caulivora* menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap enam mikroba uji. Senyawa aktif yang berperan sebagai antimikroba dari jamur endofit tersebut diidentifikasi sebagai asam kojat, emodin, 7-kloremodin, p.hidroksi asam benzoat, 5,8 ergosterol peroksida. Apabila jamur endofit ini mampu memproduksi senyawa *novel* dan aktif secara biologis walaupun kadarnya relatif kecil dapat diupayakan peningkatan kemampuan kapasitasnya melalui beberapa cara yaitu, sintesis kimia total, semi sintesis, inovasi kultivasi biomassanya atau kondisi fermentasi, dan rekayasa genetika.

SUMMARY

An endophyte is a bacterial or fungal microorganism, which spends the whole or part of its life cycle inside the healthy tissues of its host plant, colonizing either intercellularly and or intracellularly (Tan and Zou, 2001). Some metabolites may also be produced by the endophytes to protect their respective host plant from disease caused by pathogens (Strobel, 2002). The most frequently isolated endophytes are fungi (Strobel & Daisy, 2003). *Alyxia reinwardtii* BL (pulasari in Indonesia) is one of the plants used in "jamu". Two new endophytic fungal strains (specimen codes 30.1 and 30.5) which were isolated from the stem of *A. reinwardtii*, identified as *Lecythophora* sp. and the other was *Kabatiella caulivora*.

Objective of this research: Isolation and elucidation of chemical constituents especially focused on the antimicrobial agent from the metabolites endophytic fungi *Lecythophora* sp. and *Kabatiella caulivora* isolated from *Alyxia reinwardtii* BL.

A. reinwardtii was collected from the Purwodadi Botanical Garden, East Java, Indonesia in April 2003. The plant material was identified by Dr Irawati at the Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences, Bogor, Indonesia (voucher no 710/IPH.1.02/lf.8/2003). Identification of the endophytic fungi *Kabatiella caulivora* were done by Dr. Arnulf Diesel (Düsseldorf University). 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 flasks (300 mL), which containing malt extract broth (15 g/L, initial pH 6.5) under static conditions at room temperature (ca $30 \pm 3^\circ\text{C}$) for 4 weeks. The structures of the compounds were determined by mass spectrometry in combination with several NMR spectroscopic techniques, i.e. ^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HMQC, HMBC.

The extracts showed antimicrobial activity against six microbes. *Lecythophora* sp. yielded kojic acid, p-hydroxybenzoic acid, emodine, 7-chloroemodine and ergosterol-5,8 -peroxide.

PRAKATA

Puji syukur Ahamdulillah saya panjatkan ke hadirat Allah swt karena atas perkenan dan rahmat yang dilimpahkan-Nya maka penyusunan laporan penelitian HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN SESUAI PRIORITAS NASIONAL BATCH I TAHUN 2009, yang berjudul **Produksi antibiotika baru dari *Lecythophora* sp. dan *Kabatiela caulivora*, jamur endofit dari 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 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 serta dapat dilanjutkan bagi peningkatan daya saing menuju kemandirian nusa dan bangsa.

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
A.LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
PRAKATA	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	3
III.TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	6
IV. METODE PENELITIAN	9
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	14
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN	
ARTIKEL ILMIAH	

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Aktivitas antimikroba ekstrak <i>Lecythophora</i> sp. 30.1	15
Tabel 5.2 Aktivitas antimikroba ekstrak <i>Lecythophora</i> sp. 30.5	15
Tabel 5.3 Aktivitas antimikroba ekstrak <i>Kabatiella caulivora</i>	16
Tabel 5.4 Data NMR isolat 1	22
Tabel 5.5 Data NMR isolat 2	27
Tabel 5.6 Data NMR isolat 3	31
Tabel 5.7 Hasil pengamatan spektrum massa (EI-MS) isolat 4	34
Tabel 5.8 Data NMR isolat 4	35
Tabel 5.9 Data NMR isolat 5	42



BAB I

PENDAHULUAN

1. Latar Belakang masalah

Penggunaan bahan alam khususnya tanaman untuk obat telah dikenal sejak ribuan tahun lalu, 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. Jamur telah digunakan sebagai obat yang dapat meningkatkan daya tahan tubuh dan vitalitas sejak ribuan tahun yang lalu di Tiongkok dan Jepang (Morris, 2001). Penemuan penisilin pada tahun 1928 (Strobel and Daisy, 2003), diikuti streptomisin dan antibiotika yang lain membuka jalan untuk 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 jamur endofit merupakan salah satu jamur yang menarik untuk diteliti karena kekayaan kimiawi metabolit yang dihasilkan, keragaman bioaktivitasnya, berlimpahnya biodiversitas, dan kaitan fungsi ekologisnya (Tan and Zou, 2001).

Mikroba endofit dapat berupa bakteri, termasuk *Actinomycetes* dan jamur yang hidup inter dan intra-seluler di dalam jaringan tanaman sehat. (Tan and Zou, 2001). Endofit dapat berfungsi meningkatkan daya adaptasi tanaman inang dan toleransinya terhadap stres lingkungan maupun memperbaiki daya tahan terhadap serangan 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 potensinya sebagai sumber bahan aktif dan

senyawa berharga (*"novel substances"*) sangatlah besar. Beberapa metabolit yang dihasilkan endofit menunjukkan aktifitas antibakteri, antifungi, antiviral, hormon pertumbuhan tanaman, insektisida, immuno suppresan (Tan and Zou 2001). Metabolit sekunder endofit, dalam hal ini yang memiliki aktivitas sebagai antimikroba dihasilkan sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap serangan bakteri dan jamur lain yang merupakan hama bagi inangnya (Rayner,1991). Endofit yang paling sering diisolasi adalah jamur (Strobel and Daisy, 2003).

Arti penting kemampuan endofit dalam memproduksi senyawa berkhasiat merupakan terobosan baru sebagai alternatif 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. Potensi ekonominya bagi endofit yang terbukti mampu menghasilkan metabolit berkhasiat, dapat ditingkatkan kemampuannya melalui rekayasa genetika dan optimasi kondisi kultivasi untuk difermentasikan dalam skala industri. Poduksi melalui fermentasi mikroba endofit mempunyai keuntungan lebih reproduibel, kemampuannya dapat ditingkatkan dan dapat diproduksi secara tidak terbatas dalam skala industri, dan dengan kondisi kultivasi yang berbeda dapat dihasilkan produk yang berbeda (Stierle and Strobel, 1995).

Alyxia reinwardtii atau pulasari (Indonesia/Jawa) diketahui telah lama digunakan sebagai jamu di Indonesia. Pulasari, karena pertumbuhannya yang lambat dan penggunaannya yang banyak untuk jamu tanaman tersebut mendekati punah. Pada penelitian terdahulu telah berhasil diisolasi beragam jenis jamur endofit dari pulasari ini (Sugijanto, *et al.*, 2003). Melalui penelitian ini diharapkan diperoleh metabolit sekunder dari jamur endofit yang diisolasi dari *Alyxia reinwardtii*, yaitu *Lecythophora sp* 30.1 dan 30.5 dan *Kabatiella caulivora* yang pada pengujian awal telah menunjukkan aktivitas antimikroba dapat dielusidasi strukturnya dan dibuktikan aktifitasnya sebagai antimikroba.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang jamur endofit dan metabolitnya

Mikroba endofit dapat berupa bakteri, *Actinomycetes* dan jamur yang hidup inter dan intraseluler di dalam jaringan tanaman sehat. 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 berkaitan dengan fungsi ekologisnya (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 hayati tersebut dikembangkan dan ditingkatkan nilai tambahnya sebagai bahan obat yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah melalui penelitian. Salah satu alternatif sumber senyawa berkhasiat obat adalah jamur endofit, yang diketahui berlimpah di daerah tropis (Tan and Zou, 2001). 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 yang ada.

Berbagai golongan senyawa fungsional dapat dihasilkan dari endofit dan atau interaksinya dengan tanaman inang antara lain alkaloida, amina dan amida, derivat indole, pirolozidine, steroid, terpenoid dan terpen, kuinon, flavon dan flavonoid, peptida, fenyipropanoid, fenol dan senyawa lain. Misalnya alkaloida ergot ditemukan dalam kultur *Neotyphodium*, endofit yang

dikarakterisasi dari *Ergot sclerotia* (Tan and Zou, 2001). Anti kanker Taxol™ yang 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 seperti pada kasus Taxol™ dan kamptotesin (bahan baku anti kanker topotecan dan Irinotecan) dari jamur endofit tanaman *Nothapodytes foetida* (Puri et al., 2005).

Fungi endofit diasumsikan menghasilkan metabolit yang berkhasiat antibakteri dan atau antifungi karena diyakini bahwa endofit mampu menekan kolonisasi inangnya oleh serangan spesies patogen. Beberapa fungi endofit terbukti mampu menghasilkan antibiotika, a.l phomopsichalasin suatu sitokalasin yang diproduksi endofit *Phomopsis* sp dari tanaman *Salix gracilostylis var melanostachys* bersifat anti bakteri dan antifungi. Kriptosin 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). Penicillin N, sporiofungin A, B, C merupakan antibiotika yang diproduksi endofit *Pleurophomopsis* sp. dan *Cryptosporiopsis* sp. diisolasi dari tumbuhan *Cardamin heptaphylla* Schulz (Dreyfuss, 1986). Brunner dan Petrini (1992) melaporkan 75% fungi endofit dari 80 jenis yang diteliti menghasilkan antibiotika. 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). Wiyakrutta dari

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

Pada perkembangannya penelitian tentang endofit ini membuka pemikiran untuk melakukan riset lebih lanjut untuk mendayagunakan mikroba endofit ini sebagai sumber yang kaya untuk mendapatkan bahan bioaktif dan senyawa berharga dengan potensi sebagai obat, dalam bidang pertanian, misalnya sebagai hormon pertumbuhan tanaman, fungisida, insektisida, larvasida dan sebagainya.

2.2 Tinjauan tentang *Alyxia reinwardtii*

Alyxia reinwardtii BL (pulasari), Apocynaceae merupakan komponen utama ramuan obat tradisional Indonesia. Pemanfaatan *Alyxia reinwardtii* (pulosari) sebagai komponen jamu tidak disertai upaya pelestariannya sehingga terancam punah. Secara empiris *Alyxia reinwardtii* berkhasiat mengobati demam, sariawan, karminatif, dan spasmolitik (Anonim, 1998). *Alyxia reinwardtii* mengandung senyawa pinoselinol suatu prekursor obat antikanker podofilotoksin (Lucy, 1998, Leuscher, 1998). *A. reinwardtii* BL diketahui mengandung kumarin, 5-hidroksikumarin, 8-hidroksikumarin, pinoselinol, 9 α -hidroksi-pinoselinol dan salisifoliol (Steffan, 2006) dan pulosariosida, suatu trimerik iridoid diglukosida (Kitagawa, *et al.*, 1988).

2.3. Tinjauan tentang uji aktivitas antimikroba

Metode uji antimikroba ekstrak bahan alam dikenal ada 3 macam cara, yaitu difusi, dilusi dan bioautografi. Beberapa faktor mempengaruhi hasil uji, misalnya metode ekstraksi, volume inokulum, komposisi media, pH dan suhu inkubasi, jenis mikroba uji dan volume cuplikan (Rios *et al.*, 1988). Pada metode difusi, sample dalam reservoir dibiarkan kontak dengan media yang sudah diinokulasi mikroba uji. Setelah inkubasi didapatkan zona yang jernih (daerah

hambatan pertumbuhan) yang menentukan jumlah antibiotika dalam ekstrak. Metode dilusi menentukan konsentrasi minimum sample yang menghambat pertumbuhan mikroba uji, sedangkan bioautografi didasarkan pada efek biologis (antibakteri / antifungi) senyawa yang diuji yang sebelumnya dipisahkan melalui kromatografi lapis tipis terlebih dahulu. Zona hambat diamati dengan pereaksi penampak noda yang mendeteksi adanya aktivitas dehidrogenase atau daerah bening karena tiadanya pertumbuhan kuman. Bioautografi memungkinkan untuk mengetahui posisi khromatogram yang aktif sebagai antimikroba, dan dapat memberikan informasi berharga tentang senyawa kimia yang aktif tersebut (Rios *et al.*, 1988).

2.4. STUDI PENDAHULUAN YANG SUDAH DILAKSANAKAN

Alyxia reinwardtii BL mengandung beragam jamur endofit (Sugijanto *et al.*, 2003). Hasil determinasi endofitnya antara lain, *Lecythophora* sp.strain 30.1 dan 30.5, serta *Kabatiella caulivora*, (Sugijanto *et al.*, 2005). Ekstrak heksan, etil asetat dan butanol dari kultur *Lecythophora* sp. strain 30.1 dan 30.5 menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap enam mikroba uji (Pritayuni, 2008; AlBathaty, 2008). Ekstrak metanol, diklormetan dan etil asetat dari kultur *Kabatiella caulivora* diuji terhadap enam mikroba uji *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis* dan *Candida albicans* menunjukkan ekstrak etil asetat dan metanol aktif sebagai antimikroba (Anggraeni, 2008; Maftuchah, 2008; Sugijanto *et al.*, 2007).

Relatif minimnya penelitian tentang jamur endofit di Indonesia, khususnya dari tanaman obat yang sudah tergolong langka seperti *Alyxia reinwardtii* maka dalam hal ini perlu diteliti dan dikaji lebih lanjut metabolit endofit yang aktif sebagai antimikroba tersebut untuk dapat dimanfaatkan sebagai obat antibiotika baru yang diharapkan dapat menjadi alternatif untuk mengatasi berbagai penyakit infeksi.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 TUJUAN UMUM

Melakukan elusidasi struktur metabolit yang berkhasiat antimikroba dari *Lecythophora* sp. strain 30.1 dan 30.5, dan *Kabatiella caulivora*, jamur endofit dari *Alyxia reinwardtii* sehingga diperoleh temuan antimikroba baru yang poten, berkhasiat, dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat antibiotika.

3.2 TUJUAN KHUSUS

Tujuan yang hendak dicapai dengan penelitian ini adalah:

1. Melakukan isolasi metabolit yang dihasilkan jamur endofit *Lecythophora* sp. strain 30.1 dan 30.5, dan *Kabatiella caulivora* dari tanaman *Alyxia reinwardtii* dan skrining efek antimikrobanya.
2. Melakukan karakterisasi dan elusidasi struktur kimia senyawa metabolit sekunder yang berpotensi antimikroba yang dihasilkan jamur endofit *Lecythophora* sp. strain 30.1 dan 30.5, dan *Kabatiella caulivora*.

3.3 PENTINGNYA ATAU KEUTAMAAN PENELITIAN INI

Penyakit infeksi masih merupakan masalah kesehatan utama bagi bangsa Indonesia, yang perlu segera diatasi. Antibiotika baru sangat diperlukan untuk terapi beragam penyakit infeksi pada manusia, hewan ternak dan agroindustri. Hal ini mengingat beragam antibiotika yang ada, beberapa diantaranya diketahui telah terjadi resistensi pada mikroba penyebab penyakit misalnya tbc. Peluang jamur endofit sebagai sumber antimikroba baru sangat besar potensinya mengingat 75 % dari 80 jenis fungi endofit yang diteliti, dilaporkan mampu menghasilkan antibiotika (Petrini *et al.*, 1992). Beberapa jenis jamur endofit dilaporkan menghasilkan antimikroba poten yang sangat

prospek untuk dikembangkan (Strobel and Daisy, 2003). Misalnya phomopsichalasin suatu diproduksi endofit *Phomopsis* sp dari tanaman *Salix gracilostyls var melanostachys*, bersifat anti bakteri dan antifungi. Antibiotika sefalosporin dikarakterisasi dari *Cephalosporium*, *Emericellopsis (Acremonium)*, *Anixiopsis*, *Arachnomyces*, *Diheterospora*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* dan *Spiroidium* (Morin and Gorman, 1995). Endofit *Streptomyces munumbi* dari tanaman obat suku Aborigin *Kennedia nigricans* menghasilkan munumbicin A, B, C, D aktif sebagai anti bakteri terhadap anthrax, kuman tbc dan berkhasiat anti jamur, anti malaria dan antikanker (Strobel and Daisy, 2003). Kriptosin, anti jamur yang sangat poten terhadap *Pyricularia oryzae* dan fitopatogen yang lain, dari endofit *Cryptosporiopsis quercina* diisolasi dari *Tripterygium wilfordii* (Tan and Zou, 2001).

Jamur endofit yang diisolasi dari *Alyxia reinwardtii* BL yaitu *Lecythophora* sp. strain 30.1 dan 30.5, dan *Kabatiella caulivora* berpotensi menghasilkan antibiotika. Uji aktivitas awal sebagai anti mikroba terhadap ekstrak heksan, etil asetat dan butanol dari *Lecythophora* sp dan *Kabatiella caulivora* telah dilakukan, hasilnya menunjukkan aktif terhadap enam mikroba uji (Sugijanto, 2009).

Pada penelitian ini metabolit jamur endofit dielusidasi strukturnya, kemudian senyawa tersebut dibuktikan aktivitasnya sebagai antimikroba. Tujuan jangka panjangnya adalah diperoleh temuan antimikroba baru yang poten dan berkhasiat, aman digunakan bagi penderita sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat antibiotika. Prospek ekonomi penelitian ini, senyawa antibiotika baru tersebut diharapkan dapat dipatenkan dan inovasi metode produksi antibiotika dari jamur endofit ini dapat dilakukan dalam skala industri untuk meningkatkan daya saing bangsa.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dipublikasi di journal international dan atau dipatenkan.

BAB IV

METODE PENELITIAN

Dalam penelitian ini dilakukan tahapan sebagai berikut:

1. Kultivasi jamur endofit pada kultur *in vitro*.
2. Ekstraksi dan fraksinasi metabolit sekunder hasil kultivasi
3. Uji antibakteri fraksi metabolit sekunder hasil kultivasi
4. Uji antifungi fraksi metabolit sekunder hasil kultivasi.
5. Pemurnian isolat metabolit yang aktif sebagai antimikroba.
6. Karakterisasi dan elusidasi struktur senyawa aktif.

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) dan *Kabatiella caulivora* diidentifikasi oleh Dr. Arnulf Diesel dari Universitas Düsseldorf

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 (teknis diredestilasi). Etanol (pharmaceutical grade) dan NaCl (E Merck).

Pemurnian dan KLT digunakan Plate KLT *Silicagel 60 F₂₅₄*, 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-H₂SO₄.

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). Kontrol positif digunakan streptomisin sulfat (PT. Meiji Indonesia no. Batch SS03364-1) dan mikonazol (pharmaceutical grade, P.T.Bernofarm, Surabaya).

4.1.4 Mikroba uji

Escherichia coli ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* dari ULP (Unit Layanan Pengujian) Fakultas Farmasi. *Bacillus subtilis* FNCC 0059 dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Bakteri uji diidentifikasi dengan pewarnaan Gram serta *Lactofenol Cotton Blue* untuk jamur *Candida albicans* sebelum digunakan.

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.

Elusidasi struktur, ^1H dan ^{13}C NMR direkam dengan Bruker DPX 300, ARX 400, 500 atau AVANCE DMX 600 NMR *spectrometers* dengan standard software Bruker. Spektrum massa direkam pada Finnigan MAT 8430 Mass spectrometer. LC-MS equipment digunakan Finnigan LCQ-DECA dengan Agilent 1100 HPLC Series (Waldbronn, Germany) dengan sistem HPLC (pompa, detektor dan autosampler), kolom Knauer, (L) 125mm, (ID) 2mm,

prepacked Eurospher-100 C18 (5 μ m). Mass spectrometer resolusi tinggi digunakan Micromass Q -TOF 2.

4.3 Kultivasi jamur endofit pada kultur *in-vitro*

Jamur endofit diambil satu \check{O} se dari kultur persediaan, ditumbuhkan dalam media malt extract agar selama 7 hari sebagai inokulum. Kultivasi massal jamur endofit dilakukan dalam labu Erlenmeyer 300 ml, yang masing-masing mengandung 40 ml media cair, yang terdiri dari *Malt extract* 15 gram perliter air dengan pH awal 6,5. Jamur ditumbuhkan dalam kondisi gelap, pada suhu kamar selama 4 minggu (Stierle and Strobel, 1995; Ebel, 2003 dengan modifikasi).

4.4 Ekstraksi dan fraksinasi metabolit sekunder hasil kultivasi.

Kultur disaring, masing-masing bagian miselia dan cairan dipisahkan. Cairan media diekstraksi dengan etil asetat sepertiga volumenya, dikocok dengan shaker selama 1 jam dan fase etil asetatnya dikumpulkan. Ekstraksi ini diulang 3 kali. Miselia dikeringkan pada suhu 50 $^{\circ}$ C selama 48 jam, dipotong-potong kecil, diekstraksi metanol dengan diultrasonografi 15 menit lalu disaring. Ekstrak metanol dipekatkan dengan rotavapor pada suhu 35 $^{\circ}$ C hingga seperlima volume awal, selanjutnya dipartisikan kedalam *n*-hexan-air dan terakhir dengan *n*-butanol. Masing-masing ekstrak diuapkan / dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental yang kemudian dikeringkan di lemari asam. Ekstrak kering disimpan pada suhu dingin di lemari es hingga saat digunakan (Ebel, 2003).

