

Bidang Ilmu: Mikrobiologi Farmasi

**PENELITIAN HIBAH BERSAING**

**LAPORAN PENELITIAN  
HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI  
Tahun Anggaran 2007-2008**



**PARADIGMA BARU PRODUKSI ANTIBIOTIKA  
MENGUNAKAN JAMUR ENDOFIT DARI TANAMAN  
*ALYXIA REINWARDTII***

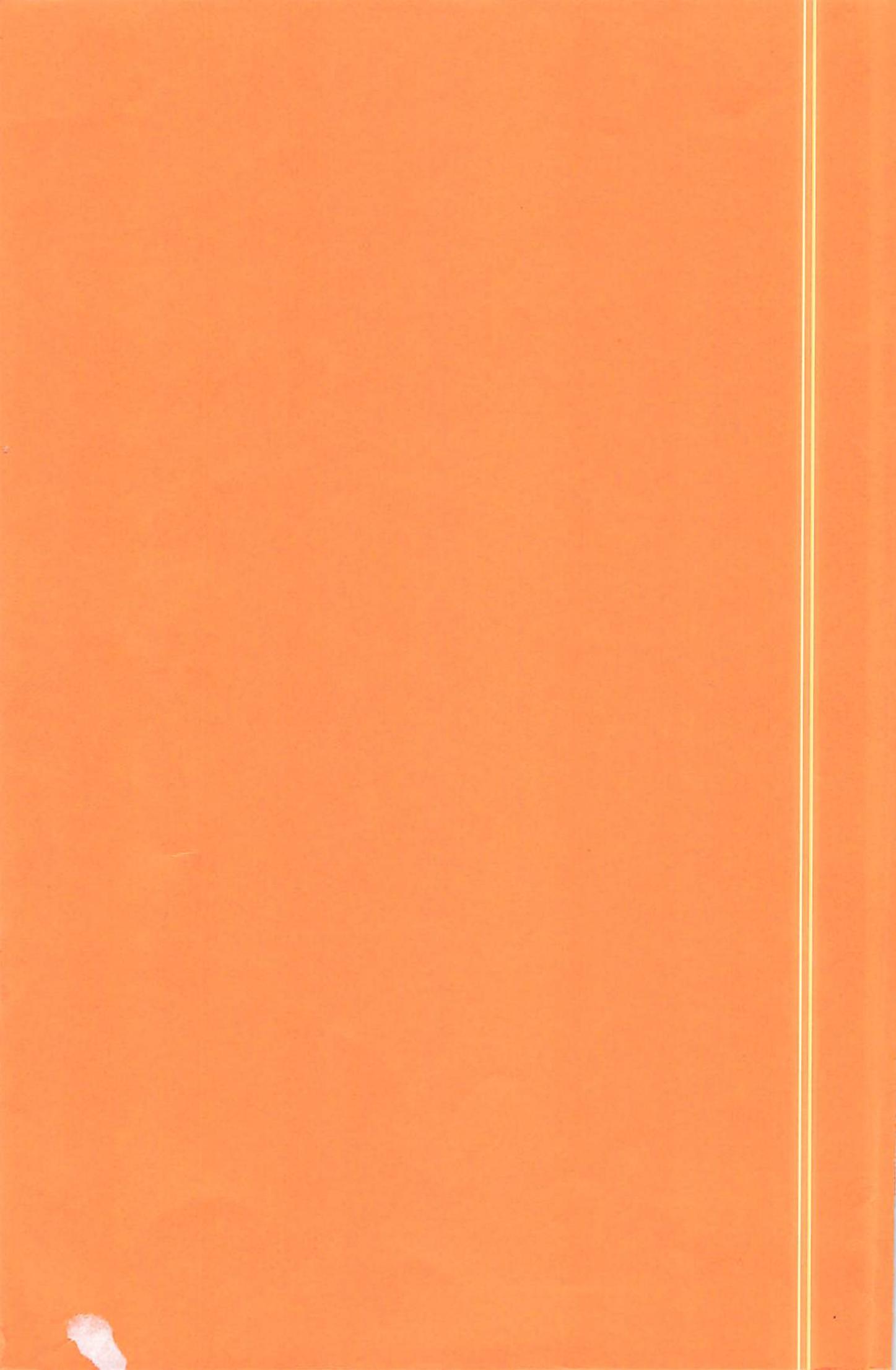
Ketua Peneliti  
Dr. Noor Erma Sugijanto, M.S.

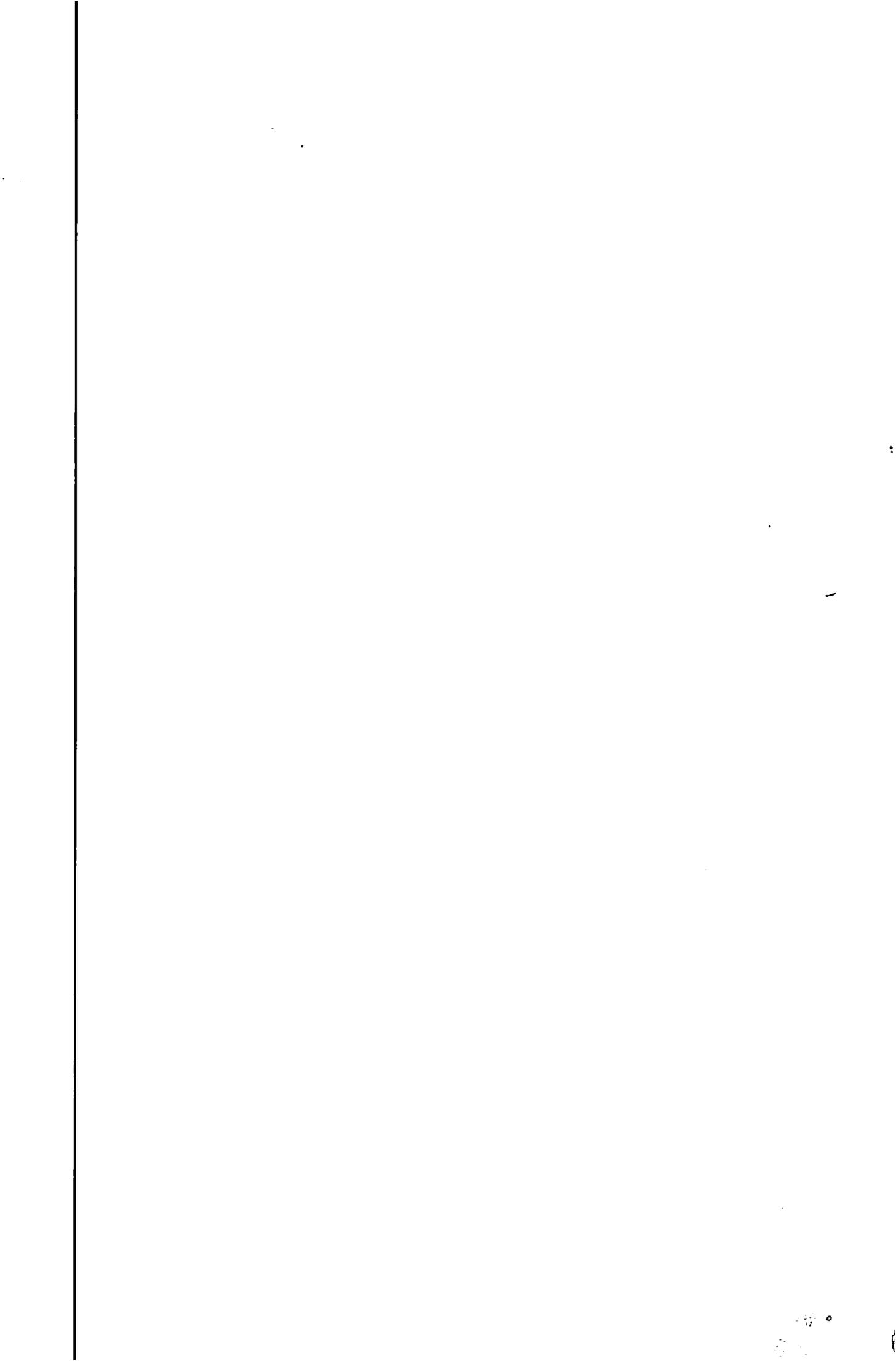
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional Sesuai dengan  
Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat No:  
016/SP2H/PP/DP2M/III/2007 Tgl 29 Maret 2007

Fakultas Farmasi  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2007-2008

30 - 099





Bidang Ilmu: Mikrobiologi Farmasi

## PENELITIAN HIBAH BERSAING

LAPORAN PENELITIAN  
HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI  
Tahun Anggaran 2007-2008

1010-2  
1010B  
LP. 35/10  
Sug  
P



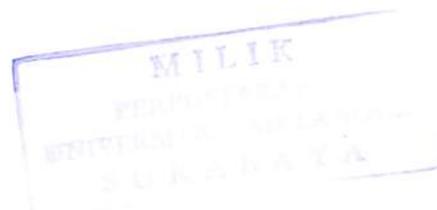
### PARADIGMA BARU PRODUKSI ANTIBIOTIKA MENGUNAKAN JAMUR ENDOFIT DARI TANAMAN *ALYXIA REINWARDTII*

Ketua Peneliti  
Dr. Noor Erma Sugijanto, M.S.

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional Sesuai dengan  
Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat No:  
016/SP2H/PP/DP2M/III/2007 Tgl 29 Maret 2007

Fakultas Farmasi  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2007-2008



**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL  
PENELITIAN HIBAH BERSAING**

A. Judul Penelitian : **Paradigma Baru Produksi Antibiotika menggunakan jamur endofit dari tanaman *Alyxia reinwardtii***

B. Ketua Peneliti

Nama : Dr. Noor Erma Sugijanto, M.S.  
Jenis Kelamin : Wanita  
Pangkat/ Golongan : Pembina Tk I / ( IV c)  
NIP : 130 809 075  
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
Fakultas/Jurusan : Farmasi /Kimia Farmasi  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

C. Tim Peneliti

No.	NAMA DAN GELAR AKADEMIK	BIDANG KEAHLIAN	INSTANSI
1.	Dr. Noor Erma Sugijanto, M.S.	Kimia Farmasi/ Mikrobiologi	Fakultas Farmasi UNAIR
2.	Prof. Dr. Gunawan Indrayanto	Kimia Bahan Alam	Fakultas Farmasi UNAIR
3.	Prof. Dr. Noor Cholies Zaini	Uji aktivitas bahan alam	Fakultas Farmasi UNAIR

D. Pendanaan dan jangka waktu penelitian.

Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 (dua) tahun  
Biaya total yang diusulkan : Rp. 80.000.000,-  
Biaya yang disetujui tahun 2007-2008 : Rp. 70.000.000,-

Surabaya, Desember 2008  
Ketua Peneliti,

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Farmasi

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

(Dr. Noor Erma Sugijanto, M.S.)  
NIP. : 130 809 075

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian

(Prof. Dr. Bambang Sektiari L., DEA, drh)  
NIP. 131837004

## Ringkasan

Judul Penelitian: PARADIGMA BARU PRODUKSI ANTIBIOTIKA MENGGUNAKAN JAMUR ENDOFIT DARI TANAMAN *Alyxia reinwardtii*. BL

Noor Erma Sugijanto, Gunawan Indrayanto, Noor Cholies Zaini , 2008, 70 halaman Fakultas Farmasi UNAIR, Dibiayai Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Depdiknas No: 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007 TGL 29 MARET 2007.