4.5 Uji aktivitas antibakteri dan antifungi

Skринing aktivitas antimikroba sebagai antibakteri dan antifungi dilakukan menggunakan difusi cakram (*disc diffusion methode*) menurut Doughari, 2006. Bakteri uji disiapkan dengan mengambil satu \check{O} se dimasukkan media perbenihan Nutrient Broth (28 gram dalam 1 liter dapar fosfat pH 7,0) untuk jamur dibiakkan dalam Sabouroud Glukosa agar (Neopepton 10 gram, glukosa

40 gram dan serbuk agar 15 gram dalam satu liter air). Jamur uji disiapkan dengan mengambil satu *Ō*se jamur dimasukkan tabung berisi air steril lalu disentrifuge selanjutnya diencerkan hingga diperoleh suspensi dengan transmittan 90 % dibandingkan blanko air suling steril pada panjang gelombang 540 nm. Suspensi tersebut mengandung 10^6 hingga 10^8 spora/ml. Inokulum mikroba uji dibuat dengan menambahkan normal salin steril ke dalam tabung mikroba uji yang sudah dibiakkan selama 24 – 48 jam, dikocok hingga tersuspensikan ke dalam normal salin, kekeruhannya diukur dengan spektrofotometer pada 580 nm, sampai dicapai transmittan 25 % (Anonim, 1995). Dibuat larutan induk ekstrak 20 mg/mL, untuk membantu kelarutan ditambahkan tween 20 dan dilakukan pengenceran hingga diperoleh konsentrasi 10 mg/mL dan 5,0 mg/mL. Diteteskan 10 μ l larutan uji pada cakram kertas, diletakkan pada permukaan media yang telah diinokulasi dengan 2,5-5 μ l mikroba uji dalam 10 ml media, dan diamati daya hambatnya. Hambatan pertumbuhan kuman diamati sebagai daerah bening pada media, diulang tiga kali untuk tiap jenis mikroba uji (Doughari, 2006).

4.6 Pemurnian metabolit jamur endofit yang aktif sebagai antimikroba.

Fraksinasi dilakukan dengan khromatografi vakum, ditimbang ekstrak kering 3 gram dilarutkan dalam pelarut semula, ditambahkan *Silica gel 60 G for column chromatography* 9 gram hingga homogen dan dikeringkan melalui *vacuum rotavapor*. Kolom kromatografi vakum diisi adsorben *Silica gel 60 G for thin layer chromatography* 50 gram, dipadatkan dengan pompa vakum, ditambahkan adsorben hingga setinggi 5 cm. Serbuk ekstrak kering diletakkan di bagian atas, dilapisi lagi dengan *Silica gel 60 G for column chromatography* terakhir ditutup kertas saring. Dilakukan elusi gradien dengan berbagai perbandingan eluen *n*-heksan – etilasetat, diklorometan – metanol, metanol – air. Pelarut untuk eluasi masing masing fraksi digunakan campuran eluen 50 ml. Hasil fraksinasi ditampung selanjutnya dilakukan KLT dengan eluen kloroform: metanol:air:65:35:1 (v/v) ; etil asetat:metanol:air:100:13,5:1,5 (v/v) dan *n*-heksan

:etil asetat:3:2 (v/v). Noda hasil kromatografi yang memisah dengan Rf sama dan memberikan warna yang sama pada pengamatan dengan sinar ultra violet pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm atau dengan pereaksi anisaldehyd – asam sulfat dikumpulkan untuk dimurnikan lebih lanjut.

Fraksinasi dengan kromatografi kolom dilakukan dengan ditimbang ekstrak \pm 3 gram dan *Silica gel for column* 50 gram dengan eluen *n*-heksan – etil asetat = 4:1 (v/v). Eluasi dilanjutkan dengan campuran eluen *n*-heksan – etil asetat 6:4; 1:4, etil asetat 100 % dan etil asetat:metanol 9:1. Fraksi yang sama digabung dan selanjutnya dimurnikan dengan *chromatography preparative* menggunakan plate *Silicagel 60 F₂₅₄* dan RP-18. Sistem eluen digunakan dikhlormetan:metanol =9:1; dan asetonitril:metanol:air =2:1:1. Selanjutnya hasil *chromatography preparative* dikerok dan diekstraksi dengan pelarut yang sesuai disaring, ekstraksi diulang beberapa kali. Filtrat hasil penyaringan diuapkan di lemari asam pada suhu kamar, Residu yang diperoleh diuji kemurniannya dengan KLT menggunakan beberapa sistem eluen. Residu yang belum murni dipisahkan dengan *chromatography preparative* lagi atau dicuci dengan pelarut yang sesuai dan diusahakan dapat membentuk kristal. Isolat dimurnikan dengan direkristalisasi dengan etil asetat dan aseton dan ditentukan kemurniannya dengan mengamati titik leburnya dengan DTA, juga KLT pada tiga sistem. Digunakan juga KLT dua dimensi dengan eluen etil asetat:metanol:air = 100:13,5:1,5 v/v dengan penampak noda sinar ultra violet pada 254 dan 365 nm atau pereaksi anisaldehyd - asam sulfat. Uji kemurnian juga dilakukan secara HPLC dan direkam spektra ultra violet dari khromatogram yang dihasilkan.

4.7 Karakterisasi dan elusidasi struktur senyawa aktif.

Dilakukan karakterisasi dan elusidasi struktur terhadap metabolit yang aktif pada uji aktifitas antimikroba baik sebagai antibakteri maupun sebagai antifungi menggunakan spektroskopi ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ¹H¹HCOSY, ¹H ¹³C COSY, Mass spektrometri.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Kultivasi, ekstraksi dan fraksinasi metabolit jamur endofit

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

Kultivasi dilakukan dalam *Malt extract* cair pH 6,5 pada suhu kamar sebagai kultur diam disebutkan di pustaka dua hingga enam minggu namun dalam hal ini dilakukan selama 4 minggu, (Ebel, 2003; Pulici *et.al.*1997). Didasarkan asumsi pembentukan metabolit umumnya terjadi pada fase *stationer* dan ditinjau dari pertumbuhan *Lecythophora* sp., fase *stationer* dicapai pada minggu ke-empat, 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 Uji aktivitas antibakteri dan antifungi

Hasil uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi cakram kertas terhadap ekstrak *Lecythophora* sp. strain 30.1 dan 30.5 dan *Kabatiella caulivora*. dinyatakan dalam diameter zona hambatan (mm) ditabelkan pada tabel 5.1, 5.2 dan 5.3 dan digambarkan pada gambar 1 untuk uji metabolit *Kabatiella caulivora*.

Keenam mikroba uji ini mewakili bakteri gram positif, gram negatif, serta jamur penyebab berbagai penyakit infeksi. Terbukti melalui penelitian ini ekstrak jamur endofit *Lecythophora* sp. 30.1 dan 30.5 dan *Kabatiella caulivora* memiliki aktivitas antimikroba. Daya antibakteri terbesar dimiliki ekstrak etil asetat, ekstrak *n*-butanol dan *n*-heksan relatif kurang. Kemungkinan kadar bahan aktif yang ada sangat kecil sehingga kurang mampu menghambat pertumbuhan mikroba uji, atau kondisi inkubasi yang kurang sesuai, karena

itu perlu dipastikan dengan cara mengubah suhu inkubasi (29-37,5 °C), memperpanjang waktu inkubasi hingga lima hari, atau dengan mengganti media (Anonim, 1995).

Tabel 5.1 Aktivitas antimikroba ekstrak *Lecythophora* sp. 30.1

Mikroba uji	E 5 mg	E10 mg	H 5mg	H10 mg	B5mg	B10 mg	K +
<i>E.coli</i> ATCC 25922	18,56	21,56	-	-	12,74	14,70	15,30
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	17,42	22,00	8,04	8,60	12,70	15,20	12,90
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	19,12	23,14	-	-	11,78	13,40	11,20
<i>S. typhimurium</i>	13,10	17,04	-	-	-	-	*
<i>B.subtilis</i> FNCC 0059	17,38	21,64	6,58	7,90	11,62	14,40	12,04
<i>C. albicans</i>	*	*	*	*	*	*	*

Tabel 5.2 Aktivitas antimikroba ekstrak *Lecythophora* sp. 30.5

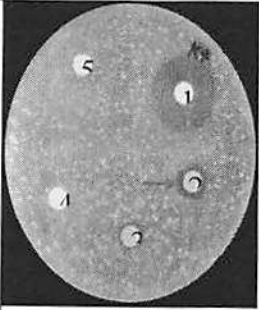
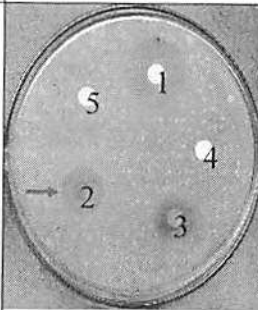
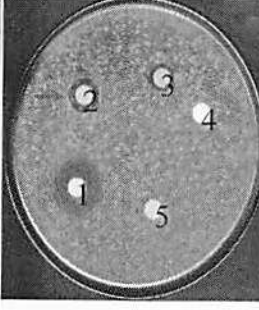
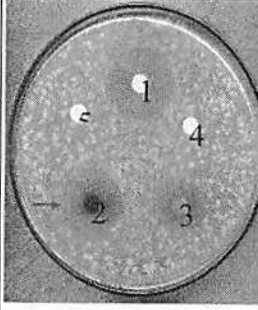
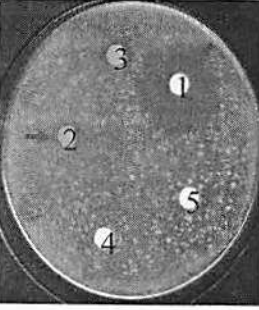
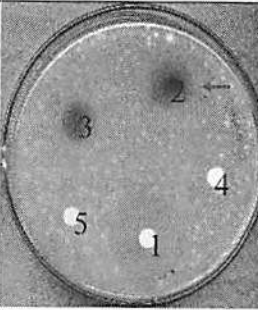
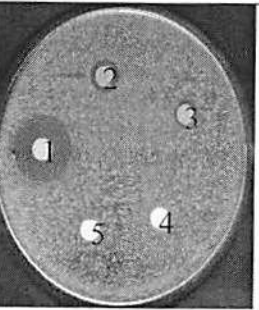
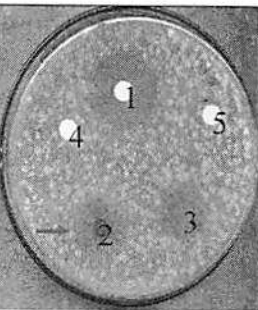
Mikroba uji	E5 mg	E10 mg	H5mg	H10 mg	B5mg	B10 mg	K +
<i>E.coli</i> ATCC 25922	18,50	21,50	-	-	12,75	14,75	15,30
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	17,40	22,10	8,00	8,75	12,70	15,20	12,90
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	19,05	23,04	-	-	11,70	13,20	11,20
<i>S. typhimurium</i>	13,00	17,09	-	-	-	-	*
<i>B. subtilis</i> FNCC 0059	17,20	21,44	6,50	7,70	11,55	14,70	12,24
<i>C. albicans</i>	*	*	*	*	*	*	*

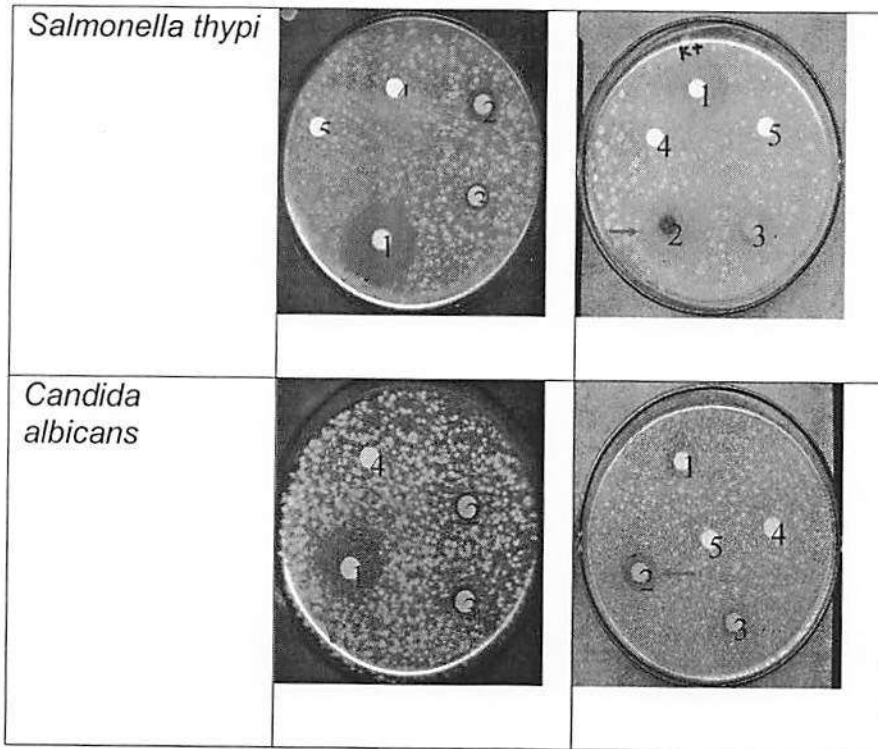
Tabel 5.3 Aktivitas antimikroba ekstrak *Kabatiella caulivora*

Mikroba uji	E 5 mg	E 10 mg	M 5mg	M 10 mg	K +
<i>E.coli</i> ATCC 25922	11.55	13.36	7.64	11.00	24.22
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	12.33	19.49	7.99	10.51	24.61
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	12.32	14.78	-	7.79	24.48
<i>S. typhimurium</i>	11.59	12.11	8.47	10.50	22.56
<i>B. subtilis</i> FNCC 0059	11.72	14.97	7.69	8.88	25.19
<i>C. albicans</i>	9.51	10.97	-	7.88	13.36

Keterangan :

E= ekstrak etil asetat, H= ekstrak *n*-heksan, B= ekstrak butanol, M= ekstrak metanol, K+ = kontrol positif: Streptomisin 2 µg, Mikonazol 0.2µg, - = tidak ada hambatan pertumbuhan, * = tidak dapat diukur/tidak dilakukan.

Mikroorganisme	Ekstrak Metanol	Ekstrak Etil asetat
<i>Bacillus subtilis</i> FNCC 0059		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		



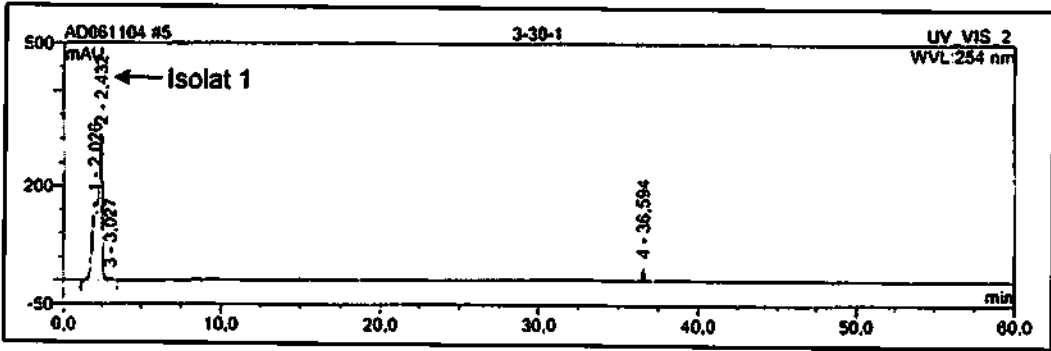
Gambar 5.1 Aktivitas Antimikroba ekstrak *Kabatiella caulivora*

Keterangan gambar: 1 = Streptomisin sulfat 100 ppm (2µg/disc); 2 = Ekstrak *Kabatiella caulivora* 10.000 µg/disc; 3 = Ekstrak *Kabatiella caulivora* 5.000 µg/disc; 4 = pelarut organik; 5 = air suling/metanol.

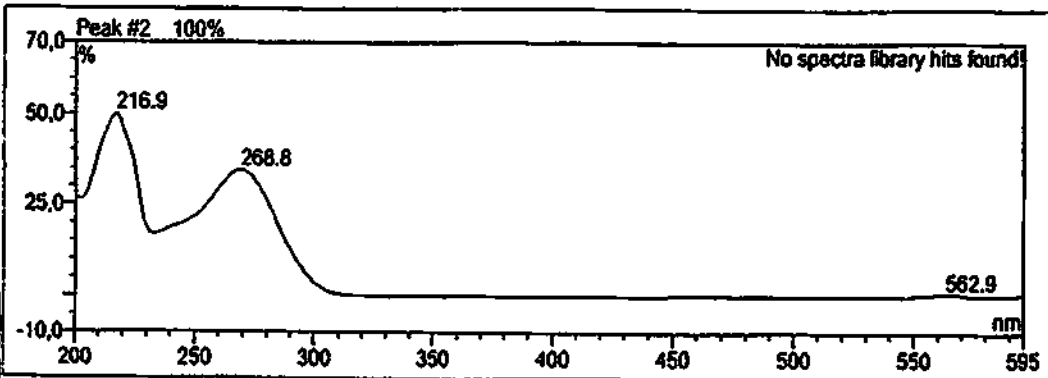
5.3 Identifikasi Metabolit

5.3.1 Isolat 1

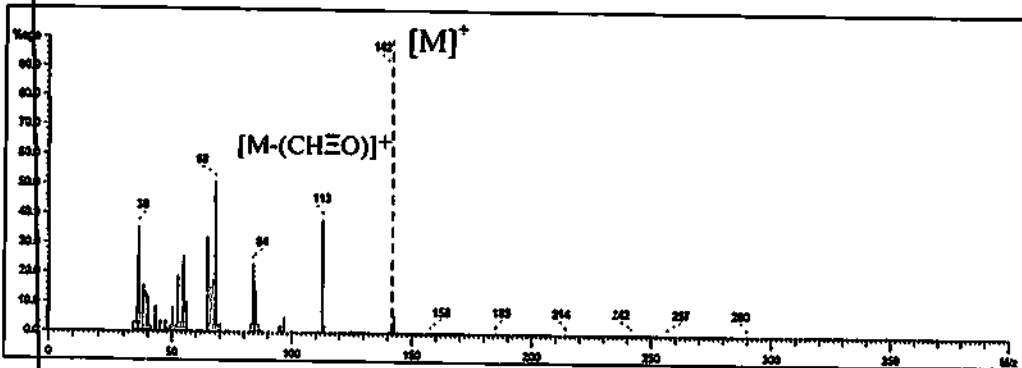
Isolat 1 merupakan kristal jarum berwarna putih kekuningan dengan titik lebur 151 – 153 °C. Diperoleh 22,7 mg isolat 1 dari 3,0 g ekstrak etil asetat. Isolat 1 juga didapatkan di ekstrak heksan dari massa sel. Pada KLT dengan Silicagel F₂₅₄ eluen kloroform : metanol : air (75 :25 :1) (v/v) diperoleh R_f 0,48, dengan etil asetat : metanol : air (100 :13,5 : 1,5) (v/v) menghasilkan R_f 0,43, sedangkan dengan eluen etil asetat : metanol (9 : 1) (v/v) diperoleh R_f 0,37. Isolat 1 dengan penampak noda UV 254 dan 365 nm memberi warna biru-ungu.



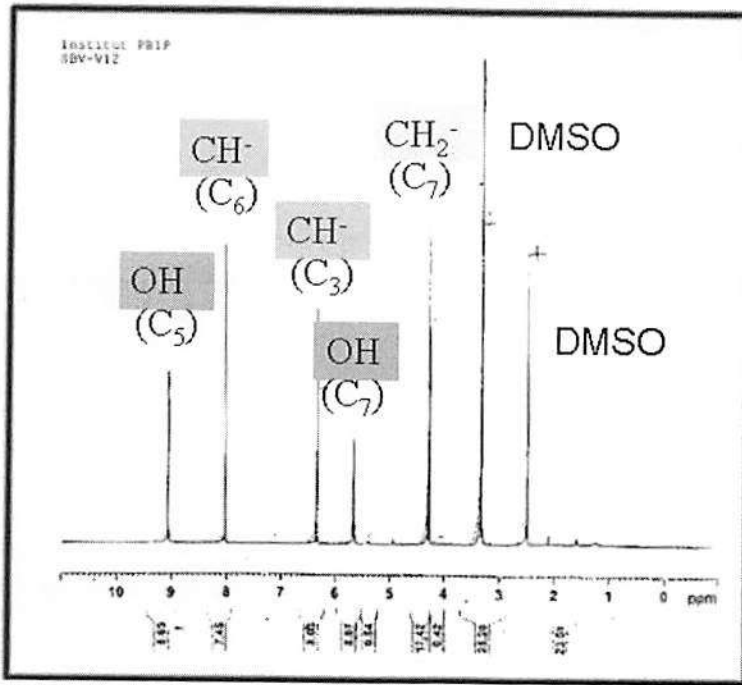
Gambar 5.2 Kromatogram HPLC isolat 1 (waktu retensi (t_r) 2,4 menit) pada λ 254 nm, kolom RP 18 (Eurospher-100 C-18), fase mobil isokratik metanol: dapar fosfat pH 2, 10:9 selama lima menit, dilanjutkan elusi gradien tiap 5 menit hingga metanol 100 % dalam 30 menit diteruskan hingga 40 menit dengan metanol 100 %. Volume yang disuntikkan 20 μ l dengan Diode Array detektor sinar ultra violet λ 235, 254, 280 dan 340 nm.