Jamur endofit menyimpan potensi ekonomi tak terbatas yang saat ini belum banyak diaplikasikan dalam industri farmasi dan pertanian sebagai sumber bahan obat, enzim dan senyawa biologis pengendali hama di masa depan. Penemuan jamur endofit yang dapat menghasilkan bahan berkhasiat obat yang karakteristik dihasilkan oleh tanaman inangnya membuka peluang untuk menghasilkan obat yang sulit disintesa dari mikroba yang tersembunyi dalam inangnya tersebut. Hal ini merupakan alternatif memenuhi kebutuhan obat yang meningkat seiring dengan meningkatnya populasi namun tetap mempertahankan keaneka-ragaman hayati dan kelestarian ekosistem .

*Alyxia reinwardtii* (pulasari), Apocynaceae digunakan sebagai komponen utama jamu di Indonesia, tanaman tersebut mendekati punah. *Alyxia reinwardtii* BL diidentifikasi mengandung kumarin, 5-hidroksikumarin, 8-hidroksikumarin, pinoresinol, 9  $\alpha$ -hidroksipinoresinol dan salisifoliol. Fakta bahwa *Alyxia reinwardtii* (pulasari) mendekati punah, kemampuan endofit menghasilkan senyawa berkhasiat dan endofit sebagai sumber yang kaya untuk mendapatkan bahan bioaktif berpotensi antimikroba maka menarik untuk meneliti lebih lanjut metabolit berkhasiat dari jamur endofit ini.

Hasil penelitian terdahulu didapatkan beberapa jamur endofit yang dapat diisolasi dari *Alyxia reinwardtii* BL, diantaranya diidentifikasi sebagai: *Lecythophora sp.*, spesies yang baru dikenal menurut CBS – Utrecht dengan dua jenis yaitu 30.1 dan 30.5, juga *Hypocrea cf.koningii*, *Kabatiella caulivora*, *Cladosporium oxysporum* dan *Aspergillus penicilloides*.

Tujuan penelitian ini melakukan isolasi dan elusidasi struktur metabolit sekunder jamur endofit *Lecythophora sp* 30.1 dan 30.5. dari *Alyxia reinwardtii* khususnya yang

berkhasiat antimikroba. Pada tahun pertama difokuskan pada metabolit yang aktif sebagai antibakteri, tahun kedua difokuskan pada metabolit yang aktif sebagai antifungi.

*Lecythophora sp* 30.1 dan 30.5 dikultivasi dalam 40 ml media cair *malt extract* pada pH 6,5 dan suhu kamar selama 4 minggu dalam Erlenmeyer 300 ml. Kultur disaring, kaldu fermentasi diekstraksi dengan etil asetat. Biomassa (miselia) diekstraksi dengan metanol 80%, dan dipartisikan dengan n-heksan-air dan kemudian dengan n-butanol. Masing-masing ekstrak dipekatkan dengan *vacuum rotavapor* pada suhu 35°C.

Ekstrak diuji aktivitas antimikrobanya secara dilusi agar dengan enam mikroba uji dilanjutkan dengan bioautografi terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 mewakili gram negatif, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis* mewakili gram positif. Streptomisin sulfat digunakan sebagai senyawa pembanding. Hasil uji bioautografi yang aktif hanya ekstrak etil asetat pada kadar 100 µg, 80 µg, 60 µg, dan 40 µg perspot terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, sedangkan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis*, ketiga ekstrak yang diuji semuanya tidak menunjukkan aktivitas. Uji antifungi dengan *Candida albicans* menunjukkan ekstrak etil asetat dan ekstrak heksan *Lecythophora sp* 30.1, sedang ekstrak butanol 30.5 menunjukkan aktivitas antimikroba pada konsentrasi 4,8 mg/mL. Ekstrak etil asetat dan ekstrak heksan setelah difraksinasi dengan khromatografi kolom dan vakum, dimurnikan dengan khromatografi lapis tipis preparatif diperoleh beberapa isolat metabolit yang kemudian dielusidasi struktur menggunakan NMR (1D, 2D) dan spektrometri massa.

Metabolit *Lecythophora sp* 30.1 dan 30.5 yang memiliki daya antibakteri adalah asam kojat, emodine, 7-kloremodin dan asam p-hidroksi benzoat, sedangkan yang memiliki aktivitas sebagai antifungi diperoleh asam kojat dan asam p-hidroksi benzoat.

Dilihat dari sisi praktis produksi senyawa bioaktif melalui fermentasi jamur endofit ini berpotensi besar bagi industri karena reproduсібel, penyediaannya bisa tidak terbatas karena tidak dibatasi jumlah tanaman. Peggandaan produktivitas mikroba relatif mudah dan dapat dihasilkan senyawa aktif yang berbeda dengan mengubah kondisi kultur mikroba.

## Summary

Endophytic fungi are one of the largely untapped resources that likely have several economically important applications in the future. Pharmaceutical industry and plant breeders are interested in endophytes for production of enzymes, medicines and biological control agents. Endophytic fungi live asymptotically and intercellularly within plant tissues (Tan and Zou, 2001).

The discovery of a fungus that produces a medically valuable plant product has opened a promising new approach to obtain rare drugs on commercial scale from microbes that grow inside plants. It provides an alternative strategy for easing the impact of the growing population on plants which are needed as well for the preservation of biodiversity and the ecosystem especially for *Alyxia reinwardtii* BL

*Alyxia reinwardtii* (pulasari – in Indonesia), Apocynaceae is one of the plants used in Indonesian traditional medicine as main component of the *jamu*. Due to over collection for *jamu* and their slow growth *Alyxia reinwardtii* became an endangered species. Endophytes can produce some phytochemicals originally characteristic of the host (Tan and Zou, 2001). Facts that *Alyxia reinwardtii* BL was endangered species, endophytic fungi ability phenomenon, antifungal and antimicrobial activity potentially produced from endophytic fungi and interactions between plants and their endophytes efforts to be continued this endophytes research.

On the previous study, some endophytic fungi has been isolated from *Alyxia reinwardtii* BL. One of these fungi identified by CBS in Utrecht as a member of genus *Lecythophora* and suspected to be a new species composed of 2 strains i.e. AE. 30.1 and AE.30.5 and the other were *Hypocrea cf.koningii*, *Kabatiella caulivora*, *Cladosporium oxysporum*, *Aspergillus penicilloides*.

Objective of this research : Isolation and elucidation of chemical constituents especially focused on the antimicrobial agent from the metabolites endophytic fungi *Lecythophora* sp. isolated from *Alyxia reinwardtii* BL. The aim of the first research year focused to the antibacterial agent and the second year focused to the antifungal agent.

The fungi was grown in 300 ml erlenmeyer flask containing 40 ml of a cultured broth malt extract (15 g/L), pH 6.5 at room temperature for 4 weeks. The culture was

filtered through filter paper and the fluid was extracted with ethyl acetate. The residue (mycelia) was blended and extracted thoroughly with methanol and then the methanol extract partitioned with n-hexane- water several time then followed with n-butanol. The solvent was removed from the organic extracts by vacuum evaporation at 35°C. The extracts were evaluated for its bioactive components as antimicrobial by dilution agar and bioautography method against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 representing the Gram positive bacteria and *Escherichia coli* ATCC 25922 as the Gram negative bacteria. Streptomycin sulfate as reference standard. The results, the ethyl acetate extracts at 100 µg, 80 µg, 60 µg and 40 µg perspot showed antibacterial activities against *Escherichia coli* ATCC 25922 and did not show any activity againts *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The hexane and butanol extracts did not show any activity against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The hexane and ethyl acetat extracts (30.1) showed antifungal activity and also the butanol extract from 30.5. The hexane and ethyl acetat extracts than applied to vacuum and column chromatography, purify with preparative TLC.

Elucidation of the secondary metabolites were conducted using NMR (1D, 2D) and mass spectrometry. Active compounds were kojic acid, emodine, 7-kloremodine and p.hidroxy benzoic acid identified by means chromatographic and spectroscopic methods.

From a practical viewpoint, microbial fermentation as a bioactive substance has several advantages: reproducible, producing a virtually inexhaustible supply of bioactive substance, and productivity amplification is relatively easy in microorganisms and different bioactive compounds can be produced by altering culture conditions.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Ahamdulillah saya panjatkan ke hadirat Allah swt karena atas perkenan dan rahmat-Nya maka penyusunan laporan penelitian Hibah Bersaing Tahun 2007-2008 yang berjudul: **PARADIGMA BARU PRODUKSI ANTIBIOTIKA MENGGUNAKAN JAMUR ENDOFIT DARI TANAMAN *Alyxia reinwardtii* BL**, dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini saya menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Direktur Binlitabmas Dirjen Dikti 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. Terimakasih kami sampaikan pula kepada Bapak Drs Wardaya dari Kebun Raya Purwodadi dan Dr. Irawati dari Herbarium Bogoriensis- LIPI Bogor atas bantuan determinasi tanaman *Alyxia reinwardtii*, CBS di Utrecht, Prof. Dr. Rainer Ebel dan Arnulf Diesel dari Universitas Dusseldorf, Jerman atas bantuan determinasi jamur dan elusidasi struktur senyawa hasil penelitian ini.

Demikian pula kepada berbagai pihak yang tidak dapat kami sebutkan kesemuanya dan telah membantu selama pelaksanaan dan penyusunan laporan penelitian ini khususnya mahasiswa disampaikan terima kasih.

Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan serta bagi kepentingan nusa dan bangsa.

Tim Peneliti

## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
SUMMARY	v
UCAPAN TERIMA KASIH	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
I. PENDAHULUAN	1
II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	3
III. TINJAUAN PUSTAKA	
3.1 Tinjauan tentang jamur endofit dan metabolitnya.	4
3.2 Tinjauan tentang <i>Alyxia reinwardtii</i> BL (pulosari) suku Apocynaceae.	6
3.2.1 Tinjauan tentang suku Apocynaceae.	6
3.2.2 Tinjauan tentang <i>Alyxia reinwardtii</i> BL (pulosari)	6
3.3 Tinjauan Tentang Uji Aktivitas Antimikroba	7
3.3.1 Tinjauan Tentang Bakteri Uji	9
3.3.2 Metode Uji Aktivitas Antimikroba	12
IV. METODE PENELITIAN	15
4.1 Bahan	15
4.1.1 Bahan Penelitian	15
4.1.2 Bahan Media	15
4.1.3 Bahan kimia	15
4.1.4 Bakteri uji	15
4.1.5 Alat	16
4.2 Tahapan kerja	16
4.2.1 Isolasi jamur endofit dari tanaman inang	17



4.2.2	Determinasi jamur endofit hasil isolasi	17
4.2.3	Kultivasi jamur endofit pada kultur <i>in vitro</i>	17
4.2.4	Ekstraksi, fraksinasi dan pemurnian metabolit sekunder hasil kultivasi	17
4.2.5	Uji aktivitas antimikroba	20
4.2.6	Karakterisasi dan elusidasi metabolit sekunder yang berkhasiat antimikroba.	24
V.	HASIL DAN PEMBAHASAN	26
5.1	Hasil Isolasi dan determinasi Jamur Endofit	26
5.2	Kultivasi jamur endofit dan ekstraksi metabolitnya.	27
5.3	Hasil Pengamatan Uji Aktivitas Antimikroba dengan dilusi padat	27
5.3.1	Hasil pengamatan ekstrak etil asetat <i>Lecythophora sp</i> 30.1 dan 30.5	27
5.3.2	Hasil pengamatan terhadap ekstrak n-heksan	30
5.3.3	Hasil pengamatan terhadap ekstrak n-butanol	33
5.4	Hasil Pengamatan Uji Aktivitas Antibakteri dengan bioautografi	40
5.5	Hasil KLT ekstrak dengan beragam penampak noda	45
5.6	Identifikasi metabolit	48
5.6.1	Identifikasi metabolit dari ekstrak etil asetat	48
5.6.1.1	Isolat 1	48
5.6.1.2	Isolat 2	50
5.6.1.3	Isolat 3	52
5.6.1.4	Isolat 4	55
VI.	KESIMPULAN DAN SARAN	60
	DAFTAR PUSTAKA	62

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Hasil determinasi endofit dari <i>A. reinwardtii</i>	26
Tabel 5.2 Hasil uji aktivitas ekstrak etil asetat 30.5 terhadap mikroba uji	27
Tabel 5.3 Hasil uji aktivitas ekstrak etil asetat 30.1 terhadap mikroba uji	28
Tabel 5.4 Hasil uji aktivitas ekstrak n-heksana 30.5 terhadap mikroba uji	31
Tabel 5.5 Hasil uji aktivitas ekstrak n-heksana 30.1 terhadap mikroba uji	31
Tabel 5.6 Hasil uji aktivitas ekstrak n-butanol 30.5 terhadap mikroba uji	34
Tabel 5.7 Hasil uji aktivitas ekstrak n-butanol 30.1 terhadap mikroba uji	34
Tabel 5.8 Hasil uji antibakteri ekstrak etil asetat	40
Tabel 5.9 Hasil uji ekstrak heksana dengan eluen heksan:etil asetat (7:3) dan ekstrak butanol dengan eluen kloroform:metanol:air (65:35:1)	40
Tabel 5.10 Data Rf dan warna noda metabolit ekstrak etil asetat 30.1 dan 30.5	45
Tabel 5.11 Data Rf dan warna noda serta aktivitas antibakteri metabolit ekstrak etil asetat 30.1 dan 30.5	46
Tabel 5.12 Metabolit <i>Lecytophora sp.</i> dan bioaktivitasnya berdasarkan pustaka	57

## DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 3.1	Tanaman inang <i>Alyxia reinwardtii</i> BL di Kebun Raya Purwadadi	6
Gambar 4.1	Skema pelaksanaan penelitian	23
Gambar 4.2	Skema pelaksanaan uji anti mikroba secara bioautografi	25
Gambar 5.1	Hasil uji aktivitas ekstrak etil asetat <i>Lecythophora sp.</i> 30.5 terhadap bakteri uji pada (1) Konsentrasi $1,2 \times 10^2$ ppm (2) Konsentrasi $2,5 \times 10^2$ ppm (3) Konsentrasi $5,0 \times 10^2$ ppm (4) Konsentrasi $1,0 \times 10^3$ ppm (5) Konsentrasi $2,5 \times 10^3$ ppm (6) Konsentrasi $3,0 \times 10^3$ ppm (24 jam) (7) Konsentrasi $3,0 \times 10^3$ ppm (48 jam) (8) Konsentrasi $3,5 \times 10^3$ ppm (9) Konsentrasi $5,0 \times 10^3$ ppm (A) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (B) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (C) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (D) <i>Salmonella typhi</i> (E) <i>Bacillus subtilis</i> FNCC 0059	29
Gambar 5.2	Hasil uji aktivitas ekstrak etil asetat <i>Lecythophora sp.</i> 30.5 terhadap <i>Candida albicans</i> pada (1) Konsentrasi $1,2 \times 10^2$ ppm (2) Konsentrasi $2,5 \times 10^2$ ppm (3) Konsentrasi $5,0 \times 10^2$ ppm (4) Konsentrasi $1,0 \times 10^3$ ppm (5) Konsentrasi $2,5 \times 10^3$ ppm (6) Konsentrasi $3,5 \times 10^3$ ppm (7) Konsentrasi $4,0 \times 10^3$ ppm (8) Konsentrasi $5,0 \times 10^3$ ppm.	30
Gambar 5.3	Hasil uji aktivitas ekstrak n-heksana 30.5 terhadap mikroba uji pada (1) Konsentrasi $1,2 \times 10^2$ ppm (2) Konsentrasi $2,5 \times 10^2$ ppm (3) Konsentrasi $5,0 \times 10^2$ ppm (4) Konsentrasi $1,0 \times 10^3$ ppm (5) Konsentrasi $2,5 \times 10^3$ ppm (6) Konsentrasi $3,5 \times 10^3$ ppm (7) Konsentrasi $5,0 \times 10^3$ ppm (A) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (B) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (C) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (D) <i>Salmonella typhi</i> (E) <i>Bacillus subtilis</i> FNCC 0059	32
Gambar 5.4	Hasil uji aktivitas ekstrak n-heksana 30.5 terhadap <i>Candida albicans</i> pada (1) Konsentrasi $1,2 \times 10^2$ ppm (2) Konsentrasi $2,5 \times 10^2$ ppm (3) Konsentrasi $5,0 \times 10^2$ ppm (4) Konsentrasi $1,0 \times 10^3$ ppm (5) Konsentrasi $2,5 \times 10^3$ ppm (6) Konsentrasi $3,5 \times 10^3$ ppm (7) Konsentrasi $4,0 \times 10^3$ ppm (8) Konsentrasi $5,0 \times 10^3$ ppm	33

Gambar 5.5	<p>Hasil uji aktivitas ekstrak n-butanol 30.5 terhadap mikroba uji pada (1) Konsentrasi <math>1,2 \times 10^2</math> ppm (2) Konsentrasi <math>2,5 \times 10^2</math> ppm (3) Konsentrasi <math>5,0 \times 10^2</math> ppm (4) Konsentrasi <math>1,0 \times 10^3</math> ppm (5) Konsentrasi <math>2,5 \times 10^3</math> ppm (6) Konsentrasi <math>3,5 \times 10^3</math> ppm (7) Konsentrasi <math>5,0 \times 10^3</math> ppm (A) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (B) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (C) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (D) <i>Salmonella typhi</i> (E) <i>Bacillus subtilis</i> FNCC 0059</p>	35
Gambar 5.6	<p>Hasil uji aktivitas ekstrak n-butanol 30.5 terhadap <i>Candida albicans</i> pada (1) Konsentrasi <math>1,2 \times 10^2</math> ppm (2) Konsentrasi <math>2,5 \times 10^2</math> ppm (3) Konsentrasi <math>5,0 \times 10^2</math> ppm (4) Konsentrasi <math>1,0 \times 10^3</math> ppm (5) Konsentrasi <math>2,5 \times 10^3</math> ppm (6) Konsentrasi <math>3,5 \times 10^3</math> ppm (7) Konsentrasi <math>4,0 \times 10^3</math> ppm (8) Konsentrasi <math>5,0 \times 10^3</math> ppm</p>	36
Gambar 5.7	<p>Bioautogram ekstrak etil asetat 30.1 (a) terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922; (b) terhadap <i>Bacillus subtilis</i>; (c) terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. (1) ekstrak etil asetat 30.1 100 <math>\mu\text{g}</math>; (2) ekstrak etil asetat 30.1 80 <math>\mu\text{g}</math>; (3) streptomisin sulfat 4 <math>\mu\text{g}</math>; (4) ekstrak etil asetat 30.1 60 <math>\mu\text{g}</math>; (5) ekstrak etil asetat 30.1 40 <math>\mu\text{g}</math>; dan (6) ekstrak etil asetat 30.1 20 <math>\mu\text{g}</math></p>	41
Gambar 5.8	<p>Bioautogram ekstrak etil asetat 30.5 (a) terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (b) terhadap <i>Bacillus subtilis</i> (c) terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (1) ekstrak etil asetat AE 30.5 100 <math>\mu\text{g}</math> (2) ekstrak etil asetat 30.5 80 <math>\mu\text{g}</math>; (3) streptomisin sulfat 4 <math>\mu\text{g}</math> (4) ekstrak etil asetat 30.5 60 <math>\mu\text{g}</math> (5) ekstrak etil asetat 30.5 40 <math>\mu\text{g}</math> (6) ekstrak etil asetat 30.5 20 <math>\mu\text{g}</math>.</p>	41
Gambar 5.9	<p>Bioautogram ekstrak heksan (a) terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (b) terhadap <i>Bacillus subtilis</i> (c) terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (1a) ekstrak heksan 30.1 100 <math>\mu\text{g}</math> (1b) ekstrak heksan 30.1 80 <math>\mu\text{g}</math> (2) streptomisin sulfat 4 <math>\mu\text{g}</math> (3a) ekstrak heksan 30.5 100 <math>\mu\text{g}</math> (3b) ekstrak heksan 30.5 80 <math>\mu\text{g}</math></p>	42
Gambar 5.10	<p>Bioautogram ekstrak butanol (a) terhadap <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (b) terhadap <i>Bacillus subtilis</i> (c) terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (1a) ekstrak butanol 30.1 100 <math>\mu\text{g}</math> (1b) ekstrak butanol 30.1 80 <math>\mu\text{g}</math> (2) streptomisin sulfat 4 <math>\mu\text{g}</math> (3a) ekstrak butanol 30.5 100 <math>\mu\text{g}</math> (3b) ekstrak butanol 30.5 80 <math>\mu\text{g}</math></p>	42