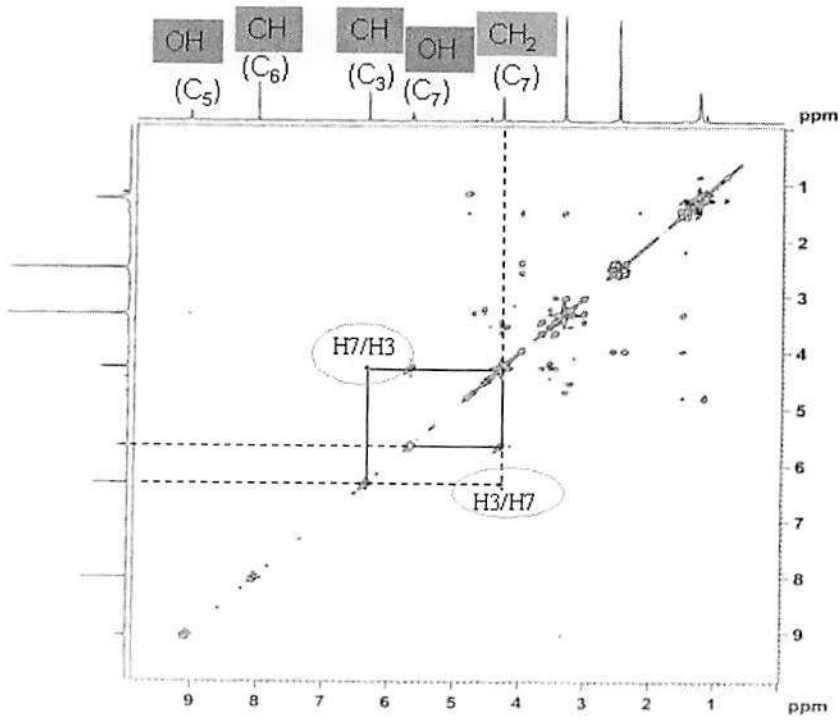
Gambar 5.3 Spektrum UV isolat 1.



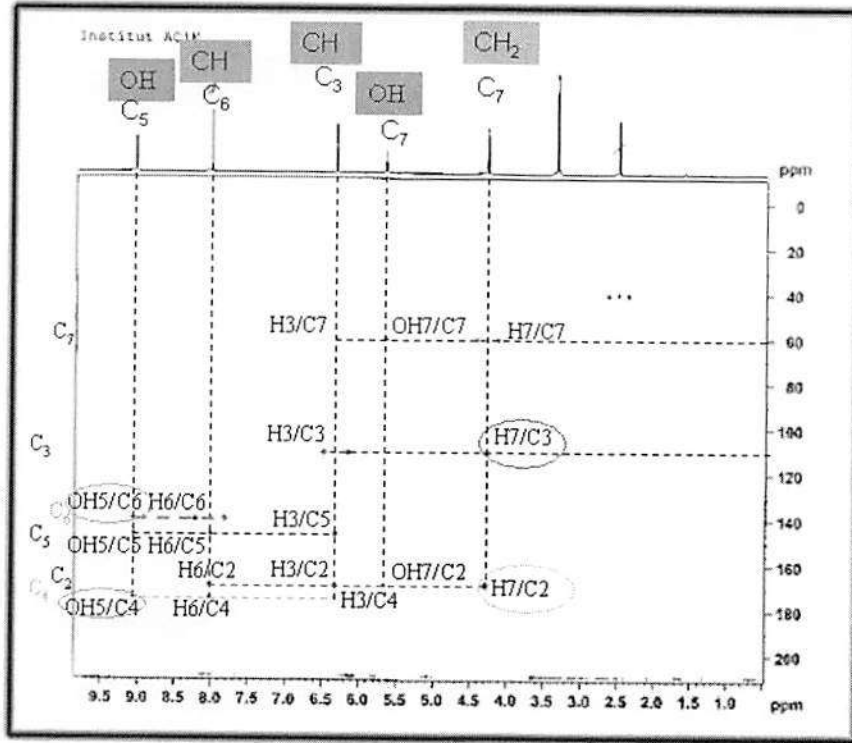
Gambar 5.4 Spektrum massa (EI-MS) isolat 1



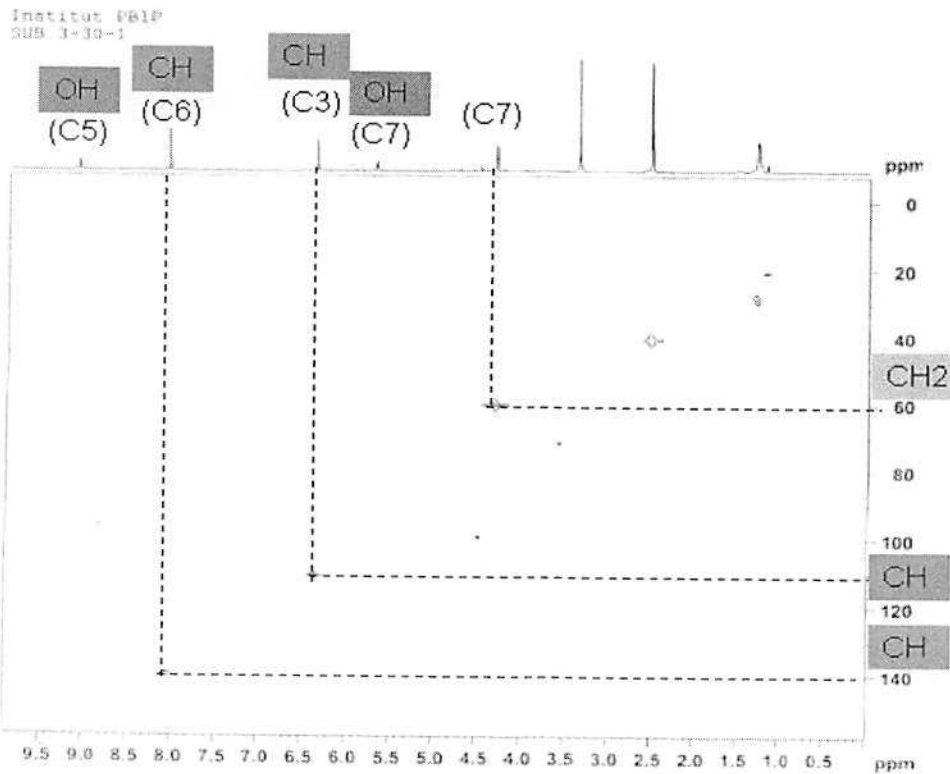
Gambar 5.5 Spektrum ^1H NMR isolat 1 (DMSO)



Gambar 5.6 Spektrum H-H COSY NMR isolat 1



Gambar 5.7 Spektrum HMBC isolat 1 (DMSO)



Gambar 5.8 Spektrum HMQC isolat 1

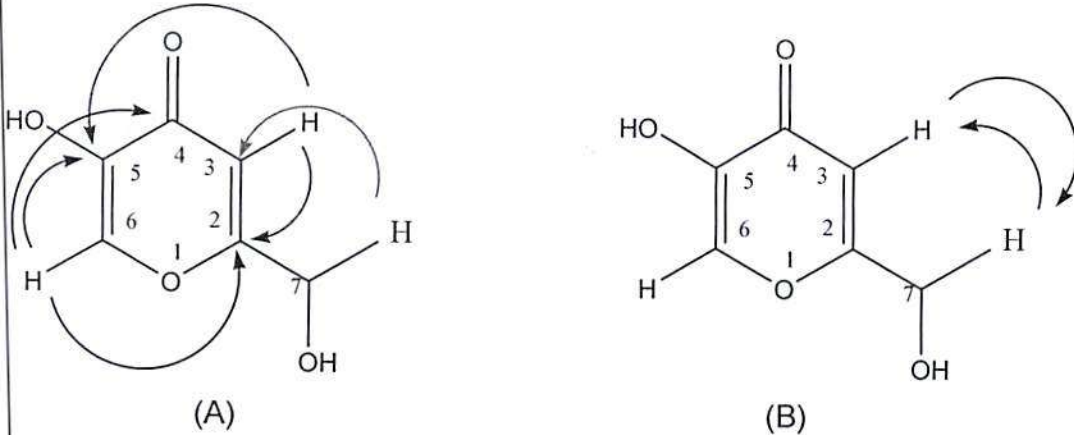
Tabel 5.4 Data NMR isolat 1

Posisi	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) asam kojat Breitmaier & Voelter, 1978	$\delta^1\text{H}$ (ppm), asam kojat pustaka Aldrich	$\delta^1\text{H}$ (ppm), $J_{\text{H-H}}$ (Hz) Isolot 1	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)* Isolot 1	HMBC (H-C) Isolot 1	$^1\text{H-H}$ COSY Isolot 1
1.						
2.	167,8			168,0 (C2)		
3	109,6	6,33 (s)	6,31 (s)	110,0 (C3)	C2,C5, C3,C7	H3, H7
4	173,5			173,8 (C4)		
5(OH)	145,4	9,02 (s)	9,04 (s)	145,7 (C5)		
6	139,0	8,00 (s)	8,01 (s)	139,2 (C6)	C2,C5, C4	
7	59,3	4,33 (d)	4,27 (d, $J=6$)	59,3 (C7)	C7,C3, C4	H7, H 3
7(OH)		5,66 (s)	5,65 (t)			

Keterangan *: Sinyal ^{13}C NMR diperoleh dari data HMBC

Isolat 1 mempunyai enam atom H yang ditunjukkan puncak doublet proton metilen (CH_2) di δ 4,27 ppm (d, $J = 6$ Hz) dengan bilangan integrasi 2, sinyal di δ 5,65 ppm (OH, t) dari gugus hidroksi dan dua sinyal singlet proton metin (CH-) di δ 6,31 ppm dan δ 8,01 ppm, gugus hidroksi di δ 9,04 ppm (OH, s). Molekul ini mempunyai enam atom karbon terlihat dari spektrum HMBC dan HMQC yaitu di δ 59,3 ppm dari metilen (CH_2), δ 110 dan δ 139,2 ppm sinyal C dengan ikatan rangkap olefinik (CH=), δ 145,7 dari C dengan ikatan rangkap terkonyugasi ($=\text{CH-CH=}$), δ 168 ppm dari C kuarternar (C-), δ di 173,8 dari C kuarternar dengan gugus karbonil (C=O). Sinyal singlet proton metin di δ 6,31 ppm dan δ 8,01 ppm sesuai dengan karakteristik proton ring inti piranon yang dilaporkan Aytemir *et al.* (2003) dan Williams and Fleming (1995). Sinyal atom C di δ 173,8 dari gugus C=O sesuai cincin piranon (Aytemir *et al.*, 2003) didukung kesesuaian data ^{13}C NMR turunan piranon yaitu asam kojat (Breitmaier and Voelter, 1978) sebagai berikut: δ 167,8 (C2), 109,6 (C3), 173,5 (C4), 145,4 (C5), 139,0 (C6) dan 59,3 (C7) maka isolat 1 ini diduga asam kojat. Adanya asam kojat dikonfirmasi dengan spektrum EI-MS

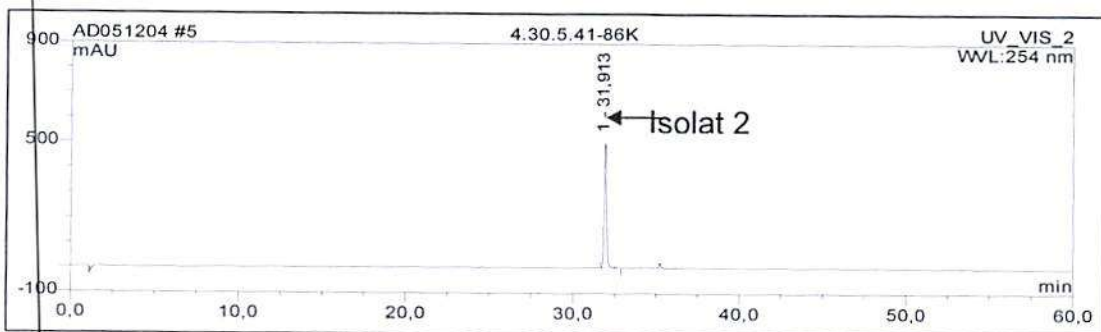
isolat 1 yang menunjukkan BM 142 $[M]^+$ dengan fragmen ion m/z 113 $[M - (CH \equiv O)]^+$ ditunjang data H-H COSY (korelasi silang puncak H3 dan H7, Gb 5.9) dan diperjelas data 2D spektrum HMBC dibandingkan pustaka Aldrich disimpulkan isolat 1 adalah senyawa kimia 5-hidroksi-2 (hidroksimetil)-4H-piran-4-on atau asam kojat.



Gambar 5.9 Korelasi HMBC (A) dan korelasi H-H COSY (B) 5-hidroksi-2 (hidroksimetil)-4H-piran-4-on

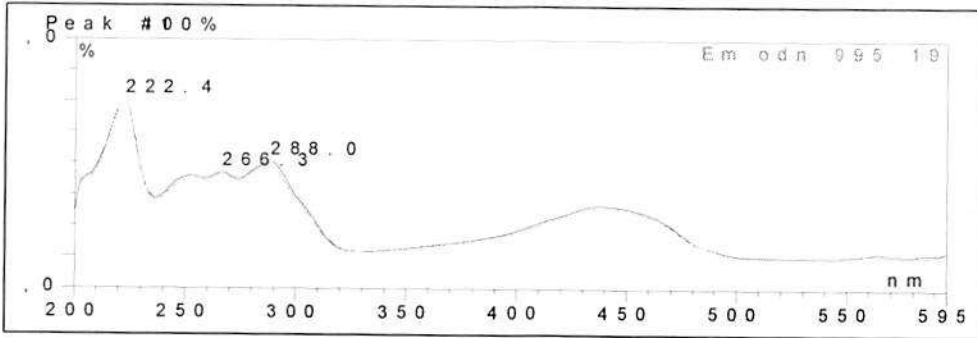
5.3.2 Isolat 2

Isolat 2 kristal oranye, dari 2,3 g ekstrak heksan diperoleh 7 mg, juga dari ekstrak etil asetat. KLT Silicagel F₂₅₄ eluen kloroform : metanol (9:1) (v/v) diperoleh noda oranye R_f 0,80; dengan diklormetan : metanol (9:1) (v/v) R_f 0,68; dengan RP-18 asetonitril : metanol : air (2:1:1) (v/v) didapat noda oranye R_f 0,37.

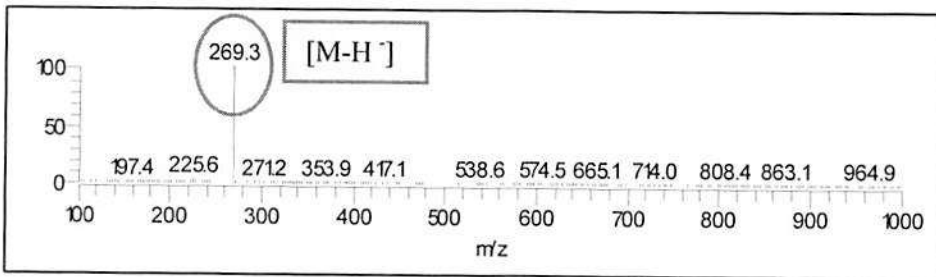


Gambar 5.10 Kromatgram HPLC isolat 2 (waktu retensi 31,913 menit) pada λ 254 nm, kolom RP 18 (Eurospher-100 C-18) fase mobil isokratik metanol: dapar fosfat pH 2, (10:9) selama lima menit, dilanjutkan elusi gradien tiap 5 menit hingga metanol 100 % dalam 30 menit diteruskan hingga 40 menit dengan metanol

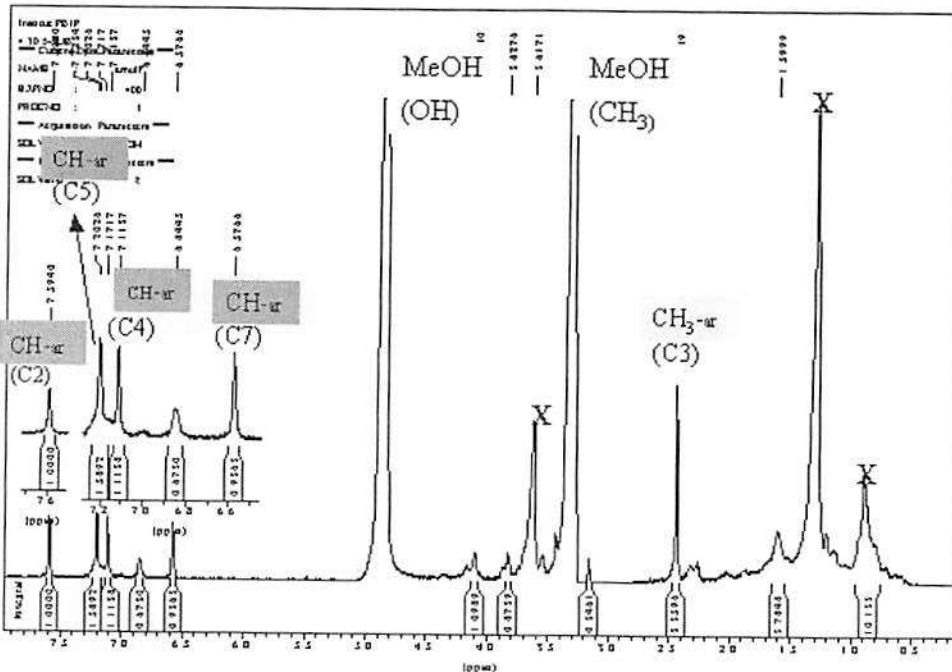
100 %. Volume yang disuntikkan 20 μ l dengan Diode Array detektor sinar ultra violet λ 235, 254, 280 dan 340 nm



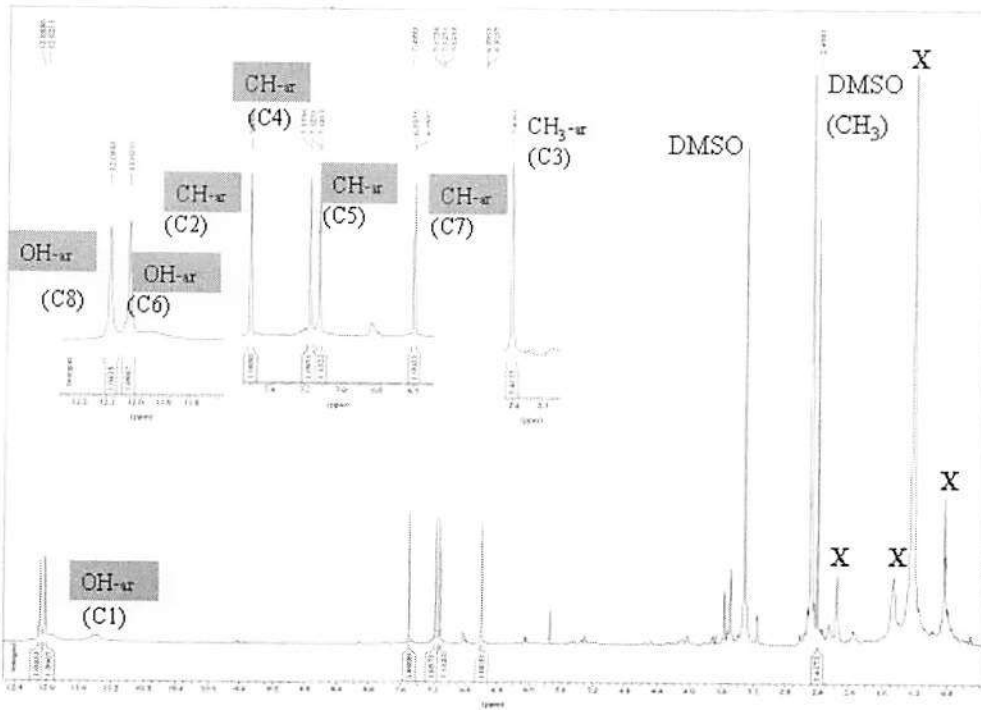
Gambar 5.11 Spektrum UV isolat 2



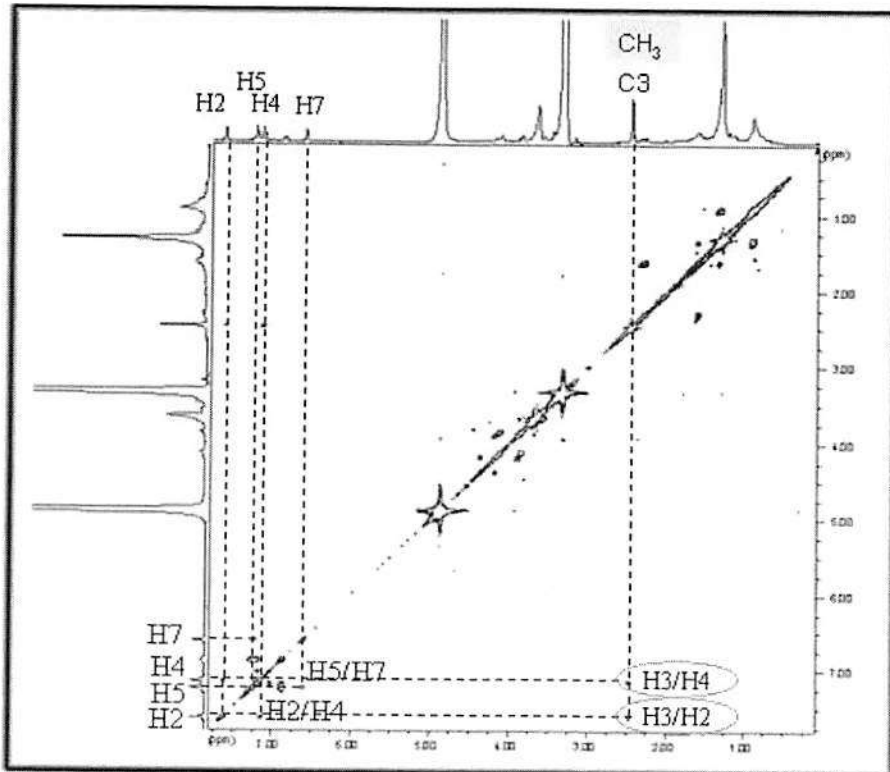
Gambar 5.12 Spektrum massa negatif ESI-MS isolat 2



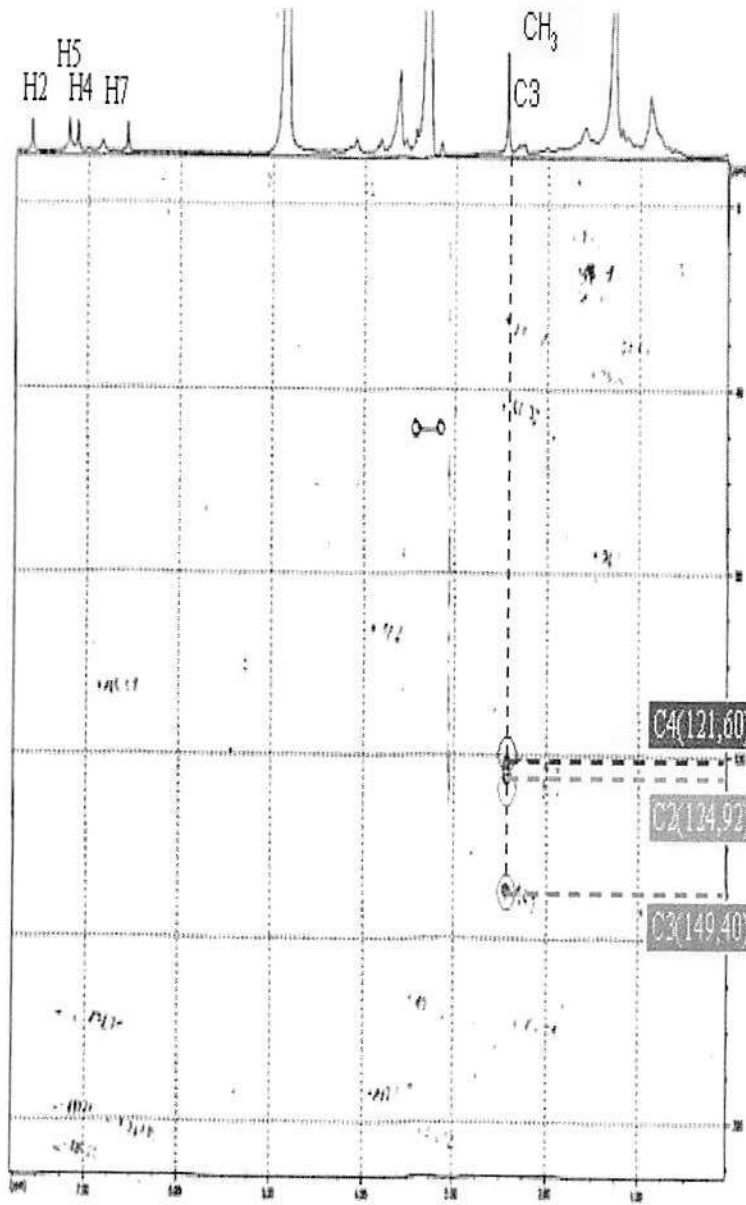
Gambar 5.13 Spektrum ^1H NMR isolat 2 (MeOD)



Gambar 5.14 Spektrum ^1H NMR isolat 2 (DMSO)



Gambar 5.15 Spektrum H-H COSY NMR isolat 2 (MeOD)



Gambar 5. 16 Spektrum HMBC NMR isolat 2

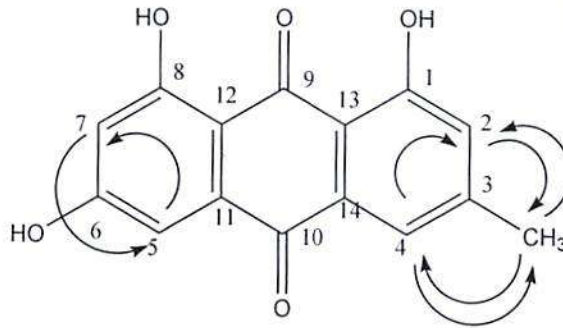
Tabel 5.5 Data NMR isolat 2

Posisi	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm), J(Hz)/DMS emodin (Cohen &Towers, 1995)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) * isolat 2	$\delta^1\text{H}$ (ppm) J (Hz) MeOD emodin Hefni, 2004	$\delta^1\text{H}$ (ppm) J (Hz) MeOD isolat 2	$\delta^1\text{H}$ (ppm) J (Hz) DMSO emodin Hefni, 2004	$\delta^1\text{H}$ (ppm) J (Hz) DMSO isolat 2	COSY (H-H) isolat 2
1(OH)	161,90(s)				12,23(s)	11,40 (s)	
2	124,80(d)	124,9	7,54(s)	7,59 (s)	7,45 (s)	7,52 (d,1,8)	H3 (CH ₃), H4
3	149,30(s)	149,4					
3 (CH ₃)			2,42 (s)	2,30 (s)	2,38 (s)	2,42 (s)	H2, H4
4	121,20(d)	121,6	7,06 (s)	7,11(s)	7,10(s)	7,14 (d,2,5)	H2, H3 (CH ₃)
5	109,70(d)		7,30 (d,2,0)	7,20 (d,2,5)	6,88 (s)	7,19 (d,1,65)	H7
6 (OH)	167,00(s)					12,03 (s)	
7	108,60(d)		6,47 (d,2,0)	6,57 (d,2,5)	6,19 (s)	6,61 (d,2,5)	H5
8 (OH)	165,90(s)				12,49(s)	12,10 (s)	
9	191,90(s)						
10	182,20(s)						
11	136,60(s)						
12	110,00(s)						
13	114,40(s)						
14	134,00(s)						

Keterangan * :Sinyal ^{13}C NMR diperoleh dari data HMBC

Isolat 2 zat berwarna oranye, pada KLT dengan Silicagel F₂₅₄ eluen kloroform : metanol (9:1)(v/v) diperoleh noda oranye dengan R_f 0,80 dan dengan pereaksi penampak noda NaOH memberi warna merah. Analisis HPLC didapatkan puncak dengan waktu retensi t_r 31,9 menit.

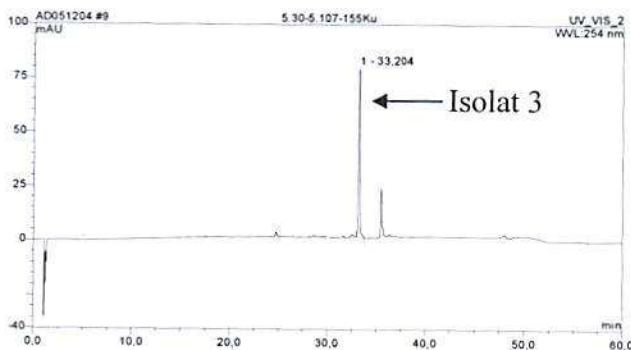
Isolat 2 mempunyai 10 atom H yang ditunjukkan sinyal proton singlet di δ 2,42 ppm dengan bilangan integrasi tiga dari gugus metil aromatis (CH₃) dan sinyal di δ 6,61 (d, J = 2,5 Hz); 7,14 (d, J = 2,5 Hz); 7,19 (d, J = 1,65 Hz) dan 7,52 (d, J = 1,8 Hz) dari empat proton metin aromatik Tiga gugus hidroksi (OH) ditunjukkan oleh sinyal proton singlet di δ 11,40; 12,03 dan 12,10 ppm (dalam DMSO). Terlihat dari spektrum HMBC sinyal atom karbon dengan katan rangkap olefinik (CH=) di δ 121,6 ppm dan δ 124,9 ppm, serta di δ 149,4 ppm dari sinyal atom karbon dengan ikatan rangkap terkonyugasi (=CH-CH=) atau aromatis. Sinyal proton singlet tiga gugus hidroksi di δ 11,40; 12,03 dan 12,10 ppm sesuai dengan karakteristik golongan antrakuinon yaitu sinyal hidroksi di δ ~ 12 (Lee *et al.*, 2001). Korelasi meta ditunjukkan oleh puncak doublet dan tetapan kopling 2,5 Hz (δ 6,61 ppm, H7) dan 1,65 Hz (δ 7,19 ppm, H5). Korelasi H5 dengan H7 ini juga terlihat pada spektrum COSY. Posisi meta antara sinyal proton di δ 7,52 ppm (H2) dan δ 7,14 ppm (H4) terlihat dari korelasi COSY juga puncak silang sinyal proton singlet CH₃ (s, δ 2,42 ppm) dengan δ 7,52 (H2) dan δ 7,14 ppm (H4) yang menunjukkan ada *long range coupling* COSY. Antrakuinon dengan gugus metil (δ 2,42 ppm) dan tiga gugus hidroksi di δ 11,40; 12,03 dan 12,10 ppm di C1, C6 dan C8 ditunjang profil spektrum UV yang identik maka isolat 2 ini diduga emodin. Adanya emodin dikonfirmasi dengan spektrum negatif ESI-MS isolat 2 yang menunjukkan [M-H]⁻ 269, sehingga BM senyawa 270 ditunjang data H-H COSY (korelasi silang puncak H2, H4 dan CH₃ serta H5 dan H7) diperjelas data HMBC yaitu ada korelasi puncak silang sinyal metil aromatis (C3) di δ 149,4 ppm dengan δ 124,9 ppm (C2) dan δ 121,6 ppm (C4) yang sesuai Hefni, 2004; Cohen & Towers (1995); Ham and Kim (1994) disimpulkan senyawa isolat 2 adalah 1,6,8,-trihidroksi-3-metil-antrakuinon.



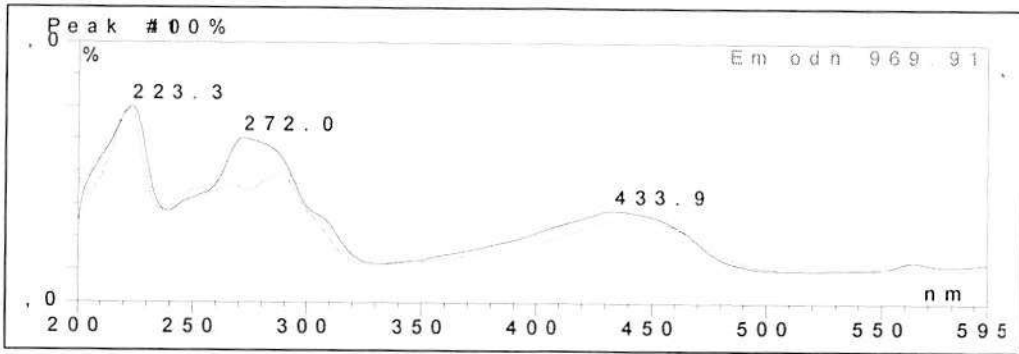
Gambar 5.17 Korelasi H-H COSY 1,6,8,-trihidroksi-3-metil-antrakuinon

5.3.3 Isolat 3

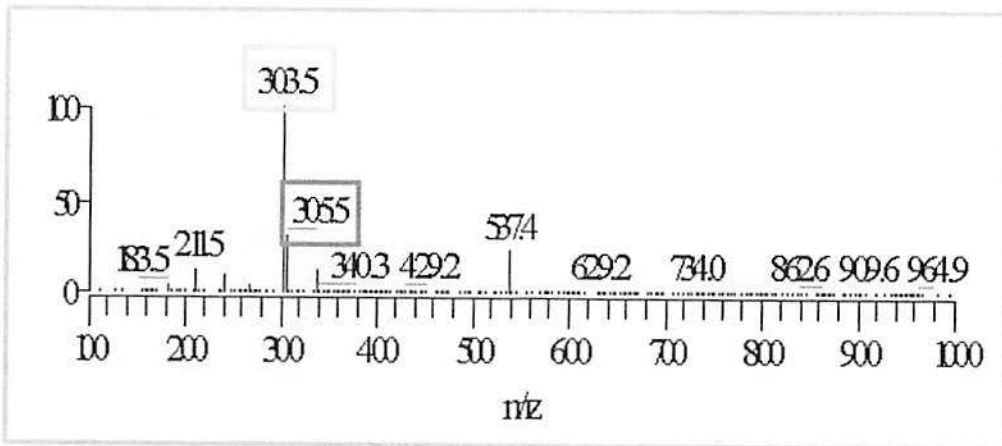
Isolat 3 merupakan kristal berwarna oranye dari 2,3 g ekstrak heksan diperoleh 6,6 mg, juga didapatkan dari ekstrak etil asetat. KLT dengan Silicagel F₂₅₄ eluen kloroform : metanol (9:1) (v/v) didapatkan noda oranye R_f 0,60, dengan eluen diklormetan : metanol (9:1) (v/v) R_f 0,75.



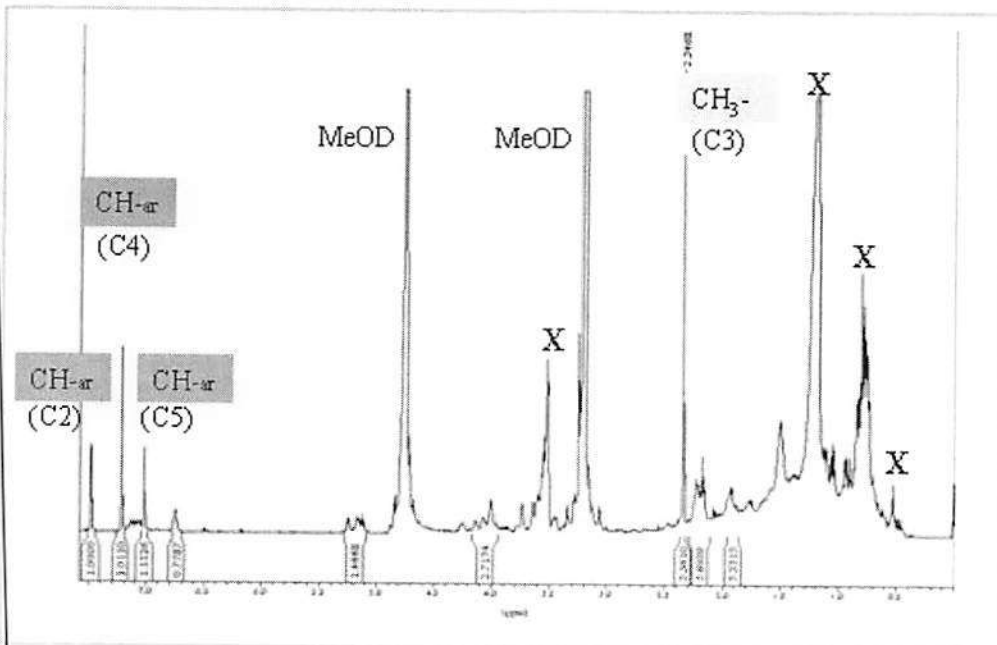
Gambar 5.18 Kromatogram HPLC isolat 3 (waktu retensi 33,204 menit) pada λ 254 nm, kolom RP 18 (Eurospher-100 C-18), fase mobil isokratik metanol: dapar fosfat pH 2, (10:9) lima menit, dilanjutkan elusi gradien tiap 5 menit hingga metanol 100 % dalam 30 menit diteruskan hingga 40 menit dengan metanol 100 %. Volume yang disuntikkan 20 μ l dengan Diode Array detektor sinar ultra violet λ 235, 254, 280 dan 340 nm



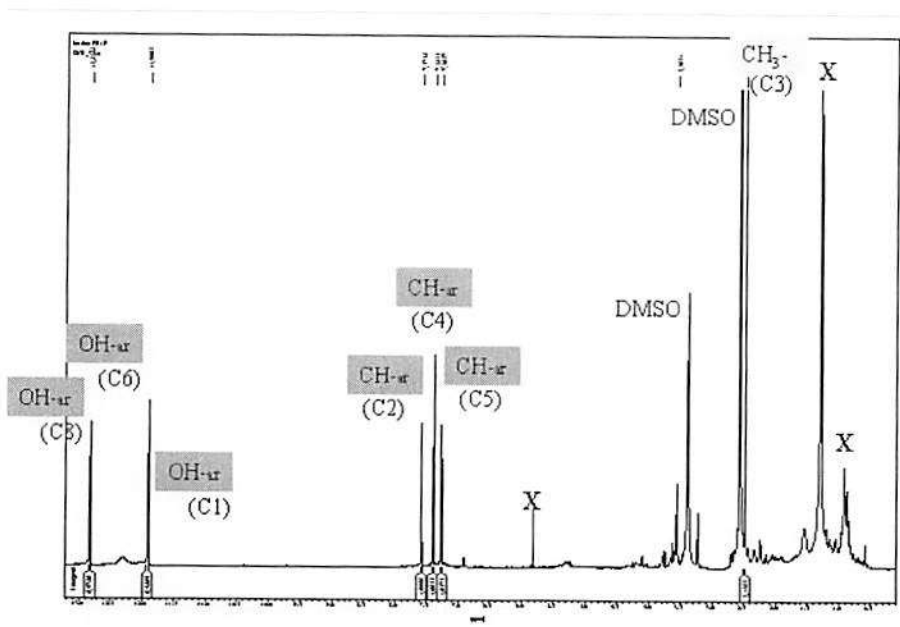
Gambar 5.19 Spektrum UV isolat 3



Gambar 5.20 Spektrum massa negatif ESI-MS isolat 3



Gambar 5.21 Spektrum ^1H NMR isolat 3 (MeOD)



Gambar 5.22 Spektrum ¹H NMR isolat 3 (DMSO)

Tabel 5.6 Data NMR isolat 3.

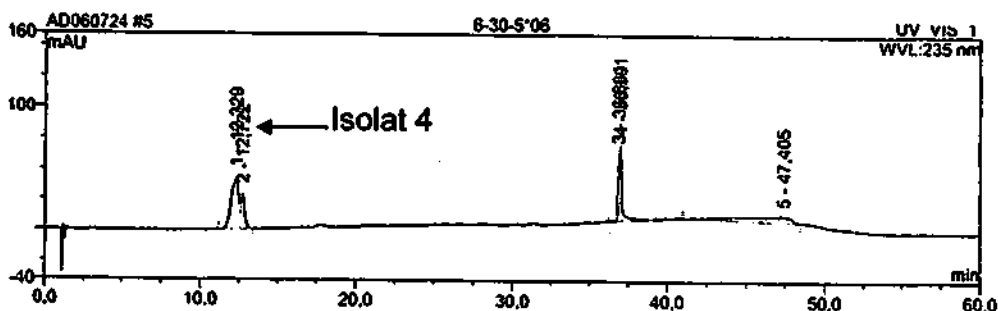
Posisi	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm), 7-kloremodin (Cohen&Towers, 1995)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) J (Hz) isolat 3 MeOD	$\delta^1\text{H}$ (ppm) DMSO 7- kloremodin (Cohen &Towers, 1995)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) J (Hz) isolat 3 DMSO
1(OH)	161,40		11,92 (s)	11,90 (s)
2	124,00	7,58(s)	7,14 (s)	7,57(s)
3	148,50			
3 (CH ₃)		2,44(s)	2,48 (s)	2,48 (s)
4	120,40	7,32(s)	7,50 (s)	7,38 (s)
5	108,60	7,12(s)	7,26 (s)	7,26 (s)
6 (OH)	163,10			12,20 (s)
7	121,30			
8 (OH)	162,80		12,78 (s)	12,82 (s)
9	191,00			
10	181,70			
11	133,00			
12	110,10			
13	114,20			
14	133,20			
15	21,60			

Isolat 3 berwarna oranye, pada KLT dengan Silicagel F₂₅₄ eluen kloroform : metanol (9:1) (v/v) diperoleh noda oranye dengan Rf 0,60 yang dengan pereaksi penampak noda NaOH memberi warna merah. Pada analisis HPLC didapatkan puncak dengan waktu retensi t_r 33,3 menit (t_r emodin 31,9 menit), profil spektrum UV isolat 3 mirip emodin tapi hasil tiga sistem KLT menunjukkan Rf senyawa ini berbeda dari emodin, dengan demikian diduga merupakan turunan emodin. Spektrum negatif ESI-MS menunjukkan [M-H]⁻ di m/z 303,5 dan 305,5 dengan ratio 3:1, karakteristik untuk senyawa dengan satu unsur Cl (Silverstein and Webster, 1998). Menurut Cohen dan Towers (1995a) dikenal 5-kloroemodin dan 7-kloroemodin, diduga isolat 3 salah satu dari kedua senyawa tersebut.