Gambar 5.11	Kromatogram ekstrak etil asetat 30.1 dengan penampak noda: sinar UV 254 nm (2) anisaldehyd (3) Dragendorff (4a) ceri-asam sulfat (4b) ceri-asam sulfat setelah beberapa menit (5) citrat borat (6) DPPH dengan Rf 0,34	45
Gambar 5.12	Kromatogram ekstrak etil asetat 30.5 dengan penampak noda: sinar UV 254 nm (2) anisaldehyd (3) Dragendorff (4a) ceri-asam sulfat (4b) ceri-asam sulfat setelah beberapa menit (5) citrat borat (6) DPPH dengan Rf 0,34	46
Gambar 5.13	Spektra massa EI-MS asam kojat metabolit <i>Lecythophora sp.</i>	49
Gambar 5.14	Kromatgram HPLC isolat 2	50
Gambar 5.15	Spektrum UV isolat 2	51
Gambar 5.16	Spektrum massa negatif ESI-MS isolat 2	51
Gambar 5.17	Spektrum H <sup>1</sup> NMR isolat 2 dalam MeOD	51
Gambar 5.18	Spektrum COSY isolat 2 dalam MeOD	52
Gambar 5.19	Kromatogram HPLC isolat 3	53
Gambar 5.20	Spektrum UV isolat	53
Gambar 5.21	Spektrum massa negatif ESI -MS isolat 3	53
Gambar 5.22	Spektrum <sup>1</sup> H NMR isolat 3 (MeOD)	54
Gambar 5.23	Spektrum <sup>1</sup> H NMR isolat 3 (DMSO)	54
Gambar 5.24	Kromatogram HPLC isolat 4	55
Gambar 5.25	Spektrum UV isolat 4	55
Gambar 5.26	Spektrum massa EI-MS isolat 4	56
Gambar 5.27	Spektrum <sup>1</sup> H NMR isolat 4 (DMSO)	56
Gambar 5.28	Spektrum <sup>1</sup> H NMR isolat 4 (DMSO) yang diperbesar	57
Gambar 5.29	Spektrum <sup>13</sup> C NMR isolat 4	57

## BAB I PENDAHULUAN

Sumber daya hayati Indonesia, khususnya mikroba belum banyak diteliti dan dimanfaatkan padahal potensi sebagai sumber bahan aktif dan senyawa berharga (*"novel substances"*) yang terkandung di dalamnya sangatlah besar. Penelitian menunjukkan hampir semua tanaman yang memiliki jaringan pengangkutan ditemukan mikroba endofit yang dapat berupa bakteri atau jamur. Mikroba endofit hidup intraseluler didalam jaringan tanaman yang sehat. Kemungkinan terjadi rekombinasi genetik dengan inangnya sehingga beberapa endofit terbukti mampu menghasilkan senyawa alami yang karakteristik bagi inangnya (Tan and Zou, 2001).

Beberapa metabolit yang dihasilkan endofit menunjukkan aktifitas antibakteri, antifungi, hormon pertumbuhan tanaman, insektisida, immuno suppresan (Tan and Zou, 2001). Metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antimikroba dihasilkan sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap serangan bakteri dan jamur lain atau hama dan predator bagi inangnya (Rayner, 1991). 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 senyawa bioaktif dalam bidang obat dan pertanian. Poduksi senyawa bioaktif melalui fermentasi mikroba endofit mempunyai keuntungan: reproduibel, kemampuannya dapat ditingkatkan dan dapat diproduksi secara tidak terbatas dalam skala industri. Kelebihan yang lain yaitu melalui rekayasa genetika dan kondisi kultivasi yang berbeda dapat dihasilkan produk yang berbeda (Stierle and Strobel, 1995).

Beberapa endofit dapat menghasilkan senyawa yang sangat karakteristik yang dimiliki oleh tanaman inangnya (Tan dan Zou, 2001). Penemuan jamur endofit yang dapat menghasilkan bahan berkhasiat obat yang karakteristik dihasilkan oleh tanaman membuka peluang baru untuk menghasilkan secara komersial obat yang sulit disintesa dari mikroba yang tersembunyi dalam inangnya tersebut. Mengingat hal tersebut diatas



menarik untuk meneliti metabolit jamur endofit dari *Alyxia reinwardtii* (pulasari), khususnya yang berkhasiat antimikroba.

*Alyxia reinwardtii* (pulasari), Apocynaceae digunakan sebagai komponen utama jamu di Indonesia. Akibat penggunaannya yang banyak untuk jamu namun karena pertumbuhannya lambat tanaman tersebut mendekati punah. *Alyxia reinwardtii* BL diketahui mengandung kumarin, 5-hidroksikumarin, 8- hidroksikumarin, pinoresinol, 9  $\alpha$ -hidroksipinoresinol dan salisifoliol (Steffan, 2006). Pinoresinol merupakan prekursor obat antikanker podofilotoksin ( Leuscher, 1998).

Hasil penelitian terdahulu didapatkan beragam jamur endofit hasil isolasi dari *Alyxia reinwardtii* yaitu *Lecythophora sp.*, yang terdiri dari dua jenis 30.1 dan 30.5, *Hypocrea cf. koningii*, *Kabatiella caulivora*, *Cladosporium oxysporum*, *Aspergillus penicillioides*. Fungi endofit diasumsikan menghasilkan metabolit yang berkhasiat antibakteri dan atau antifungi karena diyakini endofit mampu menekan kolonisasi hostnya oleh serangan spesies patogen. Dalam penelitian ini dipilih *Lecythophora s.p* 30.1 dan 30.5 yang dikatakan CBS-Utrecht tidak sama dengan spesies yang sudah ada untuk diisolasi metabolit sekundernya yang berkhasiat antimikroba.

Rumusan masalah: Fakta bahwa *Alyxia reinwardtii* (pulasari) mendekati punah, adanya kemampuan endofit menghasilkan senyawa berkhasiat obat dan endofit sebagai sumber yang kaya untuk mendapatkan bahan bioaktif berpotensi antimikroba dan antifungi maka penting meneliti metabolit jamur endofit ini.

Melalui penelitian ini diharapkan diperoleh jamur endofit yang dapat menghasilkan senyawa berkhasiat antimikroba dari jamur endofit yang diisolasi dari *Alyxia reinwardtii*. khususnya *Lecythophora sp.*, strain 30.1 dan 30.5.

## **BAB II**

### **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **TUJUAN PENELITIAN**

Melakukan isolasi dan elusidasi struktur metabolit sekunder jamur endofit *Lecythophora sp* 30.1 dan 30.5. dari *Alyxia reinwardtii* khususnya yang berkhasiat antimikroba. Pada tahun pertama difokuskan pada metabolit yang aktif sebagai antibakteri dan pada tahun kedua difokuskan pada aktivitasnya sebagai antifungi.

#### **Tujuan penelitian tahun pertama:**

Melakukan karakterisasi dan elusidasi struktur senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antibakteri.

#### **Tujuan penelitian tahun kedua :**

Melakukan karakterisasi dan elusidasi struktur senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antifungi.

#### **MANFAAT PENELITIAN**

Diharapkan dari penelitian yang dilakukan, dapat diisolasi berbagai senyawa berkhasiat antimikroba dari jamur endofit yang diisolasi dari *Alyxia reinwardtii*.

Melalui jamur endofit, dapat diproduksi senyawa metabolit yang berkhasiat obat secara fermentasi, dalam waktu yang relatif singkat, tidak merusak tanaman inangnya dan tidak menimbulkan kerusakan ekologis. Hal ini sangat menguntungkan dibanding dengan ekstraksi dan isolasi langsung dari tanaman inang, yang akan menghabiskan banyak tumbuhan *Alyxia reinwardtii* yang sudah hampir punah.

## BAB III

### TINJAUAN PUSTAKA

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

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). Indonesia sebagai pemilik hutan hujan tropis terbesar didunia memiliki potensi luar biasa sebagai penghasil antibiotika dari endofit berkhasiat yang tersembunyi dalam berbagai jenis tanaman obat.

Berbagai golongan senyawa fungsional dapat dihasilkan endofit dan atau interaksinya dengan tanaman inang antara lain alkaloida, amina dan amida, derivat indol, piroлизidin, steroid, terpenoid, kuinon, flavon dan flavonoid, peptida, fenilpropanoid, 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 Taxol® (obat kanker dari tanaman *Taxus brevifolia*) dan camptothecin (bahan baku anti kanker) dari jamur endofit yang diisolasi dari tanaman *Nothapodytes foetida* (Puri, 2005).

Fungi endofit diasumsikan menghasilkan metabolit yang berkhasiat antibakteri dan atau antifungi karena diyakini endofit mampu menekan kolonisasi inangnya oleh serangan spesies patogen. Beberapa fungi endofit terbukti mampu menghasilkan antibiotika , a.l *phomopsichalasin* suatu sitokalasan berharga yang diproduksi endofit

*Phomopsis sp* dari tanaman *Salix gracilostyls var melanostachys* yang bersifat anti bakteri dan antifungi. *Cryptocin* suatu anti jamur yang sangat poten terhadap *Pyricularia oryzae* dan fitopatogen yang lain dikarakterisasi dari kultur endofit *Cryptosporiopsis quercina* yang diisolasi dari batang *Tripterygium wilfordii* (Tan and Zou, 2001).

Penicillin N, sporiofungin A, B, C merupakan antibiotika yang diproduksi endofit *Pleurophomopsis sp.* dan *Cryptosporiopsis sp.* yang diisolasi dari tumbuhan *Cardamin heptaphylla* Schulz (Dreyfuss *et al.*, 1986). Brunner dan Petrini (1992) melaporkan 75% dari 80 jenis fungi endofit 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 *et al.*, 1986). Pada tanaman obat yang digunakan masyarakat tradisional ditemukan endofit yang mampu menghasilkan antibiotika, seperti tanaman obat suku aborigin *Kennedia nigricans* ditemukan endofit *Streptomyces munumbi* yang menghasilkan munumbicin A, B, C, D yang aktif sebagai anti bakteri terhadap anthrax, kuman tbc, anti jamur, anti malaria dan antikanker (Anonim, 2003).

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

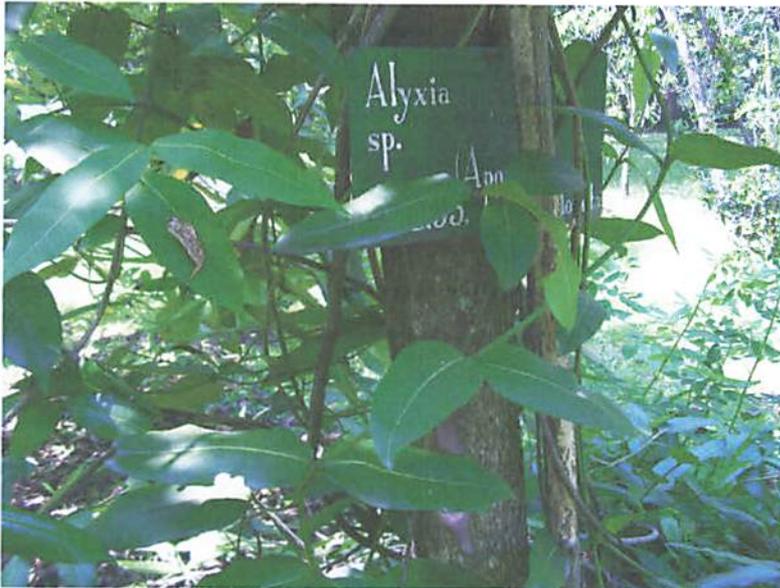
Pada perkembangannya penelitian endofit ini membuka pemikiran melakukan riset lebih lanjut untuk menjelaskan mengapa beberapa endofit dapat menghasilkan senyawa yang sangat karakteristik yang dimiliki oleh tanaman inangnya. Hal ini membuka peluang menggunakan endofit ini sebagai sumber yang kaya untuk mendapatkan bahan bioaktif dan senyawa berharga dengan potensi sebagai obat dan agrokimia misalnya hormon pertumbuhan tanaman, fungisida, insektisida, larvasida.

### 3.2 Tinjauan tentang *Alyxia reinwardtii* BL (pulosari) suku Apocynaceae.

#### 3.2.1 Tinjauan tentang suku Apocynaceae.

Suku Apocynaceae merupakan tumbuhan berkayu, semak, perdu atau pohon dengan buluh getah yang tidak beruas-ruas, seringkali memanjat, dengan daun tunggal yang duduk berhadapan, tanpa daun penumpu. Bunga banci, aktinomorf, berbilangan lima. Benang sari sebagian berlekatan dengan buluh mahkota, berseling dengan tajuk-tajuk mahkota. Bakal buah menumpang atau setengah tenggelam, beruang satu dengan tembuni pada dinding, adakalanya bakal buah beruang dua, atau terdapat dua bakal buah yang tangkai putiknya berlekatan dengan banyak bakal biji. Bakal buah dikelilingi cakram yang berlekuk empat sampai lima atau berbelah dua. Tangkai putik satu dengan penebalan dekat kepala putiknya. Buahnya buah buni, buah kurung atau serupa buah batu. Biji sering bersayap atau berambut, mempunyai endosperm sedikit atau tanpa endosperm, dengan lembaga yang besar. Suku ini membawahi 175 marga, meliputi sekitar 1000 jenis yang tersebar didaerah tropis (Tjitrosoepomo, 1998).

#### 3.2.2 Tinjauan tentang *Alyxia reinwardtii* BL (pulosari)



Gambar 3.1 Tanaman inang *Alyxia reinwardtii* BL di Kebun Raya Purwadadi.

*Alyxia reinwardtii* BL merupakan tanaman liar yang terdapat didalam hutan-hutan di lereng-lereng gunung yang tersebar diseluruh Asia dan kepulauan Pasifik yang beriklim tropis. Dalam bahasa daerah dikenal sebagai pulasari.

Batangnya menjalar melalui semak-semak. Batang tersebut tumbuh cabang-cabang yang tidak lebih besar dari ibu jari, dan berdaun. Kajunya putih dan lunak, tidak berbau, dipergunakan sebagai obat gosok pada orang yang demam terutama anak-anak. Kulitnya bergetah, koyak dan merekah, putih dan rasanya pahit namun baunya wangi. Pada waktu dikumpulkan lapisan gabusnya dikikis lebih dahulu baru kemudian batangnya diketuk-ketuk. Bila kulitnya terkelupas, baunya dapat dipertahankan sampai kira-kira dua tahun, namun kepahitannya cepat habis. Di Indonesia tanaman ini digunakan oleh wanita yang diletakkan dalam pakaian agar dapat memberi bau yang wangi. Selain itu tanaman ini menyembuhkan sariawan, dan sebagai penguat lambung. Pulasari juga digunakan sebagai penenang kejang (Heyne, 1987).

Penggunaan pulasari sebagai obat sudah berkembang sejak lama. Dalam tiap ramuan obat senantiasa disertai dengan adas maka dikatakan juga sebagai adas pulasari. Pemanfaatan *Alyxia reinwardtii* BL (pulosari) sebagai komponen jamu tidak disertai upaya pelestariannya sehingga terancam punah. Berdasarkan penelitian Puslitbang Farmasi, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia, *Alyxia sp.* aman digunakan, mempunyai efek farmakologi terhadap hewan coba dan memiliki data pendukung empiris untuk pengobatan batuk, disentri dan penggunaan yang ada hubungannya dengan wanita. Secara empiris *Alyxia reinwardtii* BL berkhasiat mengobati demam, sariawan, karminatif dan spasmolitik (Anonim, 1998). *Alyxia reinwardtii* BL diketahui mengandung senyawa kumarin, 5-hidroksikumarin, 8-hidroksikumarin, pinoresinol, 9  $\alpha$ -hidroksipinoresinol dan salisifoliol (Steffan, 2006). Pinoresinol suatu prekursor obat antikanker podofilotoksin (Leuscher, 1998).

### 3.3 Tinjauan Tentang Uji Aktivitas Antimikroba

Aktivitas antimikroba dari bahan alam dapat dideteksi dengan mengamati respon pertumbuhan beberapa jenis mikroorganisme uji terhadap ekstrak yang kontak dengannya. Dikenal berbagai metode uji namun hasilnya dipengaruhi metodenya juga

oleh mikroorganisme yang dipakai. Secara umum dikatakan evaluasi biologik tersebut lebih efisien dilakukan terhadap senyawa yang larut air dan senyawa murni dibandingkan dengan ekstrak (Berghe and Vlietinck, 1991).

Pemilihan organisme uji tergantung pada tujuan penelitian, jika penelitian bersifat umum, maka organisme uji hendaknya diseleksi seluas mungkin dan dapat mewakili golongan penting dari mikroba patogen, berdasarkan sifat fisika kimia dan pola resistensinya. Secara ideal uji yang lengkap terdiri dari 11 kuman patogen mewakili mikroba yang umum yang menyebabkan penyakit kulit, mata, syaraf, pernafasan, saluran cerna, saluran kencing dan saluran kelamin seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* (Berghe and Vlietinck, 1991).

Sebagian besar bakteri dan jamur dapat tumbuh pada *Standart Mueller Hinton Agar* atau *Diagnostic Sensitivity Test Agar* (DST) dan *American Type Culture Collection* (ATCC), hanya *Neisseria gonorrhoe* dan *Campylobacter fetus* yang memerlukan faktor-faktor pertumbuhan khusus yang ditambahkan ke dalam media. Mikroorganisme uji bisa diambil dari yang punya nomor ATCC sampai dengan yang diisolasi dari penderita, terutama pada mikroba yang resisten terhadap antibiotika (Berghe and Vlietinck, 1991).

Ada tiga kondisi yang harus dipenuhi. agar aktivitas antimikroba dapat terdeteksi, pertama ekstrak tanaman harus kontak dengan dinding sel mikroorganisme. Kedua, kondisi harus diatur sedemikian rupa agar organisme dapat tumbuh pada media yang mengandung antimikroba. Ketiga, penggunaan antimikroba yang diujikan memberikan hasil yang memadai selama waktu uji (Berghe and Vlietinck, 1991).

Ekstrak umumnya dibuat secara maserasi atau perkolasi dari bahan segar atau serbuk kering dengan menggunakan air atau pelarut organik. Kadang-kadang diperlukan fraksinasi untuk memisahkan komponen bersifat asam dari komponen bersifat basa.

Kandungan senyawa yang bersifat antimikroba dalam ekstrak tersebut seringkali sangat kecil konsentrasinya, sehingga harus dipekatan. Proses pemekatan sebaiknya dilakukan pada temperatur serendah mungkin untuk menghindari kerusakan komponen antimikroba yang bersifat termolabil. Sterilisasi menggunakan autoklaf sebaiknya

dihindari, sedangkan sterilisasi dengan filtrasi membran memberikan beberapa kerugian, yaitu senyawa antimikroba teradsorpsi pada filter. Sampel lipofilik yang tidak larut dalam air seperti minyak-minyak esensial atau ekstrak nonpolar perlu menggunakan pelarut lain selain air atau dibuat emulsi dengan penambahan surfaktan.

Sebelum pengujian hendaknya sampel diukur dahulu pH nya, sebab beberapa bakteri mungkin tidak dapat tumbuh karena terlalu asam atau terlalu basa. Secara praktis suatu penelitian akan mendapatkan hasil yang optimal apabila pH ekstrak yang diuji diatur dalam kondisi netral (pH 6,0-8,0) atau lebih baik dilarutkan dalam larutan dapar (Berghe and Vlietinck, 1991).

### 3.3.1 Tinjauan Tentang Bakteri Uji

*Staphylococcus aureus* berbentuk bola, gram positif, tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur, dengan diameter kira-kira 1µm. Pada biakan cair terlihat sebagai kokus tunggal, berpasangan, tetrad, dan berbentuk rantai. Kokus muda bersifat gram positif kuat, pada biakan tua, banyak sel menjadi negatif. *Staphylococcus aureus* tidak bergerak dan tidak membentuk spora. Kuman ini mudah tumbuh pada berbagai perbenihan dan metabolismenya aktif, meragikan pigmen yang bervariasi dari putih sampai kuning tua. *Staphylococcus aureus* menghemolisa darah dan mengkoagulasi protein (Bonang, 1989). *Staphylococcus aureus* mudah tumbuh pada keadaan aerobik pada suhu 6,5-48<sup>0</sup> C keasaman 4,2-9,3. Pada suhu 37<sup>0</sup> C mempunyai pertumbuhan paling cepat, tetapi paling baik membentuk pigmen pada suhu 20<sup>0</sup> C (Balley, 1974). *Staphylococcus aureus* dapat meragikan bermacam-macam karbohidrat dengan lambat. Pada keadaan aerob, asam yang dihasilkan adalah asam laktat, sedangkan pada keadaan anaerob asam yang dihasilkan adalah asam asetat dan CO<sub>2</sub>. Selain itu *Staphylococcus aureus* dapat meragikan manitol dan dapat tumbuh pada perbenihan dengan kadar garam yang tinggi (7,5-10) %. Bakteri ini menginfeksi manusia terutama pada mukosa daerah nasal, saluran pernapasan atas, saluran cerna dan kulit. Sifat khas infeksiya adalah pembentukan nanah. Keracunan makanan disebabkan oleh enterotoksin *Staphylococcus* ditandai oleh masa inkubasi 1-8 jam, mual-mual hebat, muntah, diare dan konvulsi. Gambaran infeksi lokalnya adalah tumbuhnya bintik-bintik, infeksi folikel rambut atau

peradangan hebat. Perubahan sistematik yang menyebabkan penurunan resistensi tubuh memberikan kontribusi bermakna terhadap infeksi *Staphylococcus aureus* seperti defisiensi nutrisi, reaksi alergi dan penyakit yang melemahkan (Bonang, 1989).

*Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk batang dan bergerak dengan flagel peritrik, mempunyai ukuran 0,4-0,7 x 1-4  $\mu\text{m}$ . Pada perbenihan sederhana sangat mudah tumbuh, hampir semua jenis marga ini meragikan laktosa menjadi gas. Pada media *Endo's* dan *Fosin Methylen Blue* akan mengkilat, khas untuk *Escherichia coli* (Bonang, 1989). Bakteri ini pada dasarnya tidak patogen. Patogenesitasnya berkaitan dengan pembentukan kapsul dan toksin yang dapat mencapai jaringan di luar saluran cerna yaitu: gastroenteritis akut infeksi saluran kemih, terutama pada wanita yang menikah dan pria setengah baya dengan perbesaran prostat. Selain itu bakteri ini dapat menyebabkan abses pada usus buntu, cholecystitis, peritonitis dan peradangan (Bonang, 1989).

*Bacillus subtilis* merupakan organisme saprofilik dan bersifat aerob yang banyak ditemukan dalam tanah dan tanaman yang membusuk. Penyebarannya dibantu oleh air, angin dan makanan. *Bacillus subtilis* termasuk bakteri gram positif, berbentuk batang silinder dengan diameter 1  $\mu\text{m}$  dan panjang 3-4  $\mu\text{m}$ , lurus atau sedikit melengkung dengan ujung membulat tunggal atau membentuk rantai panjang. Memiliki flagela untuk bergerak aktif dan mampu membentuk spora yang terletak pada ujung atau pusat dari sel bakteri (Pelczar, 1986). *Bacillus subtilis* menggunakan sumber-sumber nitrogen dan karbon sederhana untuk energi pertumbuhannya, lazimnya terdapat pada tanah, air, udara dan tumbuh-tumbuhan. *Bacillus subtilis* dapat mereduksi nitrat, menghasilkan enzim yang dapat menghidrolisis glukosa, sukrosa, maltosa kasein dan menghasilkan hidrogen sulfida. Spora resisten terhadap perubahan lingkungan, tahan panas kering dan desinfektan kimia tertentu selama waktu yang cukup lama dan tetap ada selama bertahun-tahun dalam tanah yang kering. Pendidihan selama 2 jam atau pemanasan suhu 120<sup>o</sup> C selama 15 menit akan membunuh kuman.

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang, ramping, kecil, lurus dan terkadang sedikit melengkung. Panjang 1 – 2  $\mu\text{m}$  dan lebar 0,3  $\mu\text{m}$ . Bakteri ini memiliki 1 – 3 flagela dan motil, tidak berspora dan tidak membentuk

kapsul (Smith *et al.*, 1960). Bakteri ini bersifat aerob. Tumbuh dalam media pada suhu 5 – 42 °C dengan suhu optimal 37 °C. Pada media agar, koloni *P. aeruginosa* berbentuk besar, halus, keabu-abuan dan menyebar, dapat menyatu dan menutupi seluruh permukaan media. Koloni tidak berpigmen tetapi memproduksi pigmen yang dapat larut dan berdifusi ke media agar dan memberi warna hijau terang berfluorescence serta menjadi gelap setelah beberapa hari, pada permukaan mungkin berwarna hijau metalik.

Bakteri ini mampu mencairkan gelatin, memproduksi H<sub>2</sub>S, dan sedikit asam dari sejumlah karbohidrat. Karakteristik lain yaitu tidak mampu memecah urea dan tidak membentuk indol, dapat memproduksi asam tanpa gas dari glukosa tapi tidak dari laktosa dan sukrosa, memiliki bau yang khas seperti bau anggur. *P. aeruginosa* dapat dimatikan pada suhu 55 °C selama 1 jam (Smith *et al.*, 1960).

*Salmonella typhimurium* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang pendek, lebar 0,5 - 0,8 µm dan panjang 1 - 3,5 µm. Bentuknya pada kultur yang lama lebih panjang. Bakteri ini nonmotil, tidak membentuk spora dan kapsul kecuali pada disosiasi fase M yang jarang (Smith *et al.*, 1960). *S. typhimurium* merupakan bakteri fakultatif anaerob. Bakteri ini tumbuh pada pH 6 – 8 dan suhu 15 – 41°C, dengan suhu optimum 37,5 °C. *S. typhimurium* tumbuh pada media sintesis yang mengandung glukosa dan garam amonia, meskipun beberapa strain membutuhkan tambahan triptofan. Koloni yang dihasilkan setelah inkubasi 24 jam lebih kecil dan transparan dibanding koloni bacili lainnya pada kolon. Pada media bismuth sulfid koloni berwarna hitam.

*S. typhimurium* memproduksi asam tanpa gas pada media glukosa, maltosa, manitol, dekstrin. Bakteri ini tidak memfermentasi laktosa dan sukrosa, bervariasi dalam memproduksi H<sub>2</sub>S, tidak memproduksi indol serta tidak dapat mencairkan gelatin. *S. typhimurium* dapat langsung dimatikan pada suhu pasteurisasi dan saat proses klorinasi (Smith *et al.*, 1960).

*Candida albicans* merupakan jamur mirip ragi, berbentuk kecil, oval, dan bertunas. *C. albicans* mampu mempunyai *chlamidospora*. *C. albicans* berkembang dari *pseudomycellium* oleh perpanjangan sel yang gagal lepas. Perbedaan *C. albicans* dibanding spesies *Candida* lain adalah kemampuan dalam memproduksi *chlamydospora*.

*C.albicans* tumbuh dengan mudah pada media *Sabouraud glukose agar*, suhu ruang maupun suhu inkubator selama 24 – 48 jam. Koloni yang tumbuh berukuran sedang, halus, mirip pasta, dan berbau khas ragi. Pada koloni yang tua dan besar, pada bagian tengah mungkin berbentuk seperti sarang lebah dan membentuk alur radial. Jamur ini memfermentasi glukosa dan maltosa membentuk asam dan gas. Proses fermentasi tidak tentu kecuali pada kondisi yang dikontrol. Pada media *Levine Eosin Methylene Blue agar* dengan suhu 37 °C, *C. albicans* dapat memproduksi koloni filamen dalam waktu 2 hari. *C. albicans* dapat dimatikan pada suhu 60 °C selama 90 menit dan suhu 70 °C selama 5 menit (Smith *et al.*, 1960).

### 3.3.2 Metode Uji Aktivitas Antimikroba

Metode uji antimikroba ekstrak bahan alam dikenal 3 macam, yaitu difusi, dilusi dan bioautografi. Beberapa faktor mempengaruhi hasil uji a.l. metode ekstraksi, volume inokulum, komposisi media, pH dan suhu inkubasi, jenis mikroba uji dan volume cuplikan (Rios, 1988).

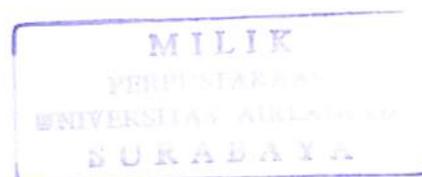
Pada metode difusi, sample dalam *reservoir* dibiarkan kontak dengan media yang sudah diinokulasi mikroba uji. Metode ini didasarkan pada difusi antibiotika dalam media yang ditanami kuman uji. Setelah diinkubasi akan terlihat daerah jernih di sekeliling pencadang. Daerah jernih menunjukkan daerah dimana terjadi hambatan pertumbuhan kuman dan ini sering disebut diameter daerah hambatan yang sebanding dengan konsentrasi antibiotika dalam pencadang. Semakin luas daerah hambatan berarti semakin besar aktivitas senyawa terhadap bakteri yang digunakan. Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap diameter daerah hambatan adalah komposisi dan pH media, ketebalan media, suhu dan waktu inkubasi, ukuran inokulum, laju difusi antibiotika melawan laju pertumbuhan kuman (Jawetz *et al.* 1991). Berdasar pencadang yang digunakan, metode difusi dapat dibedakan menjadi metode difusi cakram, metode difusi lempeng silinder dan metode difusi cetak lubang (sumuran) (Jawetz *et al.*, 1991; Lim, 1998).

Pada metode dilusi dilakukan suatu seri pengenceran larutan antibiotika dalam media pertumbuhan, mulai dari konsentrasi tinggi sampai dengan konsentrasi rendah.

Kuman ditanam dalam media dalam jumlah tertentu. Setelah inkubasi akan tampak adanya hambatan pertumbuhan. Metode ini dapat menentukan konsentrasi hambatan minimum dan konsentrasi bakterisida minimum. Metode dilusi dianggap sangat cocok dan akurat untuk menentukan kadar hambatan minimum antibiotik. Kerugian metode ini mahal dan memerlukan waktu yang lama sehingga jarang dilakukan untuk tes kepekaan di laboratorium rumah sakit ( Lim, 1998 ). Berdasarkan media yang digunakan, metode dilusi dapat dibedakan menjadi metode dilusi cair dan metode dilusi padat ( Jawetz *et al*, 1991; Black, 1999; Lim, 1998 ).

Metode bioautografi didasarkan pada efek biologis (antibakteri atau antifungi) senyawa yang diuji yang sebelumnya dilakukan kromatografi lapis tipis terlebih dahulu. Zona hambat diamati dengan pereaksi penampak noda yang mendeteksi adanya aktivitas dehidrogenase. Bioautografi memungkinkan mengetahui posisi khromatogram yang aktif sebagai antimikroba, dan dapat memberikan informasi berharga tentang senyawa kimia yang aktif tersebut (Rios, 1988). Sejak ditemukan metode ini digunakan secara luas untuk penemuan antibiotik baru (Berghe and Vlietinck, 1991). Metode ini dimulai dengan melaksanakan kromatografi lapis tipis dari ekstrak, kemudian kromatogram tersebut diberi media yang telah diinokulasi dengan mikroba uji dengan konsentrasi tertentu. Ada beberapa cara yang digunakan dalam metode ini yaitu bioautografi kontak, bioautografi imersi, dan bioautografi langsung

Metode bioautografi kontak didasarkan pada proses difusi senyawa yang dipreparasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) atau Kromatografi Kertas dari kromatogram menuju ke lapisan agar yang sudah diinokulasi dengan mikroorganisme. Antibiotik berdifusi dari pelat menuju lapisan agar dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Rios *et al.*, 1988). Kromatogram diletakkan terbalik pada lapisan agar yang sudah diinokulasi dan didiamkan beberapa menit atau beberapa jam untuk proses difusi senyawa antimikroba menuju ke lapisan agar. Kemudian kromatogram diangkat dan lapisan agar diinkubasi pada suhu yang sesuai sampai tampak selapis tipis dari pertumbuhan mikroorganisme. Zona hambat diamati pada permukaan agar dimana noda dari antimikroba menempel, jika positif akan nampak daerah bening di sekitar noda. Kerugian dari metode ini adalah kesulitan dalam pemeriksaan kontak antara pelat atau



kromatogram dengan lapisan agar serta perbedaan proses difusi dari seyawa antimikroba (Rios *et al.*, 1988; Choma, 2005).