Sinyal proton tiga gugus hidroksi di δ~12 yang karakteristik golongan antrakuinon (Lee *et al.*, 2001) tampak di δ 11,05; 11,87; 12,78 ppm. Atom Cl terikat pada posisi 7 ditunjukkan oleh ketiga sinyal di δ 7,20 (s); 7,31 (s); 7,52 (s) ppm (DMSO) dari tiga proton metin (CH) aromatik sebagai singlet, sesuai dengan 7-kloroemodin (Cohen dan Towers, 1995a). Hasil analisis 1D NMR, ESI-MS dibandingkan dengan pustaka (Cohen & Towers, 1995a dan 1996a), disimpulkan isolat 4 adalah 7-kloroemodin atau 1,6,8,-trihidroksi-3-metil-7-kloro-antrakuinon

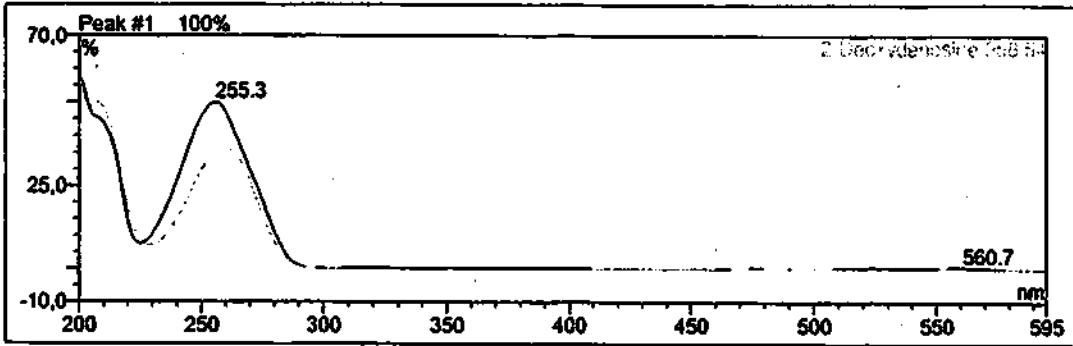
5.3.4 Isolat 4

Isolat 4 merupakan kristal putih, dari 3,8 g ekstrak etilasetat diperoleh 62 mg. Pada KLT dengan Silicagel F₂₅₄ menggunakan eluen kloroform : metanol (9:1) (v/v) didapatkan noda positif UV pada λ 254 dan 365 nm dengan Rf 0,57.

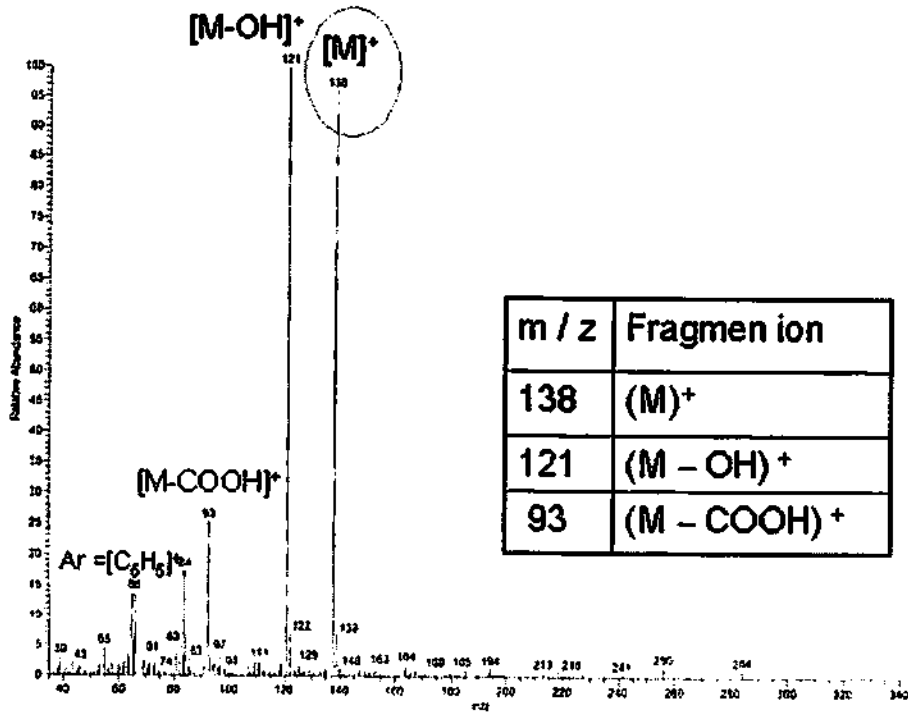


Gambar 5.23 Kromatogram HPLC isolat 4 (waktu retensi 12,7 menit) pada λ 235 nm kolom RP 18 (Eurospher-100 C-18), fase mobil isokratik

metanol: dapar fosfat pH 2, (10:9) selama lima menit, dilanjutkan elusi gradien tiap 5 menit hingga metanol 100 % dalam 30 menit diteruskan hingga 40 menit dengan metanol 100 %. Volume yang disuntikkan 20 µl dengan Diode Array detektor sinar ultra violet λ 235, 254, 280 dan 340 nm



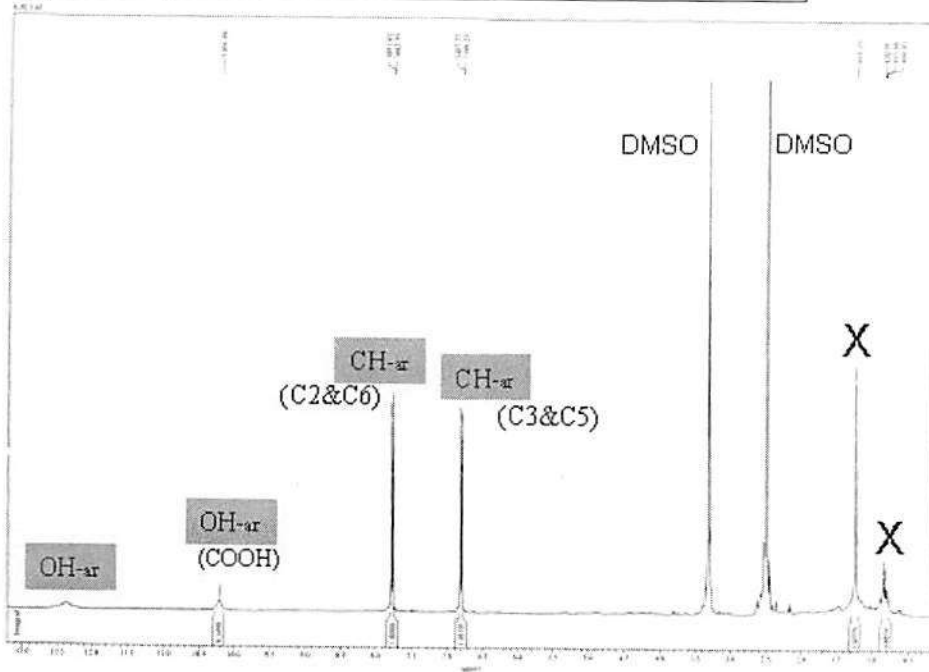
Gambar 5.24 Spektrum UV isolat 4



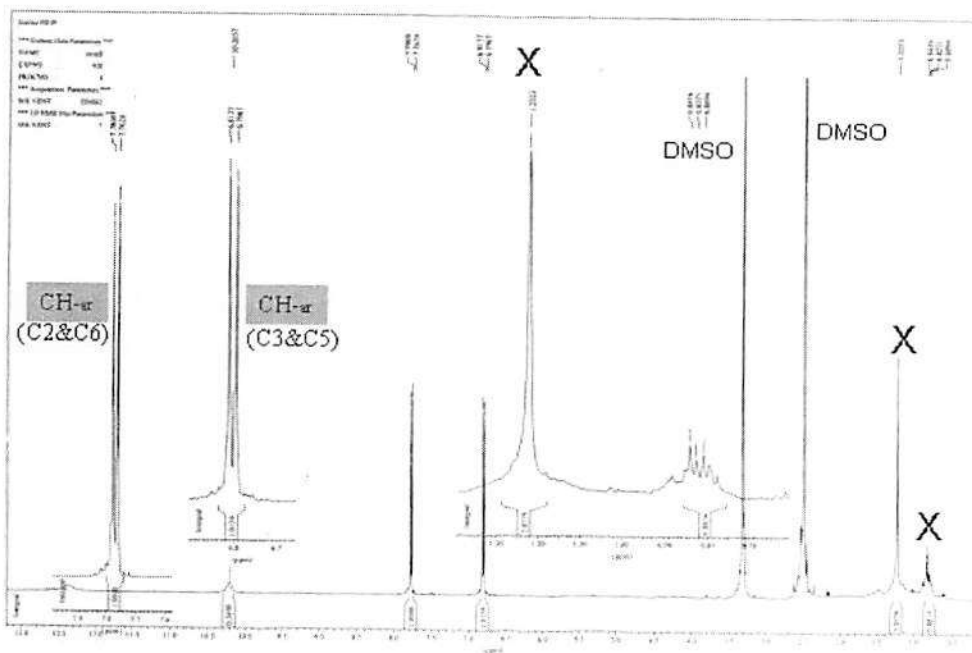
Gambar 5.25 Spektrum massa (EI-MS) isolat 4

Tabel 5.7 Hasil pengamatan spektrum massa (EI-MS) isolat 4

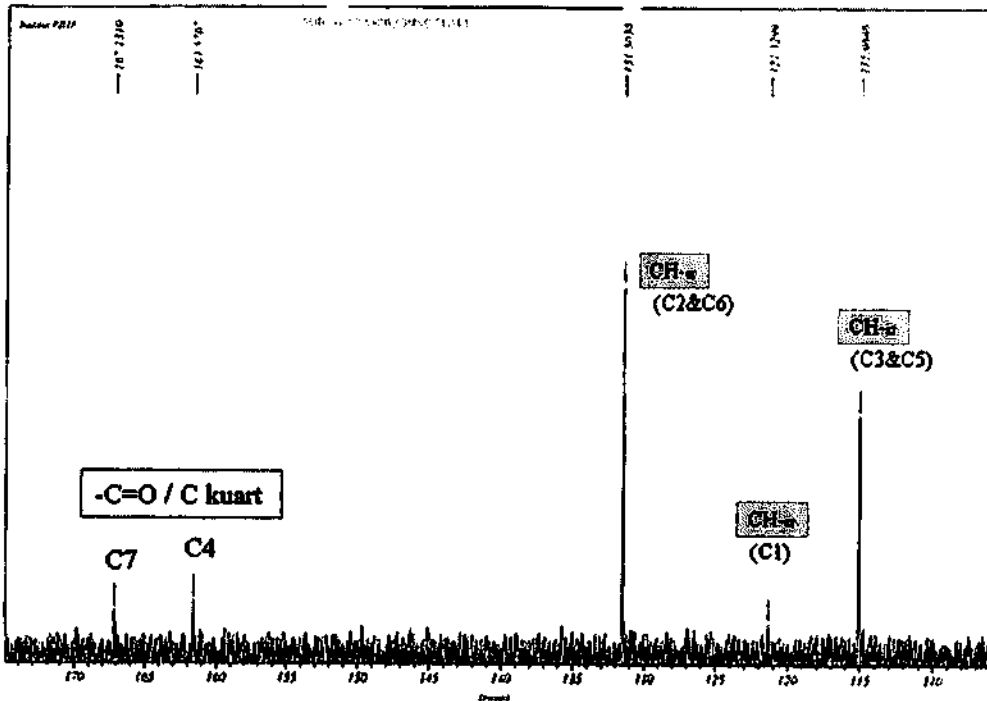
m / z	Fragmen ion	Intensitas relatif %
138	(M) ⁺	97
121	(M - OH) ⁺	100
93	(M - COOH) ⁺	25



Gambar 5.26 Spektrum ¹H NMR isolat 4 (DMSO)



Gambar 5.27 Spektrum ¹H NMR isolat 4 (DMSO) yang diperbesar



Gambar 5.28 Spektrum ¹³C NMR isolat 4 (DMSO)

Tabel 5.8 Data NMR isolat 4

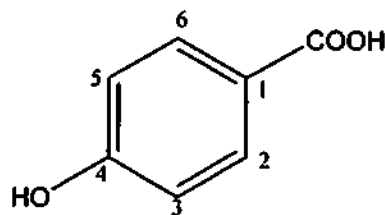
Posisi	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) asam 4-hidroksi-benzoat (Aldrich)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) DMSO Isolat 4	$\delta^1\text{H}$ (ppm) asam 4-hidroksi-benzoat (Aldrich), $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$	$\delta^1\text{H}$ (ppm), (J = Hz) DMSO isolat 4
1 (C kuarternar)	121,40	121,3 (C1)		δ 10,20 OH dari fenolik
4 (C oksid - aril)	161,55	161,5 (C4)		δ 12,35 OH gugus COOH
2 dan 6 (C aromatis)	131,46	131,5 (C2, C6)	7,80 (d)	7,77 (d, 8,8)
3 dan 5 (C aromatis)	114,96	115,1 (C3, C5)	6,80 (d)	6,80 (d, 8,15)
7 (C karbonil)	167,49	167,1 (C7)		

Isolat 4 memiliki enam atom H ditunjukkan oleh adanya dua pasang sinyal proton doublet di δ 6,80 ppm (d, $J = 8,15$ Hz) dan δ 7,77 ppm (d, $J = 8,8$ Hz) dari empat proton metin pada daerah aromatik. Dua gugus hidroksi ditunjukkan oleh puncak proton pada δ 10,20 ppm dan δ 12,35 ppm (dalam DMSO). ^{13}C NMR menunjukkan isolat 4 memiliki atom C karbonil atau C kuarternar pada δ 167,1 ppm dan δ 161,6 ppm, atom C aromatis atau ikatan rangkap olefinik ($\text{CH}=\text{}$) memberi puncak pada δ 115,1; 121,3 dan 131,5 ppm. Data spektrum UV menunjukkan puncak di 255,3 nm yang karakteristik untuk molekul dengan inti aromatis.

Adanya sepasang doublet dalam daerah aril karakteristik untuk benzena tersubstitusi 1,4 (Pavia *et al.*, 1996). Korelasi orto ditunjukkan oleh tetapan kopling 8,8 Hz (δ 7,77 ppm, H2 dan H6) dan 8,15 Hz (δ 6,80 ppm, H3 dan H5).

Data EI-MS menunjukkan $[\text{M}]^+$ di m/z 138, fragmentasi di m/z 121 $[\text{M} - \text{OH}]^+$ dan di m/z 93 $[\text{M} - \text{COOH}]^+$ dan m/z 65 $[\text{C}_5\text{H}_5]^+$ yang khas untuk inti aromatis, diduga senyawa ini adalah benzena tersubstitusi 1,4 dengan substituen gugus OH dan COOH, yaitu asam p-hidroksibenzoat.

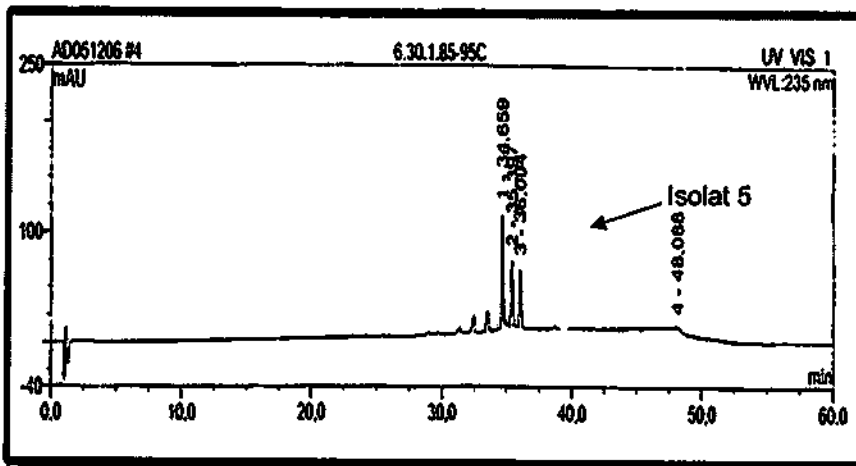
Konfirmasi asam p-hidroksibenzoat ditunjang oleh data molekul ini aromatis simetris, adanya hidroksi pada δ 10,20 ppm dan δ 12,35 ppm (OH fenolik dan OH dari COOH). ^{13}C NMR menunjukkan δ 167,1 ppm (C7), δ 161,6 ppm (C4), δ 131,5 ppm (C2 dan C6), δ 121,3 ppm (C1) dan δ 115,1 (C3 dan C5) dan ^1H NMR yang sesuai data base SDBS (SDBS for Organic Compounds., <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbssrv/>) dengan BM 138, dibandingkan pustaka Aldrich disimpulkan isolat 5 adalah asam p-hidroksibenzoat.



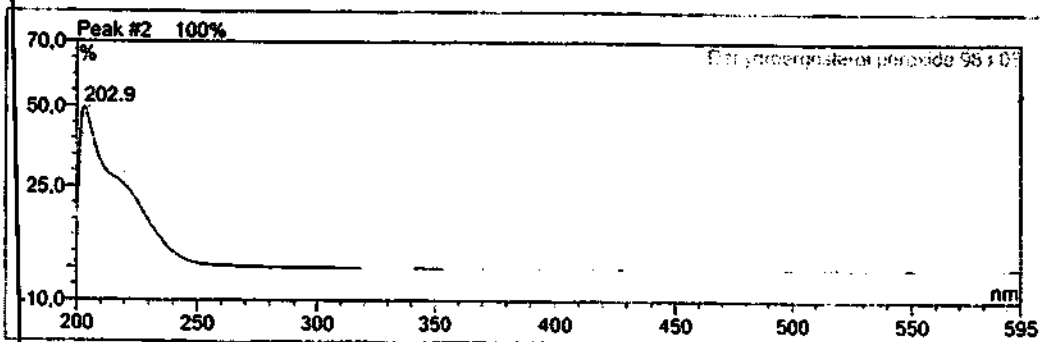
Gambar 5. 29 Asam p-hidroksibenzoat

5.3.5 Isolat 5

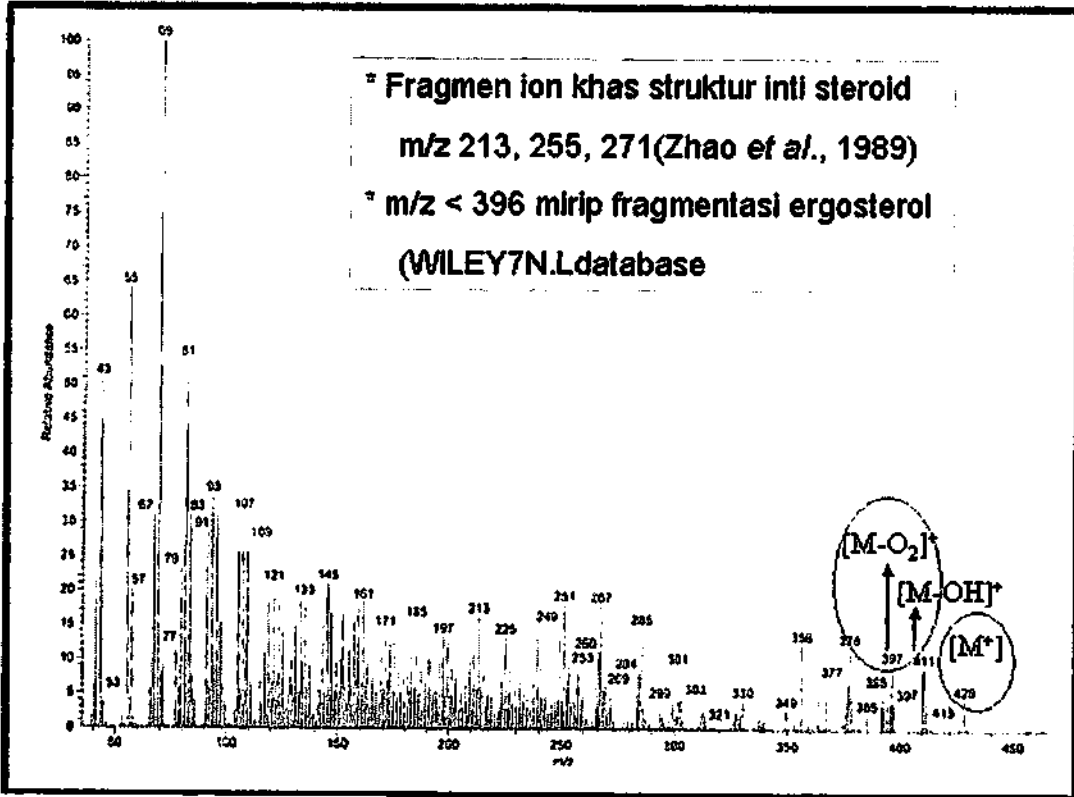
Isolat 5 merupakan kristal putih, dari 2,3 g ekstrak heksan diperoleh 2,1 mg. KLT dengan Silicagel F₂₅₄ menggunakan eluen diklormetan : metanol (9:1)(v/v) diperoleh Rf 0,28 yang dengan penampak noda anisaldehyd-H₂SO₄ memberi warna biru-ungu.