Metode bioautografi imersi, pada metode ini kromatogram dilapisi cairan media agar yang sudah ditanami mikroba. Sebelum diinkubasi, pelat dibiarkan beberapa jam pada suhu rendah atau suhu kamar untuk memungkinkan terjadinya proses difusi antimikroba dari pelat menuju lapisan agar. Metode ini merupakan gabungan dari bioautografi kontak dan langsung. Antimikroba ditrasfer dari pelat KLT ke lapisan agar sebagaimana pada bioautografi kontak tapi selama inkubasi dan visualisasi lapisan agar tetap diatas pelat sebagaimana pada bioautografi langsung. Kekurangan dari metode ini adalah rendahnya sensitivitas yang disebabkan dilusi dari antimikroba pada lapisan agar dibanding dengan bioautografi langsung (Rios *et al.*, 1988; Choma, 2005).

Pada metode bioautografi langsung pelat dicelupkan pada suspensi mikroorganisme atau suspensi ini disemprotkan pada pelat KLT. Pelat diinkubasi dan mikroorganisme tumbuh langsung pada pelat, oleh sebab itu pemisahan, pengkondisian, inkubasi, visualisasi dilakukan pada pelat. Visualisasi atau penampakan aktivitas antimikroba biasanya digunakan garam tetrazolium, yang diubah oleh dehidrogenase dari mikroorganisme menjadi formazan yang akan berwarna intensif. Zona hambat diamati dengan adanya daerah bening pada sekitar noda (Rios *et al.*, 1988 ; Choma, 2005).

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Bahan

##### 4.1.1 Bahan penelitian

Bagian batang dan daun tanaman *Alyxia reinwardtii* diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur pada tanggal 12 April 2003. Determinasi *Alyxia reinwardtii* dilakukan Dr. Irawati dari Herbarium Bogoriensis – LIPI, Bogor.

##### 4.1.2 Bahan media

Pembiakan jamur dalam media padat digunakan Agar batangan (food grade), *Malt extract* (E. Merck), *Saboroud 2% dextrose broth* (Oxoid, CMI), *Potatoes Dextrose Agar* (Difco), *Nutrient broth* (Oxoid, CMI), NaCl (p.a., E. Merck).

##### 4.1.3 Bahan kimia

Bahan kimia untuk ekstraksi etil asetat, metanol, n-heksan, n-butanol dan diklorometan p.a. (Mallinckrodt Baker Inc. Philipsburg, NJ), untuk pemurnian dan KLT digunakan Pelate KLT *Silicagel 60 F<sub>254</sub>*, *Silicagel 60 G for column* dan bahan kimia pro analisis n-heksan, etil asetat, diklorometan, metanol, kloroform (Mallinckrodt Baker Inc. Philipsburg, NJ). Pereaksi penampak noda digunakan: anisaldehyd - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Dragendorf, uap amonia, Cerri sulfat dan FeCl<sub>3</sub>. *Chlorox* digunakan yang ada dipasaran (*Bayclin*) dengan kadar hipoklorit 5,25 %. Streptomisin sulfat (PT. Meiji Indonesia no. Batch SS03364-1).

##### 4.1.4 Bakteri uji

*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), dan *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* diperoleh dari ULP (Unit Layanan Pengujian) Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, *Bacillus subtilis* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.

#### 4.1.5 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 digunakan  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  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 yang digunakan adalah Finnigan LCQ-DECA dengan Agilent 1100 HPLC Series (Waldbronn, Germany) untuk sistem HPLC (pompa, detektor dan autosampler), kolom Knauer, (L) 125mm, (ID) 2mm, prepacked Eurospher-100 C18 (5 $\mu\text{m}$ ). *Mass spectrometer* dengan resolusi tinggi digunakan Micromass Q -TOF 2.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : *Laminair Air Flow Cabinet* (Dalton), timbangan analitik (Asep), *soccorex, autoclave* (Huxley HL – 340 Speedy), *microsyringe*. Spektrofotometer UV-Vis,  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, Spektrofotometri masa.

#### 4.2 Tahapan kerja

Dalam penelitian ini dilakukan tahapan sebagai berikut:

1. Isolasi jamur endofit dari tanaman inang (telah dilakukan pada PHB 2005-2006).
2. Determinasi jamur endofit hasil isolasi (telah dilakukan pada PHB 2005-2006).
3. Kultivasi jamur endofit pada kultur *in-vitro*.
4. Isolasi metabolit sekunder hasil kultivasi.
5. Uji antimikroba ekstrak metabolit hasil kultivasi (tahun pertama difokuskan pada daya antibakteri sedangkan tahun kedua pada daya antifungi).
6. Pemurnian metabolit yang aktif sebagai antimikroba.
7. Karakterisasi dan elusidasi struktur metabolit sekunder.

#### **4.2.1 Isolasi jamur endofit dari tanaman inang**

Daun dan batang tanaman *Alyxia reinwardtii* di peroleh dari Kebun Raya Purwodadi yang sudah dideterminasi oleh Dr.Irawati dari Herbarium Bogoriensis, LIPI Bogor selanjutnya dilakukan isolasi jamur endofit.

#### **4.2.2 Determinasi jamur endofit hasil isolasi**

Hasil isolasi jamur endofit dilakukan pemurnian hingga didapat koloni tunggal, selanjutnya dideterminasi, dibantu Prof. Dr. Rainer Ebel dari Universitas Dusseldorf.

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

Media *malt extract* agar steril disiapkan dalam bentuk agar miring di tabung. Media cair *malt extract* disiapkan dua liter untuk setiap kultivasi yang dibagi dalam 50 Erlenmeyer 300 ml yang ditutup kapas, masing- masing diisi 40 ml. Disterilkan di autoklaf pada suhu 121 ° C selama 20 menit. Media yang akan digunakan diinkubasi 3 hari untuk membuktikan sterilitasnya.

Jamur endofit hasil isolasi (kultur induk) ditumbuhkan dalam media *malt extract* agar miring diinkubasi 3 sampai 7 hari untuk digunakan sebagai inokulum kultivasi pada media cair. Diambil satu  $\text{Ose}$  inokulum jamur ditumbuhkan pada media cair *malt extract* 40 ml dalam labu erlenmeyer 300 ml. Pada saat inokulasi dilakukan juga penanaman inokulum pada media *malt extract* agar dalam tabung sebagai kontrol proses penanaman. Jamur ditumbuhkan secara kultur permukaan dalam kondisi gelap, pada suhu kamar, antara 14 – 56 hari. Dalam penelitian ini pada umur 28 hari dipanen (Stierle and Strobel, 1995; Ebel, 2003 dengan modifikasi).

#### **4.2.4 Ekstraksi, fraksinasi dan pemurnian metabolit sekunder hasil kultivasi**

Kultur endofit yang berumur 28 hari dipanen dengan cara disaring melalui kertas saring yang telah diketahui beratnya dengan corong Böhner. Miselia dicuci air suling dua kali. Media dan air bilasan miselia diekstraksi dengan etil asetat sepertiga volumenya dan digojok selama satu jam dengan *rotary shaker* (modifikasi). Ekstraksi ini diulang 3 kali (Ebel, 2003).

Miselial hasil kultivasi yang telah dicuci dan disaring, dikeringkan suhu 50<sup>o</sup> C selama 48 jam dan ditimbang hingga diketahui berat keringnya, dipotong – potong kecil dan ditambahkan metanol 80 % hingga terendam semalam. Miselial ini diultrasonikasi selama 15 menit dan diekstraksi berulang kali dengan *rotary shaker* selama 1 jam. Disaring melalui corong Büchner. Ekstraksi diulang hingga cairan hasil ekstraksi tidak berwarna. Ekstrak metanol dipekatkan dengan *vacuum rotavapor* pada suhu 35<sup>o</sup>C hingga sepertiga volume awal. Selanjutnya dipartisikan dengan n.heksan - air dan digojok dengan *rotary shaker* selama 1 jam. Fase heksan dipisahkan dengan corong pisah. Proses ekstraksi ini diulang 3 kali. Ekstrak n.heksan dikumpulkan. Fase air selanjutnya diekstraksi dengan n.butanol digojok 1 jam pada *rotary shaker* dan diulang 3 kali (Ebel, 2003). Hasil masing-masing ekstraksi dipekatkan menggunakan *vacuum rotavapor* pada suhu 35<sup>o</sup>C hingga diperoleh ekstrak kental selanjutnya diuapkan pada suhu kamar di lemari asam hingga kering. Fase air yang tersisa diuapkan pada suhu 50<sup>o</sup>C menggunakan *vacuum rotavapor* hingga kering. Ekstrak kering hasil isolasi disimpan di lemari es.

Fraksinasi dilakukan melalui dua macam cara yaitu kromatografi vakum dan kromatografi kolom. Kromatografi vakum dilakukan pada ekstrak etil asetat Ditimbang ekstrak kering hasil isolasi 3 gram, dilarutkan dalam pelarut semula (etil asetat) dalam labu alas bulat. Ditambahkan *Silica gel 60 G for column chromatography* 9 gram dicampur hingga homogen dan dikeringkan menjadi serbuk ekstrak kering melalui *vacuum rotavapor*. Disiapkan kolom kromatografi vakum dengan diisi adsorben *Silica gel 60 G for thin layer chromatography* 50 gram, dipadatkan dengan pompa vakum hingga setinggi 5 cm. Serbuk ekstrak kering diletakkan di bagian atas, dilapisi lagi dengan *Silica gel 60 G for column chromatography* dan terakhir ditutup kertas saring. Dilakukan elusi gradien dengan berbagai perbandingan eluen n-heksan – etil asetat, diklorometan – metanol dengan gradien 10 %, metanol – air dengan gradien 50 % (Coll and Bowden, 1986; Ebel, 2003). Pelarut untuk eluasi tiap fraksi digunakan campuran eluen 50 ml. Hasil fraksinasi ditampung selanjutnya dilakukan KLT dengan fase diam *Silica gel 60 F<sub>254</sub>*, dengan eluen kloroform : metanol : air ( 65 : 35 :1) (v/v); etil asetat : metanol (13,5 : 1,5) (v/v) dan n -heksan : etil asetat ( 3 : 2) (v/v). Noda hasil kromatografi yang memisah dengan R<sub>f</sub> 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 dan cerri - sulfat dikumpulkan untuk dimurnikan lebih lanjut.