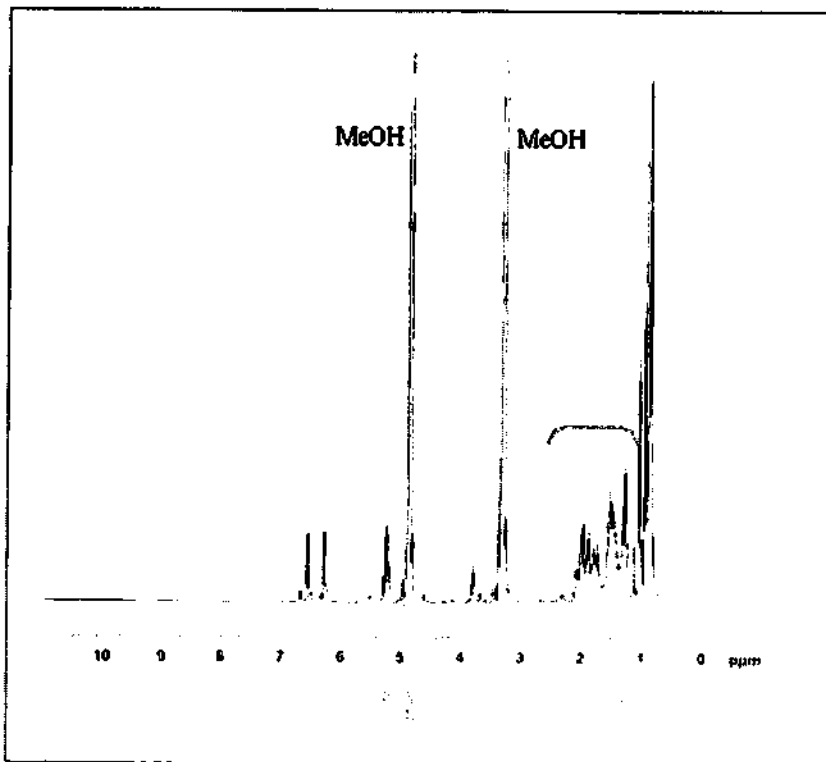
Gambar 5.30 Kromatogram HPLC isolat 5 (waktu retensi 36,369 menit) pada λ 235 nm kolom RP 18 (Eurospher-100 C-18), fase mobil isokratik metanol: dapar fosfat pH 2, (10:9) selama lima menit, dilanjutkan elusi gradien tiap 5 menit hingga metanol 100 % dalam 30 menit diteruskan hingga 40 menit dengan metanol 100 %. Volume yang disuntikkan 20 μ l dengan Diode Array detektor sinar ultra violet λ 235, 254, 280 dan 340 nm.



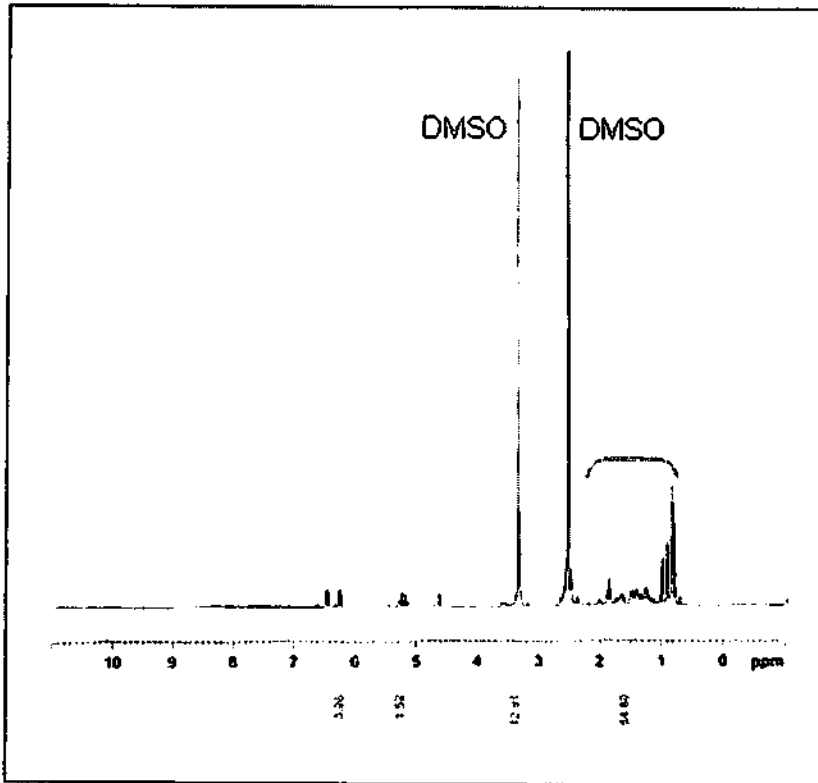
Gambar 5.31 Spektrum UV isolat 5



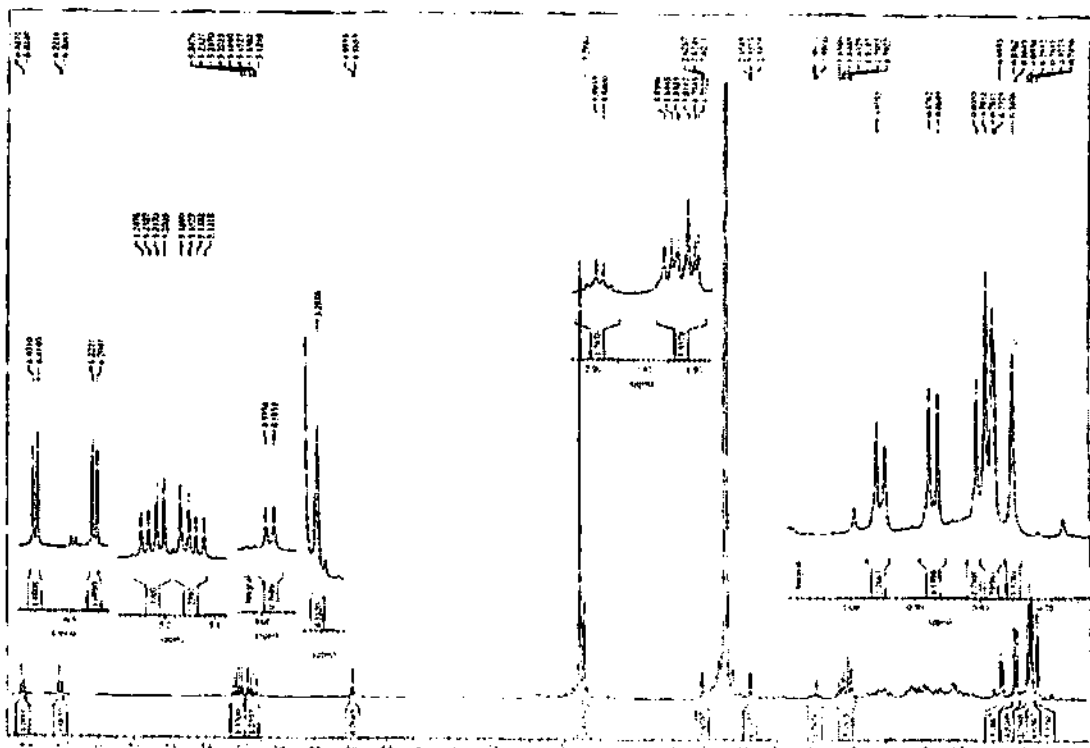
Gambar 5.32 Spektrum massa (EI-MS) isolat 5



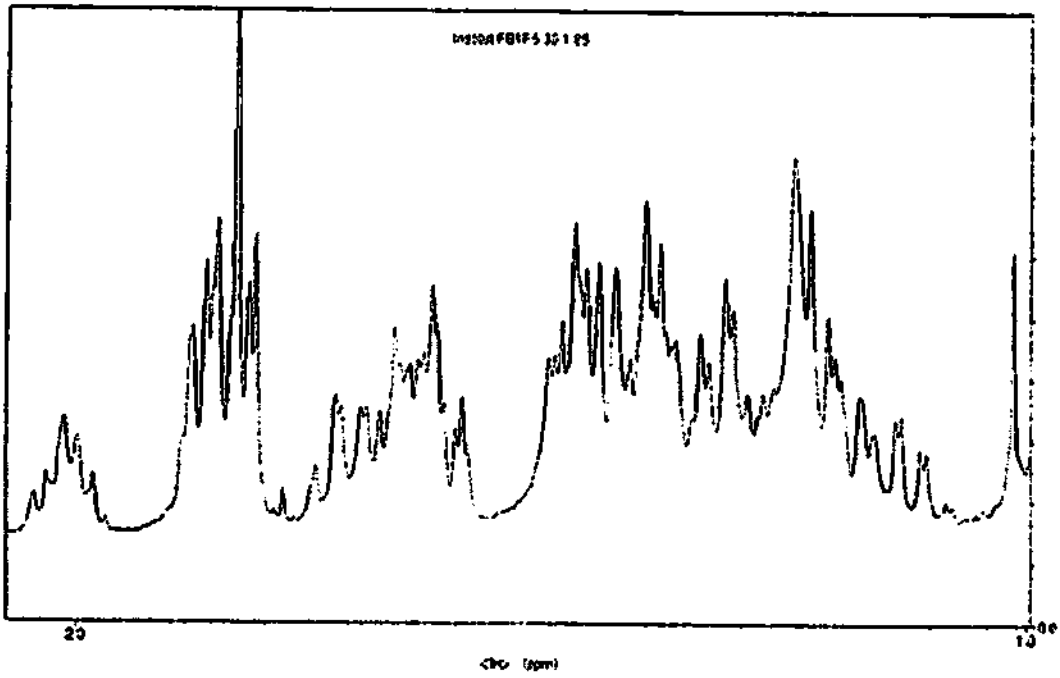
Gambar 5.33 Spektrum ^1H NMR isolat 5 (MeOD)



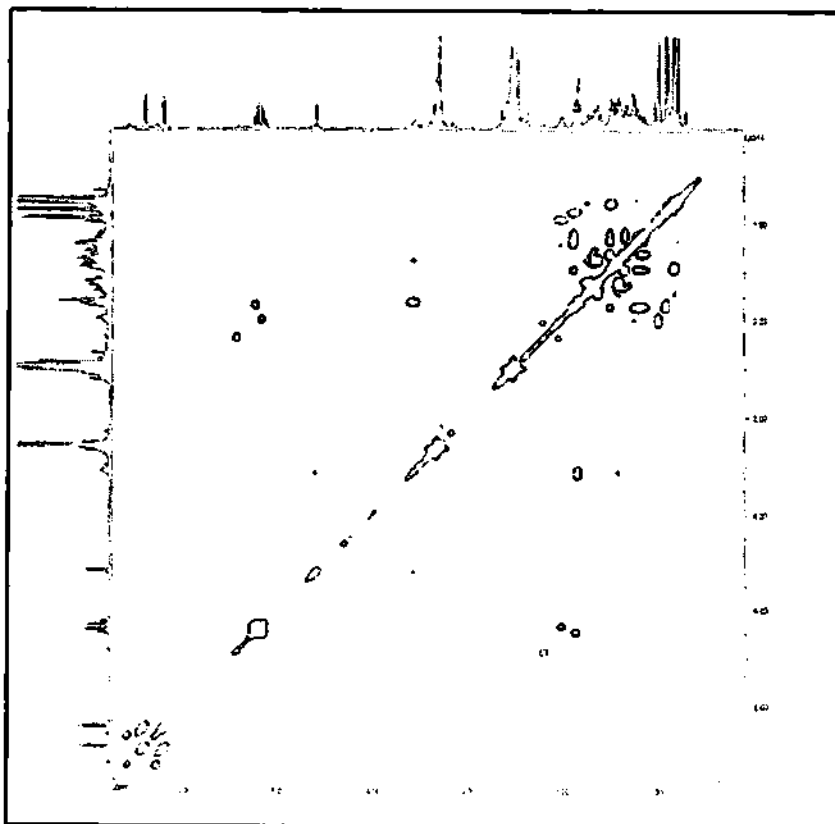
Gambar 5.34 Spektrum ^1H NMR isolat 5 (DMSO)



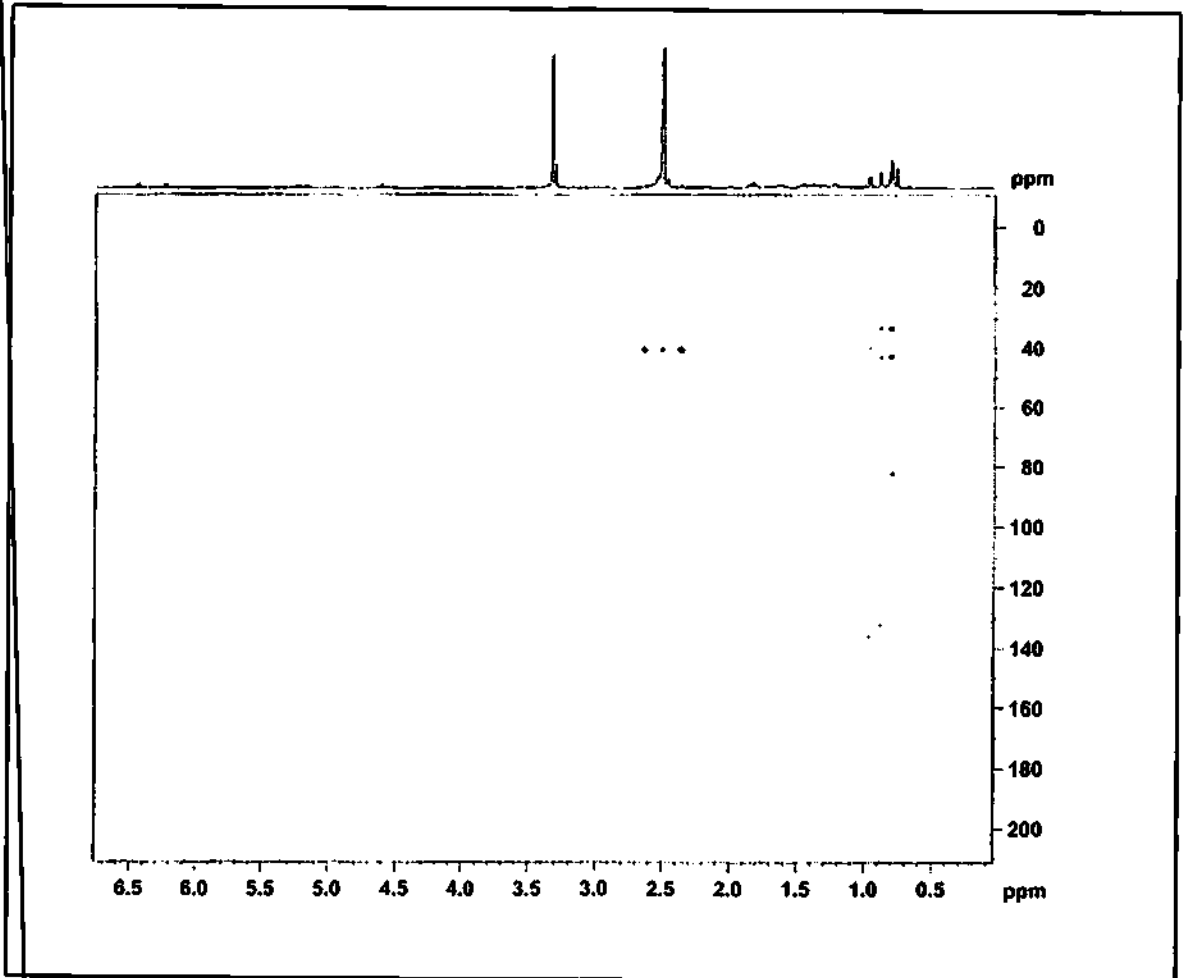
Gambar 5.35 Spektrum ^1H NMR isolat 5 (DMSO) yang diperbesar



Gambar 5.36 Spektrum ¹H NMR isolat 5 (multiplet antara δ 1-2 ppm) yang diperbesar



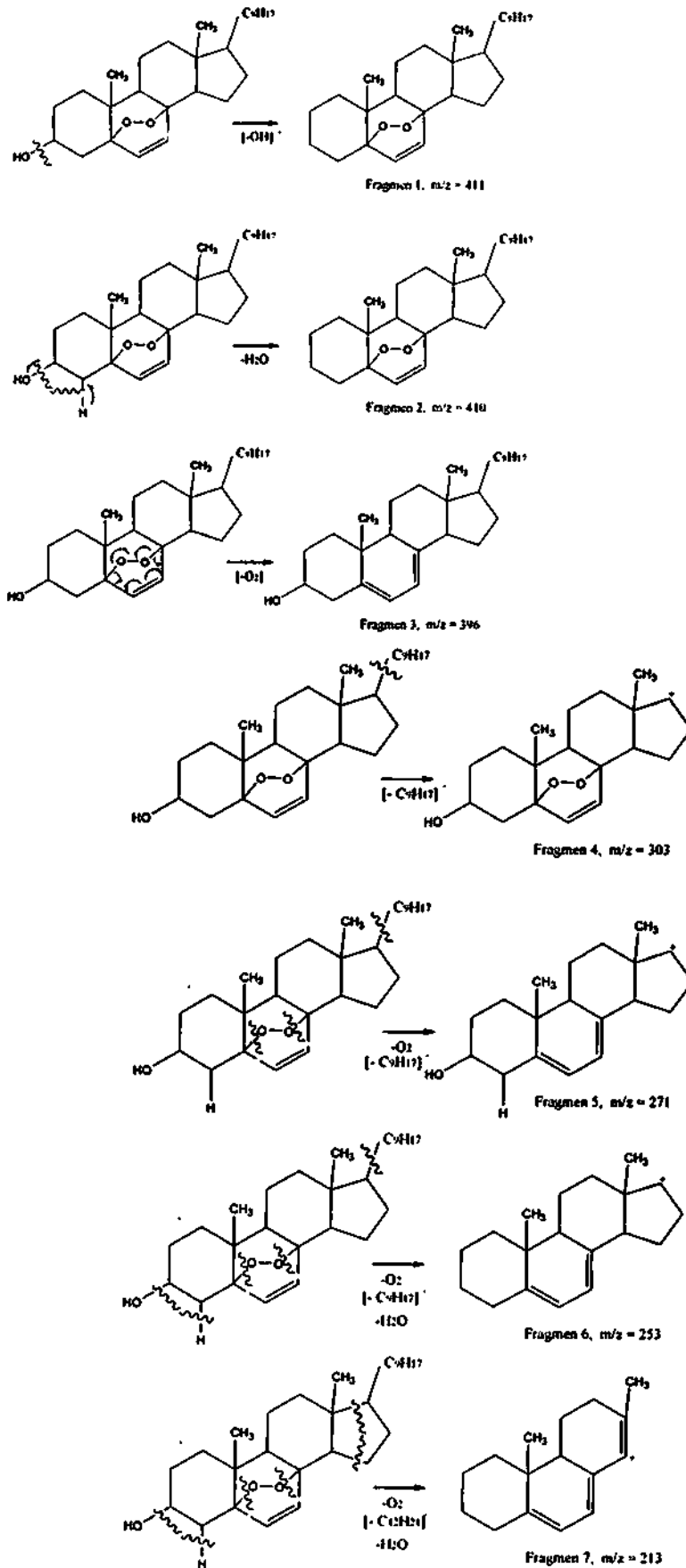
Gambar 5.37 Spektrum H-H COSY NMR isolat 5



Gambar 5.38 Spektrum HMBC isolat 5

Posisi	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)
HMBC isolat 5	H-H COSY isolat 5	DMSO isolat 5	ergosterol (J Hz) (ppm)	ergosterol peroksida Hefni, 2004	ergosterol peroksida Hefni, 2004	ergosterol peroksida Hefni, 2004	ergosterol peroksida Hefni, 2004
1	H1, H2, H3	H1, H2, H4	2,35 (m)	37,0 (t)	37,0 (t)	2,10 (m)	2,10 (m)
2	H3, H4, H5	H1, H2, H4	1,98 (m)	30,1 (t)	30,1 (t)	1,94 (m)	1,94 (m)
3	H1	H1, H2, H4	4,59 (m)	66,5 (d)	66,5 (d)	3,95 (m)	3,95 (m)
4		H2, H3, H4		51,2 (t)	51,2 (t)		
5				79,5 (s)	79,5 (s)		
6	C1, C5, C8	H7	6,21 (d, 8,5)	130,7 (d)	130,7 (d)	6,22 (d: 8,5)	6,22 (d: 8,5)
7	C4, C5, C8, C14	H6	6,42 (d, 8,5)	135,5 (d)	135,5 (d)	6,49 (d: 8,5)	6,49 (d: 8,5)
8				82,2 (s)	82,2 (s)		
9		H11, H12, H19		34,8 (d)	34,8 (d)		
10				36,9 (s)	36,9 (s)		
11		H9, H12		20,7 (t)	20,7 (t)		
12		H11, H17		39,4 (t)	39,4 (t)		
13				44,6 (s)	44,6 (s)		
14		H12, H17		51,8 (d)	51,8 (d)		
15		H16, H17		28,6 (t)	28,6 (t)		
16		H15, H17		23,4 (t)	23,4 (t)		
17	C12, C13, C14, C17, C20	H15, H16, H18	1,20 (m)	56,3 (d)	56,3 (d)	1,20 (m)	1,20 (m)
18	C11, C12, C13, C14, C16, C17, C20	H12, H17	0,80 (s)	12,9 (q)	12,9 (q)	0,80 (s)	0,80 (s)
19	C1, C2, C4, C5, C6, C8, C9, C10	H1A, H9	0,87 (s)	18,2 (q)	18,2 (q)	0,87 (s)	0,87 (s)
20	C22, C23	H17, H21, H22		39,7 (d)	39,7 (d)	2,20 (m)	2,20 (m)
21	C17, C20, C22, C23	H20	0,95 (m)	20,9 (q)	20,9 (q)	0,99 (d: 6,5)	0,99 (d: 6,5)
22	C20, C24	H20, H23		132,3 (d)	132,3 (d)	5,19 (m)	5,19 (m)
23	C20, C24	H22, H24	5,18 (m)	135,2 (d)	135,2 (d)	5,19 (m)	5,19 (m)
24	C22, C23	H23, H25, H26, H27, H28	1,85 (m)	42,8 (d)	42,8 (d)	1,85 (m)	1,85 (m)
25	C24, C26, C27, C28	H24, H26, H27	1,47 (m)	33,1 (d)	33,1 (d)	1,47 (m)	1,47 (m)
26	C24, C25, C27, C28	H25, H27	0,78 (m)	19,9 (q)	19,9 (q)	0,82 (d: 6,6)	0,82 (d: 6,6)
27	C24, C25, C26, C28	H25, H26	0,79 (m)	19,7 (q)	19,7 (q)	0,82 (d: 6,6)	0,82 (d: 6,6)
28	C23, C24, C25, C26, C27	H24	0,86 (m)	17,50 (q)	17,50 (q)	0,90 (d: 6,7)	0,90 (d: 6,7)

Tabel 5.9 Data NMR isolat 5



Gambar 5.39 Fragmentasi hipotetik 5,8-ergosterol peroksida

Isolat 5 ini pada KLT dengan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat memberi warna biru-ungu yang karakteristik untuk golongan sterol. Profil ^1H NMR isolat 5 khas untuk golongan steroid / triterpen yaitu pita lebar pada δ 1-2,5 ppm (Gambar 5.35) berasal dari multiplet yang tidak terpisahkan sinyal proton ekuivalen rangka steroid dan dua sinyal singlet antara δ 0,6 -1,5 ppm berasal dari proton metil pada C18 dan C19 (Görög and Szász, 1978).

Data EI-MS isolat 5 menunjukkan berat molekul $[\text{M}]^+$ di m/z 428, dan mempunyai struktur inti steroid yang ditunjukkan oleh adanya fragmen ion khas di m/z 213, 255, dan 271 (Zhao *et al.*, 1989; Helmbold, 1977) (Gambar 5.32). Teramati juga fragmen ion di m/z 411 $[\text{M}-\text{OH}]^+$ (fragmen 1), 410 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (fragmen 2), m/z 396 $[\text{M}-\text{O}_2]^+$ (fragmen 3), m/z 303 $[\text{M}-(\text{CH}_3)_4-(\text{CH})_5]^+$ (fragmen 4), m/z 271 $[\text{M}-\text{O}_2-\text{C}_9\text{H}_{17}]^+$ (fragmen 5) dan m/z 253 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{O}_2-\text{C}_9\text{H}_{17}]^+$ (fragmen 6) dan m/z 213 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{O}_2-\text{C}_{12}\text{H}_{21}]^+$ (fragmen 7) (Gambar 5.32 dan 5.39). Data EI-MS dengan $m/z \leq 396$ mirip fragmentasi ergosterol (WILEY7N.L database). Data EI-MS isolat 5 ini identik 5,8 ergosterol peroksida menurut pustaka data (WILEY7N.L database) dan Kobori *et al.*, (2006); Kim *et al.*, (1999) ; Martin *et al.*, (2005) ditunjang ^1H NMR yang identik dengan Hefni, (2004) disimpulkan senyawa tersebut adalah 5,8-epidioksi-ergosta-6,22-dien-3-ol atau 5,8-ergosterol peroksida.

5.4 Metabolit jamur endofit dan aktivitas antimikrobanya

Lecythophora sp. strain 30.1 dan 30.5 menghasilkan lima senyawa yang aktif sebagai antimikroba yaitu asam kojat, emodin, 7-kloremodin, asam *p*-hidroksi benzoat, dan 5,8- ergosterol peroksida.

Aktivitas antibakteri dan antifungi 5-hidroksi-2 (hidroksimetil)-4H-piran-4-on atau asam kojat terbukti pada *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 (Aytemir *et al.*, 2003).

Emodin dilaporkan memiliki aktivitas antivirus (Cohen *et al.*, 1996) antimikroba pada *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* tetapi tidak aktif terhadap *Staphylococcus aureus*, *Sacharomyces cerevisiae* dan *Cladosporium herbarum* pada kadar 100 μg (Hefni, 2004).

Senyawa 7-kloroemodin dilaporkan memiliki aktivitas antivirus (Cohen *et al*, 1996 a), antitumor, antiinflamasi dan bakterisida (Rosso *et al*, 2003).

Senyawa 5,8-ergosterol peroksida aktivitas antimikrobanya positif terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* dan *Candida albicans* pada konsentrasi 100 ug tetapi pada kadar yang sama tidak aktif terhadap *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* dan *Cladosporium herbarum* (Hefni, 2004).

Asam *p*-hidroksibenzoat dilaporkan menghambat bakteri *E.coli* dan *Corynebacterium flaccumfaciens* (Venkatasubbaiah and Chilton, 1991).

Aktivitas biologis kelima senyawa metabolit hampir semuanya bersifat sebagai antibakteri dan antifungi, beberapa diantaranya bersifat sebagai antivirus, zat pengatur pertumbuhan tanaman (5-hidroksi-2 (hidroksimetil)-4H-piran-4-on atau asam kojat), antioksidan, antitumor dan sitotoksik (emodin, 7-kloremodin, 5,8- ergosterol peroksida) terhadap sel kanker, maka dapat disimpulkan metabolit yang dihasilkan berguna bagi jamur endofit dan juga tanaman inang. Hal ini memperkuat fakta, diproduksinya syawa metabolit oleh endofit diakibatkan kekhususan kondisi biologis tanaman inang untuk fungsi adaptasi yaitu melindungi tanaman dari serangan hama. Hal ini khususnya bila produk metabolit tersebut tidak diproduksi oleh tumbuhan inangnya (Strobel and Daisy, 2003).

5.5 Prospek endofit di masa depan

Interaksi antara endofit dan lingkungannya dalam memproduksi metabolit sekunder berpotensi sebagai sumber alternatif bahan alami berkhasiat karena begitu besar keragaman ceruk biologis yang unik, tanaman inang tumbuh dalam kondisi biotipe yang khusus sehingga peluang metabolit yang dihasilkan juga beragam (Strobel and Daisy, 2003).

Diversitas biologis berdampak pada diversitas kimiawi metabolit karena terjadi inovasi kimia yang terus menerus terjadi di ekosistem yang aktif berevolusi. Hutan hujan tropis merupakan salah satu ekosistem tersebut mengingat terjadi kompetisi kehidupan yang berdaya saing tinggi, jenis tumbuhan sangat beragam dengan kerapatan tinggi dan seleksi alam yang sangat keras serta hujan turun sepanjang tahun. Redell dan Gordon (2000) seperti dikutip Strobel and Daisy, 2003 menyatakan endofit yang ada di

lingkungan hutan hujan tropis unggul dan merupakan sumber metabolit yang *novel* dan aktif secara biologis. Dilaporkan oleh Bills *et al.*, 2002 endofit tropis memberikan metabolit yang lebih aktif dan beragam secara sangat signifikan dari pada endofit dari daerah beriklim subtropis (Strobel and Daisy, 2003). Indonesia yang memiliki kekayaan hutan hujan tropis dengan beragam tumbuhan dan endofit berkhasiat didalamnya amat disayangkan belum dapat memanfaatkan kekayaan tersebut secara optimal.

Kadar metabolit yang dihasilkan endofit relatif kecil, hal ini disebabkan jamur endofit dalam penelitian ini, tumbuh relatif lama dan *wild strain* tanpa pengembangan melalui manipulasi genetika. Hal ini disadari karena isolat mikroorganisme alami umumnya 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 atau dilakukan seleksi genotip unggul terhadap kultur yang ada. Proses pemberdayaan strain unggul meliputi modifikasi genetik terhadap berbagai sifat yang dipengaruhi oleh perbedaan spesies dan strain. Apabila jamur endofit ini mampu memproduksi senyawa *novel* dan aktif secara biologis walaupun kadarnya relatif kecil dapat diupayakan peningkatan kemampuan kapasitas suplai melalui beberapa cara yaitu, sintesis kimia total, semi sintesis, inovasi kultivasi biomasnya atau fermentasi, dan rekayasa genetika. Melalui rekayasa genetika, saat ini dapat dilakukan transfer kluster gen yang bertanggung jawab pada biosintesis metabolit tertentu ke vektor yang sesuai untuk difermentasikan dalam skala besar sebagai alternatif produksi (Proksch *et al.*, 2003 a, b; Proksch *et al.*, 2002; Moore and Hertweck, 2002). Kerjasama berbagai disiplin ilmu dengan industri dibutuhkan untuk pengembangan lebih lanjut produksi senyawa berkhasiat ini.

Dibutuhkan penelitian bertahap dan berkelanjutan untuk mempelajari jamur endofit ini. Beragam produk bioaktif yang potensial dan menarik dihasilkan endofit, namun masih lebih banyak lagi yang belum ditemukan. Berbagai pertanyaan muncul dan membutuhkan jawaban melalui penelitian

berikutnya sebelum potensi sintesis jamur endofit ini dapat digunakan secara maksimal untuk kemaslahatan umat manusia.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

- Ekstrak jamur endofit *Lecythophora* sp.30.1 & 30.5 dan *Kabatiella caulivora* memiliki aktivitas biologis antibakteri dan antijamur. Senyawa aktif yang berperan sebagai antimikroba dari jamur endofit tersebut diidentifikasi sebagai 5-hidroksi-2 (hidroksimetil)-4H-piran-4-on, emodin, 7-kloremodin, p.hidroksi asam benzoat, dan 5,8 ergosterol peroksida.

SARAN

- Kemampuan *Lecythophora* sp.dan *Kabatiella caulivora* menghasilkan beragam metabolit berkhasiat diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai alternatif sumber bahan baku obat antimikroba
- Kemampuan *Lecythophora* sp.dan *Kabatiella caulivora* menghasilkan beragam metabolit berkhasiat diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai alternatif sumber bahan baku obat dengan diuji aktivitas biologis yang lain, sebagai antikanker, antiviral, antimalaria dan sebagainya.
- Jamur endofit dari *Alyxia reinwardtii* yang lain memiliki prospek untuk dikembangkan sebagai sumber bahan obat berkhasiat antimikroba dan dikaji kaitannya dengan tanaman inang.

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.
- AlBathaty, N., 2008. *Aktivitas Antimikroba Ekstrak Jamur Endofit *Lecythophora sp. 30.1* dari *Alyxia reinwardtii* BL.* Skripsi, Surabaya. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Ananda, K. and Sridhar, K.R., 2002. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India. *Can. J. Microbiol.* 48, 871-878.
- Anggraeni, D., 2008. *Aktivitas Antimikroba Ekstrak Jamur Endofit *Kabatiela caulivora var B* dari *Alyxia reinwardtii* BL.* Skripsi, Surabaya. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- 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.
- Anonim, 1995 *Farmakope Indonesia*, Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 855, 896-897.
- Anonim, 1998. Buku Panduan Seminar Nasional XIV *Tumbuhan Obat Indonesia*. Bogor: Fakultas Pertanian Jurusan Budi Daya Pertanian, IPB
- Aust, H.J., Boyle, C., Draeger, S., Gotz, M, Guske, Schulz, 2003. *Endophytic Fungi – Are they suitable as Biocontrol Agents*, ICPP Paper number 2913 180404.
- 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.
- Berghe, V, D.A., and Vlietinck, J, A., 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: P. M. Dey, and J. B. Harborne (Eds). *Methods In Plants Biochemistry*. London : Academic Press, 47-57.
- Bills, G., Dombrowski, A., Pelaez, F., Polishook, J. and An, Z. 2002. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi, 165-194. In Watling, R., Frankland, J.C., Ainsworth, A.M., Issac, S., and Robinson, C.H.(ed), *Tropical mycology: micromycetes*, vol.2. CABI Publishing, New York, N.Y.
- Brady, S.F., Wagenaar, M.M., Singh, M.P., Janso, J.E., Clardy, J., 2000 a. The Cytosporones, New Octaketide Antibiotics Isolated from an Endophytic Fungus. *Org. Lett.*, 2, 25, 4043-4046.
- Brady, S.F., Singh, M.P., Janso, J.E., Clardy, J., 2000 b. Cytokyrins A and B, New BIA active Bisanthraquinones Isolated from an Endophytic Fungus. *Org. Lett.*, 2, 25, 4047-4049.
- Breitmaier, E., and Voelter, W., 1978. *¹³C NMR Spectroscopy, Methods and Applications in Organic Chemistry*, 2nd Ed., Verlag Chemie, Weinheim, New York

- Brunner, F. and Petrini, O., 1992. Taxonomy of some *Xylaria* sp. and Xylariceous Endophytes by Isozyme Electrophoresis. *Mycol. Res.* 96: 723 – 733.
- Chin, Y.W, Balunas, M.J., Chai, H.B., Kinghorn, A.D., 2006. *Drug Discovery From Natural Sources*. The AAPS Journal, 8, 2, Article 28 (<http://www.aapsj.org>)
- Cohen, P.A.. and Towers, G.H.N., 1995 a. The anthraquinones of *Heteroderma obscurata*. *Phytochemistry*, 40, 3, 911-915.
- Cohen, P.A. and Towers, G.H.N., 1995 b. Anthraquinones and phenanthroperylenequinones from *Nephroma laevigatum*. *J. Nat. Prod.*, 58,4, 520-526.
- Cohen, P.A., Hudson, J.B., Towers, G.H.N., 1996 a. Antiviral activities of anthraquinones, bianthrone and hypericin derivatives from lichens. *Experientia* 52, 2, 180-183.
- Cohen, P.A. and Towers, G.H.N., 1996 b. Biosynthesis studies on chlorinated anthraquinones in the Lichen *Nephroma laevigatum*. *Phytochemistry*, 42 5, 1325-1329.
- Demain, A.L. and Solomon, N.A., 1986. *Manual of industrial microbiology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Doughari, J. H., 2006. Research Article Antimicrobial Activity of *Tamarindus indica* Linn. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.*, 5, 597-603
- 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.
- Duffield, R.M., Fernandes, A., Lamb, C., Wheeler, J.W., Eickwort, G.C., 1981. Macrocyclic Lactones and Isopentenyl Esters in the Dufour's gland secretion of Halictine Bees (Hymenoptera:Halictidae). *J. Chem. Ecol.* 7, 2, 319 -331.
- Dutton, G, 1995. Uncommon Pathway to Uncommon Drugs. *The World & I*, 10.
- Dutton, M.F, Westlake, W., 1985. Occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in Natal, South Africa. *J.A.O.A.C.* 68, 839-842.
- Ebel R., 2003. Heinrich Heine Institute of Pharmaceutical Biology, University of Duesseldorf Germany. Personal communications.
- Erol, D.D., Calis, U., Yulug, N., 1995. Synthesis and anti microbial activities of some dithiocarbamate derivatives of Kojic acid. *Bull. Chim. Farmaceutico – Anno*, 134, 620-623.
- Görög, S., and Szász, G.Y., 1978. *Analysis of Steroid Hormone Drugs*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York.
- Ham, I.H. and Kim, I.H., 1994. Pharmaco-Constituents of Korean cultivated Rhubarb Leaves – The Anthraquinones from Leaves. *J. Pharm. Soc. Korea* 38, 4, 410-417.
- Hefni, E., 2004. *Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites of sponge-derived fungi collected from the Mediterranean sea (Italy) and Bali sea (Indonesia)*, Dissertation, Heinrich Heine Institut - Universität Düsseldorf.

- Helmbold, H., 1977. **Steroide in Zellkulturen von Digitalis lanata**. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften dem Fachbereich Pharmazie der Eberhard-Karls- Universität zu Tubingen.
- Heyne, K., 1987. **Tumbuhan Berguna Indonesia** Jilid III, Cetakan ke-1. Jakarta. Badan Litbang Departemen Kehutanan, Yayasan Sarana Wana Jaya, 1636-1637.
- Kim, S.W., Park, S.S., Min, T.J. and Yu, K.H., 1999. Antioxidant activity of Ergosterol peroxide (5,8-epidioxy-5 α , 8 α -ergosta-6, 22E-dien-3 β -ol) in *Armillariella mellea*. **Bull. Korean Chem.Soc.**, 20, 819-823.
- Kobori, M., Yoshida, M., Kameyama, M.O., Takei, T., Shinmoto, H., 2006. 5 α ,8 α -Epidioxy-22E-ergosta-6,9(11),22-trien-3 β -ol from an Edible Mushroom Suppresses Growth of HL60 Leukemia and HT29 Colon Adenocarcinoma Cells. **Biol. Pharm. Bull.** 29, 4, 755-759.
- Kitagawa I, Shibuya H, Beak NI, Yokokawa Y, Nitta A, Wiradinata 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.
- Lee, C.K, Lee, P.H., and Kuo, Y.H., 2001. The Chemical Constituents from the Aril of *Cassia fistula* L. **J. Chin. Chem. Soc.** 48, 1053-1058.
- Leuschner, Marc, 1998. **Untersuchungen Zur Enzymatik der UDP-Glucose: Coniferylalkohol- B Glucosyltransferase in Zellkulturen von Linum album und Linum nodiflorum**. Germany: der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf, 7.
- Li, J.V., Strobel, G.A., Harper, J.K., Lobkovsky, E., Clardy, J., 2000. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. **Org. Lett.** 2, 767-770.
- Lucy P, Meagher GR, Beecher VP, Flanagan, Libetty W, 1998. **Isolation and characterization of the Lignans, Isolaricireionol and Pinoresinol in FlaxseedMeal**. Tektran, 2003. <http://www.nalsda.gov/ttic/tektran/data/000009/53/0000095351.html>.
- Maftuchah, I., 2008. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Jamur Endofit *Kabatiela caulivora* var A dari *Alyxia reinwardtii* BL. Skripsi, Surabaya. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Marjorie, M.C. 1999. **Plant products as antimicrobial agents**. *Clinical Microbiology Review*, 12 (4). p.564-582
- Martin, S.A., Painemal, K., Diaz, Y., Martinez, C., Roviroso, J., 2005. Metabolites from The Marine Fungus *Cladosporium cladosporioides*. **J. Argent. Chem. Soc.**, 93, 4/6, 247-251.
- Moore, B.S. and Hertweck, C., 2002. Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. **Nat. Prod. Rep.** 19, 70 – 99.
- Morin, R.B. and Gorman, M., 1995. **Kimia dan biologi Antibiotik β – Laktam** volume I dan III, diterjemahkan oleh Sri Mulyani, Academic Press, New York, London.
- Morris, 2001 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
- Nalini, M.S., Mahesh, B., Tejesvi, M.V., Prakash, H.S., Subbaiah, V., Kini, K.R., Shetty, H.S., 2005. Fungal endophytes from the three-leaved caper, *Crataeva magna* (Lour.) DC (Capparidaceae). *Mycopathologia* 159, 245-249.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., 1996. *Introduction to Spectroscopy, a Guide for students of Organic Chemistry*, 2nd ed., Saunders Golden Sunburst Series, Harcourt Brace College Publisher, Fort Worth.
- 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.
- Pritayuni, F., 2008; *Aktivitas Antimikroba Ekstrak Jamur Endofit Lecythophora sp. 30.5 dari Alyxia reinwardtii BL.* Skripsi, Surabaya. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Proksch, P., Edrada, R.A., and Ebel, R., 2002. Drugs from the seas – current status and microbiological implications. *App. Microbiol. and Biotech.*, 59, 125-134.
- Proksch, P., Ebel, R., Edrada, R.A., Schupp, P., Lin, W.H., Sudarsono, Wray V., Steube, K., 2003 a. 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.
- Proksch, P., Edrada, R.A., and Ebel, R., 2003 b. Review: Drugs from the Sea – Opportunities and Obstacles. *Mar. Drugs* 1, 5-17.
- Pulici M, Sugawara F, Koshino H, Okada G, Esumi Y, Uzawa J, Yoshida S, 1997. Metabolites of *Pestalotiopsis spp*, Endophytic fungi of *Taxus brevifolia*. *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.
- Putra, H., 2006. *Aktivitas Antibakteri Metabolit Jamur Endofit dari Alyxia reinwardtii BL. Dengan metode Bioautografi.* Skripsi, Surabaya. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Monod, M., Frenk, E., and Hostettmann K., 1994. Antifungal test in phytochemical investigation: Comparison of bioautographic methods using phytogetic and human pathogenic fungi, *Planta Med.* 60, 41-43.
- Raviraja, N.S., 2005. Fungal endophytes in five medicinal plant species from Kudremukh Range, Western Ghats of India. *J. Basic Microbiol.* 45, 3, 230-235.
- Rayner ADM, 1991. The challenge of the individualistic mycelium. *Mycologia* 83: 48 –71.

- Redell, P and Gordon, V., 2000. Lesson from nature: can ecology provide new leads in the search for novel bioactive chemicals from rainforest? P 205-212. In Wrigley, S.K., Hayes, M.A., Thomas, E.J., Chrystal T., and Nicholson, N (ed). **Biodiversity : new leads for pharmaceutical and agrochemical industries**. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK.
- Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A., 1988. Screening methods for Natural Products with Antimicrobial Activity: A Review of the Literature. **J. Ethnopharmacol.** 22, 127 – 149.
- Rosso, M.L., Bertoni, M.D., Adler, M.T., Maier, M.S., 2003. Anthraquinones from the cultured lichen mycobionts of *Teloschistes exillis* and *Caloplaca erythranta*. **Biochem. Syst. Ecol.** 31, 10, 1197-1200.
- Silverstein, R.M., and Webster, F.X., 1998. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 6th Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, Brisbane, Singapore, Toronto.
- Spectral Database for Organic Compounds, **SDBS**, Japan National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) <http://riodb01.ibase.aist.ac.jp/sdbs/>, tgl diakses 24 Januari 2008.
- 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.
- Strobel, G.A., 2002. Microbial gifts from rain forests. **Can. J. Plant Pathol.** 24, 14 – 20.
- Strobel, G., and Daisy, B., 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 67, 4, 491-502.
- Strobel, G., 2006. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Curr. Opin. Microbiol.** 9, 240 –244.
- Sugijanto, N.E. Indrayanto, G., Zaini, N.C., 2003. **Isolasi dan determinasi jamur endofit dari *Aglaia eusideroxylon*, *Aglaia odorata* dan *Alyxia reindwartii***. (Laporan Penelitian DIKS- Universitas Airlangga 2003).
- Sugijanto, N.E. Indrayanto, G., Zaini, N.C., 2005. **Paradigma baru produksi bahan obat sitotoksik menggunakan jamur endoofit dari tanaman *Alyxia reindwartii***. (Laporan Penelitian Hibah Bersaing 2005 –2006).
- Sugijanto, N.E. Indrayanto, G., Zaini, N.C., 2007. **Paradigma baru produksi antibiotika menggunakan jamur endofit dari tanaman *Alyxia reindwartii*** (Laporan Penelitian Hibah Bersaing 2007-2008).
- Sugijanto, N.E. Indrayanto, G., Zaini, N.C., 2008 **Isolasi jamur endofit dari *Alyxia reindwartii* BL; studi metabolit sekunder dan bioaktivitas**

- jamur baru *Lecythophora sp.*** Disertasi pada Program pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
- Sugijanto, N.E., Diesel A., Ebel, R., Indrayanto, G., Zaini, N.C., 2009. Chemical Constituents of the Endophytic Fungus *Lecythophora sp.* Isolated from *Alyxia reinwardtii*. *Natural Product Communications*, 4,11, 1485-1488.
- Syamsuhidayat, S.S., dan Hutapea, 1981. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Edisi I, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. 36, 258.
- Tan, R.X., and Zou, W.X., 2001, Endophytes a rich source of fungsional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18, 448 – 459.
- Tjitrosoepomo, G., 1988. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Gajah Mada University Press, Yogyakarta, 346 –349.
- Venkatasubbaiah, P., and Chilton, W.S., 1991. Toxins Produced by the Dogwood Anthracnose Fungus *Discula sp.* *J. Nat. Prod.*, 54, 5, 1293-1297.
- 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.
- Wiley Database/ Wiley 7N.L, library database Gas Chromatography - Mass Spectrometry.
- Williams, D.H., and Fleming, I., 1995. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, 5th Ed., Mc Graw - Hill Publishing Company, Shoppenhangers Road, Maidenhead, Berkshire.
- Wiyakrutta, S., Sriulolmas, 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.
- Zheng, L., Chen, H., Han, X., Lin, W., Yan, X., 2005. Antimicrobial screening and active compound isolation from marine bacterium NJ6-3-1 associated with the sponge *Hymeniacidon perleve*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 201-206.
- Zhao, H., Zhao, S., Sun, C., Guillaume, D., 1989. Glucosylsterols in extracts of *Euryale ferox* identified by high resolution NMR and mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 30, 1633 -1637.

**Chemical Constituents of the Endophytic Fungus
Lecythophora sp. Isolated from *Alyxia reinwardtii***Noor Erma Sugijanto^a, Arnulf Diesel^b, Rainer Ebel^{b,c}, Gunawan Indrayanto^a and Noor Choltes Zaini^a^aFaculty of Pharmacy, Airlangga University, Jl. Darmawangsa Dalam, Surabaya (60286), Indonesia^bHeinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany^cMarine Biodiscovery Centre, Department of Chemistry, University of Aberdeen, Meston Walk, Aberdeen AB24 3UE, Aberdeen, Scotland, U.K.

gunawanindrayanto@yahoo.com

Received: August 5th, 2009; Accepted: September 4th, 2009

Seven compounds, (2*R*)-3-(2-hydroxypropyl)-benzene-1,2-diol (1), kojic acid (2), 7-*O*-acetyl-kojic acid (3), *p*-hydroxybenzoic acid (4), emodine (5), 7-chloroemodine (6), and ergosterol-5,8-peroxide (7) were isolated from the endophytic fungus *Lecythophora* sp. (specimen codes 30.1 and 30.5), which were isolated from *Alyxia reinwardtii* (Apocynaceae).

Keywords: *Lecythophora* sp., *Alyxia reinwardtii*, endophytic fungus, chemical profiling.

An endophyte is a bacterial or fungal microorganism, which spends the whole or part of its life cycle inside the healthy tissues of its host plant, colonizing either intercellularly and or intracellularly [1]. Endophytes, especially endophytic fungi, have been reported from virtually all plant taxa, and also from a broad range of habitats ranging from the tropics to arctic regions [2]. From a chemical point of view, endophytic fungi have been identified as a rich and reliable source of novel bipactive secondary metabolites with considerable medicinal and agricultural potential [1].

Alyxia reinwardtii BL (pulasari in Indonesia), Apocynaceae, is one of the plants used in "jamu", a traditional herbal medicine in Indonesia. Parts and extracts of the plant are used for treating fever, diarrhea, candidiasis and aphta ulcer [3]. Chemical components of this plant reported so far include coumarin and its 5- as well as 8-hydroxy derivatives, pinoresinol, 9 α -hydroxypinoresinol and salicifoliol [4], and the trimeric iridoid diglucoside, pulosarioside [5]. In our continuing study of the chemistry of endophytic fungi, we have isolated two new endophytic fungal strains (specimen codes 30.1 and 30.5) from the stem of *A. reinwardtii*, which

were identified as *Lecythophora* sp. Both specimens displayed a similar morphology, with strain 30.1 appearing blackish, and strain 30.5 reddish when cultivated on malt extract agar (MEA), while SEM indicated that both strains were identical. Microscopic observation revealed septate hyphae, phialides, adelophialides, conidia and chlamydo spores characteristic for the genus *Lecythophora* [6]. Until the present, 6 species of *Lecythophora* has been reported [7], but strains 30.1 and 30.5 did not exactly match any of these and thus probably represent a hitherto undescribed species. Reports of chemical investigations into the genus *Lecythophora* are scarce. To the best of our knowledge, the only natural product disclosed so far is lecythophorin, a novel chaetiacandin sulfate, which was isolated from *L. hoffmani* [8].

In the present study, *Lecythophora* sp. 30.5 yielded (2*R*)-3-(2-hydroxypropyl)-benzene-1,2-diol (1) and five known compounds, namely kojic acid (2), 7-*O*-acetyl-kojic acid (3), *p*-hydroxybenzoic acid (4), emodine (5) and 7-chloroemodine (6). 1 is known as a synthetic pyrocatechol [17], but, to the best of our knowledge, it has never been reported before as a

natural product. *Lecytophora* sp. 30.1 produced 2, 5, 6 and ergosterol-5,8-peroxide (7). Compounds 1, 2, 3, 4, 5 and 6 were isolated from the culture broth, whilst compounds 2, 5, 6, and 7 were isolated from the mycelia of the fungal strains.

The structures of compounds 1-7 were determined by mass spectrometry in combination with several NMR spectroscopic techniques, *i.e.* ^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY, HMQC, HMBC, and comparison with published data [9-21].

Our work showed that compound 2 was the major component. The highest levels of 2 (2238 ± 62 $\mu\text{g/mL}$ in shaking cultures, 8 d, and 920 ± 46 $\mu\text{g/mL}$; static cultures, 14 d) were achieved by *Lecytophora* sp. 30.5 cultivated on the medium described by Rosfarizan [22]. These results showed that shaking cultures are more favorable for producing 2.

Experimental

General: NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE DMX 600 and ARX 500 spectrometers. IRMS were measured on a Micromass Qtof mass spectrometer. LC-MS were measured on a ThermoFinnigan LCQ Deca mass spectrometer, coupled to an Agilent 1100 HPLC system. HPLC analysis was carried out on an Agilent 1100 system, using a LiChrospher 100 RP-18 column (5 μm ; 250 \times 4 mm; Cat. 1.50983, E. Merck, Darmstadt, Germany)

Materials: Kojic acid (Sigma, St Louis, USA), Clorox (*Bayclin*TM) 5.25%, ethanol, sucrose and chloramphenicol were pharmaceutical grade substances (P.T. Brataco, Surabaya, Indonesia); agar Difco, Lawrence USA); malt extract (ME), silica gel 60G for column chromatography, silica gel 60 F₂₅₄ and RP18-F₂₅₄-precoated TLC-plates, K₂HPO₄, NaNO₃, Fe₂(SO₄)₃, MgSO₄, KCl (E. Merck, Darmstadt, Germany) were purchased from the respective manufacturers, as indicated.

Plant material: *A. reinwardtii* was collected from the Purwodadi Botanical Garden, East Java, Indonesia in April 2003. The plant material was identified by Dr Purawati at the Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences, Bogor, Indonesia (voucher no 710/IPH.1.02/1f.8/2003).

Isolation of endophytic fungi: Stems of *A. reinwardtii* were subjected to surface sterilization with 70% ethanol and 75% Clorox (*Bayclin*TM). The efficacy of the procedure was tested by imprinting

the plant surface onto agar plates containing malt extract (15 g/L, to which 0.2 g/L chloramphenicol was added) and inoculating for 14 d, at which time which no fungal growth was observed. The sterilized stems were cut aseptically and parts of the inner tissues were imprinted onto agar plates containing MEA media with the addition of powdered plant material (15 g/L) and chloramphenicol (0.2 g/L). Pure strains were obtained by repeated inoculation of growing fungi on agar plates with fresh MEA medium without chloramphenicol and powdered plant material.

Identification of the endophytic fungi: 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 *Lecytophora* (anamorph: *Coniochaeta*), with both strains not precisely matching a described species. A voucher specimen was deposited at CBS, Utrecht.

Cultivation of endophytic fungi: Stock fungal cultures of *Lecytophora* sp. 30.1 and 30.5 were maintained on MEA slants and sub-culturing was performed every 3 months.

For isolation of the secondary metabolites, mass cultivation of *Lecytophora* sp. 30.1 and 30.5 was carried out separately in 750 Erlenmeyer flasks (300 mL), which containing malt extract broth (15 g/L, initial pH 6.5) under static conditions at room temperature (ca $30 \pm 3^\circ\text{C}$) for 4 weeks

For the production of 2, *Lecytophora* sp. 30.5 was cultivated in 300 mL Erlenmeyer flasks containing liquid medium, according to [22], at an initial pH of 5.6, and incubated at room temperature on a rotary shaker (100 rpm) and under static conditions for 16 days.

Isolation: Culture broth (30 L) containing fungus 30.5 (from 750 Erlenmeyer flasks) was extracted with EtOAc, and the resulting organic layer was conc. *in vacuo* to yield 9.93 g EtOAc extract, whilst the mycelia (60.73 g) were separated by decanting and extracted with MeOH. Partitioning with *n*-hexane-water yielded 2.65 g *n*-hexane extract. The EtOAc extract (2.99 g) was subjected to VLC on silica gel 60G, and extracted with mixtures of *n*-hexane, EtOAc, CH₂Cl₂, and MeOH in increasing polarity, yielding 19 fractions, which were analyzed by TLC (silica gel 60 F₂₅₄, eluent CHCl₃:MeOH:H₂O 75:25:1). Fractions 10 to 19 were combined and

purified by crystallization from EtOAc-acetone to yield 2 (12.7 mg). Fraction 6 was purified two times by preparative TLC (silica gel 60 F₂₅₄; CH₂Cl₂:MeOH 9:1 and RP18-F₂₅₄, MeCN:MeOH:H₂O 2:1:1) to yield 3 (6.3 mg). The EtOAc extract (3.80 g) was subjected to column chromatography (CC) on silica gel 60G using *n*-hexane:EtOAc (7:3) as eluant, to yield 6 fractions. Fraction 3 was further purified by preparative TLC, as described above, to yield 5 (4.5 mg); fraction 4 yielded 1 (11.4 mg) and 6 (5.1 mg), and fraction 6 yielded 4 (6.2 mg). The *n*-hexane extract (2.50 g) was purified by CC [initial eluent *n*-hexane:EtOAc (8:2), step gradient (5%) to EtOAc 100%], yielding 12 fractions, then a step gradient (5%) to EtOAc:MeOH (8:2), which yielded fraction 13. Fractions 9-12 were subjected to preparative TLC three times [silica gel 60 F₂₅₄, *n*-hexane:EtOAc (1:4) and CH₂Cl₂:MeOH (9:1); RP-18 (MeCN:MeOH:H₂O 2:1:1) to yield 5 (2.5 mg) and 6 (6.6 mg). Fraction 13 was purified by crystallization using EtOAc-acetone to yield 2 (3.7 mg).

By using the same method as described above, 32 L of culture broth of fungus 30.1 (from 800 Erlenmeyer flasks) yielded 10.36 g EtOAc extract, whilst its mycelium (66.75 g) yielded 2.89 g *n*-hexane extract. From the EtOAc extract (3.01 g), compounds 2 (10.7 mg), 5 (7 mg) and 6 (6.6 mg) were isolated.

The *n*-hexane extract, subjected to CC, produced 14 fractions. Fraction 9 was purified by preparative TLC (x 3) [silica gel, *n*-hexane:EtOAc (1:4), and CH₂Cl₂:MeOH (9:1); RP-18: MeCN:MeOH:H₂O (2:1:1)] and yielded 7 (4.1 mg), whilst from fraction 14, compound 2 (2.1 mg) was recovered.

HPLC analysis of 2: Quantitative analysis of 2 was performed by HPLC using MeOH: 0.05 M sodium 1-hexanesulfonate, pH 2.4 (15:85) as mobile phase, with detection by UV at 260 nm. This method was validated according to [23], using commercially available 2 as a reference standard. The linearity of 2 was achieved in the range of 2.24 to 31.8 µg/mL, *r* 0.99997, *V*_x 1.5%; detection limit 0.120 µg/mL, quantitation limit 0.360 µg/mL, accuracy 91.7 - 104.5%, *n* = 36, precision as RSD 5.48%, *n* = 36.

Acknowledgments - We are indebted to the Ministry of National Education, Indonesia for financial support, Dr V. Wray and Dr Manfred Nimtz (Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig) for NMR and MS spectra, Prof. Darah Ibrahim (Universiti Sains Malaysia, Penang) for SEM, Mr Wardaya (Purwodadi) and Dr Irawati (Bogor), Indonesian Institute of Sciences for plant collection and identification.

References

- [1] Tan RX, Zou WX. (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Report*, 18, 448-459.
- [2] Strobel G, Daisy B. (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 491-502.
- [3] Heyne K. (1987) *Tumbuhan Berguna Indonesia - Terjemahan*, Jilid III. Badan Litbang Kehutanan Republik Indonesia, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta, Indonesia, pp. 1636.
- [4] Steffan B. (2006) *Inhaltsstoffe aus Pflanzen der Indonesischen Volksmedizin (Jamu): Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Ph.D. Dissertation work.
- [5] 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.
- [6] The Fungi, (2008) Synonym and Classification Data for *Lecytophora* sp. (<http://www.doctorfungus.org>).
- [7] The University of Adelaide, (2008) Mycology Online, Mould identification: A virtual self assessment (<http://www.mycology.adelaide.edu.au>).
- [8] Ayer WA, Kawahara N. (1995) Lecytophorin, a potent inhibitor of blue-stain fungi, from the hyphomycetous fungus *Lecytophora hoffmannii*. *Tetrahedron Letters*, 36, 7953-7956.
- [9] Aytemir MD, Erol DD, Hider RC, Özalp M. (2003) Synthesis and evaluation of anti microbial activity of new 3 hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-pyran-2-carboxamide derivatives. *Turkish Journal of Chemistry*, 27, 757-764.
- [10] Yang CM, Hong JY, Lee KW, Lee BG, Chang DI. (1994) Kojic acid derivatives. United States Patent 5523421
- [11] Cohen PA, Towers GHN. (1995) The anthraquinones of *Heterodermia obscurata*. *Phytochemistry*, 40, 911-915.
- [12] Cohen PA, Towers GHN. (1996) Biosynthetic studies on chlorinated anthraquinones in the lichen *Nephroma laevigatum*. *Phytochemistry*, 42, 1325-1329.

- [13] Cohen PA, Towers GHN. (1995) Anthraquinones and phenanthroperylenequinones from *Nephroma laevigatum*. *Journal of Natural Products*, 58, 520-526.
- [14] Effendi H. (2004) *Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites of sponge-derived fungi collected from the Mediterranean sea (Italy) and Bali sea (Indonesia)*. Inaugural Dissertation, der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät, der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. Ph.D. Dissertation work.
- [15] Görög S, Szász GY. (1978) *Analysis of Steroid Hormone Drugs*. Elsevier Scientific Publishing Company: Amsterdam, Oxford, New York, pp. 236-239.
- [16] Ham IH, Kim IH. (1994) Pharmac constituents of Korean cultivated Rhubarb leaves -The anthraquinones from leaves. *Yakhak Hoeji*, 38, 410-417.
- [17] Huang DS, Ting SH. (1994) Preparation of 3-Substituted pyrocatechols. *Journal of Chemical Research (S)*, 500-501.
- [18] Kobori M, Yoshida M, Kameyama MO, Takei T, Shinmoto H. (2006) 5 α ,8 α -Epidioxy-22E-ergosta-6,9(11),22-trien-3 β -ol from an edible mushroom suppresses growth of HL60 leukemia and HT29 colon adenocarcinoma cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29, 755-759.
- [19] San-Martin A, Painemal K, Diaz Y, Martinez C, Roviroso J. (2005) Metabolites from the marine fungus *Cladosporium cladosporioides*. *The Journal of Argentine Chemical Society*, 93, 247-251.
- [20] Venkatasubbaiah P, Chilton WS. (1991) Toxins produced by the dogwood anthracnose fungus *Discula* sp. *Journal of Natural Products*, 54, 1293-1297.
- [21] Spectral Database for Organic Compounds, (2008) Japan National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) (http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng).
- [22] Rosfarizan M, Mahidah S, Ariff AB. (1998) Isolation of a kojic acid -- producing fungus capable of using starch as a carbon source. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 27-30.
- [23] Yuwono M, Indrayanto G. (2005) Validation method of analysis by using chromatography. In: Brittain HG. (Ed.) *Profiles of Drugs Substances, Excipients and Related Methodology*, Vol. 32, Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 243-258.