Kromatografi kolom dilakukan terhadap ekstrak n-heksan dari massa sel dan ekstrak etil asetat dari media. Ditimbang ekstrak kering  $\pm$  3 gram, dilarutkan dalam n-heksan / etil asetat dalam labu alas bulat dan ditambahkan *Silica gel for column* dua kali berat ekstrak, dihomogenkan kemudian pelarutnya diuapkan dengan *vacuum rotavapor* hingga diperoleh serbuk homogen. Ditimbang 200 gram *Silica gel for column* untuk pembuatan kolom dengan eluen n- heksan – etil asetat ( 7 : 3 ) (v/v) yang dihasilkan dari proses optimasi melalui KLT sebelumnya. Eluasi dilanjutkan dengan campuran eluen n-heksan : etil asetat ( 6 : 4 ) (v/v) hingga etil asetat 100 % dan etil asetat : metanol ( 9 : 1 ) (v/v) (Houghton and Raman, 1998). Fraksi – fraksi yang diperoleh dilakukan KLT dengan *Silicagel 60 F<sub>254</sub>*, dengan eluen n. heksan : etil asetat ( 4 : 1 ) (v/v) dan ( 1 : 4 ) (v/v); kloroform : metanol : air ( 75 : 25 : 1 ) (v/v). Hasil KLT yang menunjukkan noda dengan Rf maupun warna sama dengan penampak noda sinar ultra violet 254 nm dan 365 nm atau anisaldehyd – asam sulfat digabung dalam satu fraksi. Fraksi tsb selanjutnya dimurnikan dengan *chromatography preparative* menggunakan pelat *Silicagel 60 F<sub>254</sub>*, dan RP 18. Sistem eluen yang digunakan masing masing diklormetan : metanol ( 9 : 1 ) (v/v) dan asetonitril : metanol : air ( 2 : 1 : 1 ) (v/v) . Hasil *chromatography preparative* selanjutnya dikerok dan diekstraksi kembali dengan pelarut yang sesuai dan 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 melalui proses rekristalisasi.

Isolat hasil pemurnian metabolit. dilakukan rekristalisasi dengan etil asetat dan aseton. Apabila didapatkan kristal ditentukan kemurniannya dengan mengamati titik leburnya dengan DTA. Uji kemurnian isolat metabolit dengan KLT dilakukan pada berbagai sistem fasa diam maupun eluen, 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 nm dan 365 nm atau pereaksi warna anisaldehyd - asam sulfat. Uji kemurnian juga dilakukan secara HPLC dan direkam spektrum ultra violet dari khromatogram yang dihasilkan.

#### **4.2.5 Uji aktivitas antimikroba**

Skrining aktivitas antimikroba ekstrak untuk tahun pertama difokuskan pada daya antibakteri, untuk tahun kedua difokuskan pada daya antifungi secara dilusi padat dan bioautografi *Lecytophora sp* strain AE.30.1 dan AE. 30.5. Mikroba uji digunakan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli*, dan *Bacillus subtilis* masing masing mewakili bakteri Gram positif dan negatif. Media perbenihan bakteri digunakan *nutrient broth* (28 gram dalam 1 liter dapar fosfat pH 7,0). Bahan media dilarutkan dan dituang ke tabung reaksi lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 20 menit dan digunakan setelah terbukti steril (tidak ada pertumbuhan selama 3 hari).

##### **4.2.5.1 Pembuatan suspensi mikroba uji**

Pembuatan suspensi mikroba dilakukan dengan menambahkan normal salin steril ke dalam tabung mikroba uji yang sudah dibiakkan selama 24 – 48 jam. Dikocok sampai koloni mikroba tersuspensikan ke dalam normal salin. Kemudian diukur kekeruhannya dengan Spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm, jika perlu diencerkan dengan normal salin steril sampai dicapai transmittan 25 % dibandingkan terhadap normal salin sebagai blanko (Anonim, 1995; Horvath, 2002).

##### **4.2.5.2 Pembuatan larutan ekstrak uji untuk metode dilusi agar**

Pembuatan larutan ekstrak uji 20 mg/mL untuk metode dilusi agar dilakukan sebagai berikut, ekstrak butanol, ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan ditimbang masing-masing 100,0 mg kemudian dilarutkan dalam larutan tween 20 %. Masing-masing ekstrak dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 ml diultrasonik secukupnya hingga larut dan ditambahkan pelarut hingga tepat tanda. Didapatkan larutan induk dengan kadar 20 mg/mL. Dilakukan pengenceran berseri dari konsentrasi 20 mg/mL untuk

mendapatkan konsentrasi 10,0 mg/mL, 5,0 mg/mL, 2,5 mg/mL, dan 1,2 mg/mL. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

#### **4.2.5.3 Uji Aktivitas Antimikroba Dengan Metode Dilusi Agar**

Larutan ekstrak uji konsentrasi 10 mg/mL, 5,0 mg/mL, 2,5 mg/mL, dan 1,2 mg/mL masing-masing diambil sebanyak 0,8 ml (untuk media *Nutrient Agar*) dan 0,5 ml (untuk media *Sabouraud Dextrose Agar*) lalu ditambahkan pada 7,2 ml *Nutrient Agar* dan 4,5 ml *Sabouraud Dextrose Agar* yang telah dicairkan kemudian dihomogenkan lalu dituang ke dalam cawan petri steril kemudian diratakan pada dasar cawan petri, didiamkan hingga memadat. Didapatkan konsentrasi ekstrak dalam masing-masing media adalah 0,12 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,50 mg/mL, dan 1,0 mg/mL. Konsentrasi pelarut tween dalam media sebanyak 2 %. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

Konsentrasi ekstrak uji dalam media ditingkatkan 2,5 mg/mL - 7,5 mg/mL dengan cara: larutan ekstrak uji 20 mg/mL diambil dalam jumlah tertentu kemudian ditambahkan pada media *Nutrient Agar* dan *Sabouraud Dextrose Agar* yang telah dicairkan kemudian dihomogenkan. Volume akhir media *Nutrient Agar* adalah 8 ml dan *Sabouraud Dextrose Agar* adalah 5 ml. Masing-masing media dituang ke dalam cawan petri steril kemudian diratakan pada dasar cawan petri lalu didiamkan hingga memadat. Konsentrasi tween yang bervariasi dalam media diantisipasi dengan kontrol pelarut tween. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

Kontrol positif digunakan larutan streptomisin 5,0 mg/mL diambil sebanyak 0,8 ml dan larutan mikonazol 7,0 mg/mL diambil sebanyak 0,5 ml, masing-masing ditambahkan kedalam 7,2 ml *Nutrient Agar* dan 4,5 ml *Sabouraud Dextrose Agar* yang telah dicairkan, dihomogenkan, dituang ke dalam cawan petri steril dan didiamkan hingga memadat. Didapatkan konsentrasi streptomisin dan mikonazol dalam media adalah 0,50 mg/mL dan 0,70 mg/mL. Konsentrasi ini dipilih berdasarkan hasil optimasi.

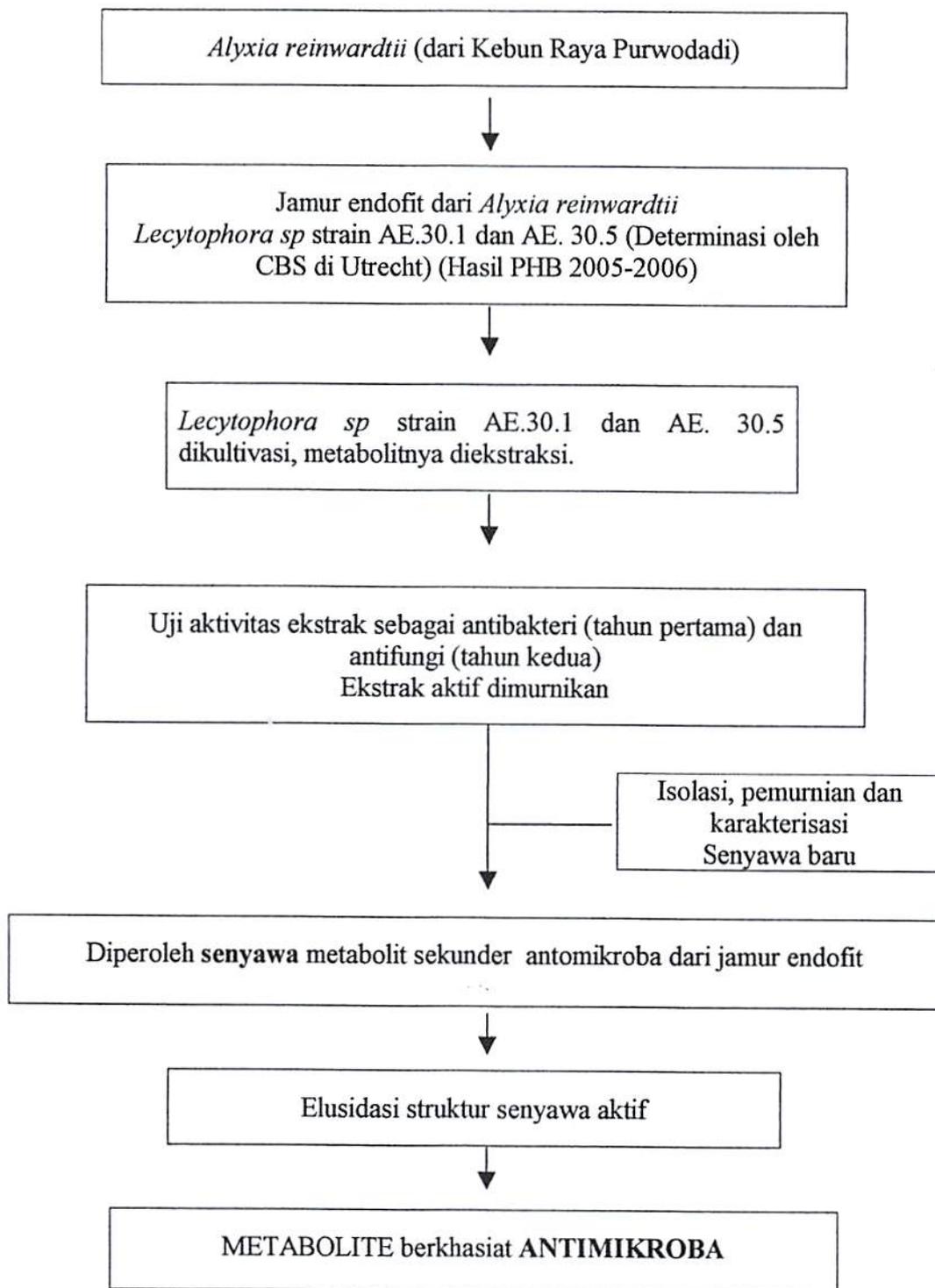
Kontrol negatif dilakukan sebagai berikut: larutan tween 20% diambil sebanyak 0,8 ml (untuk *Nutrient Agar*) dan 0,5 ml (untuk *Sabouraud Dextrose Agar*) masing-masing ditambahkan kedalam 7,2 ml *Nutrient Agar* dan 4,5 ml *Sabouraud Dextrose*

Agar yang dicairkan lalu dihomogenkan kemudian dituang ke dalam cawan petri steril dan didiamkan memadat. Didapatkan konsentrasi tween dalam media 2 %.

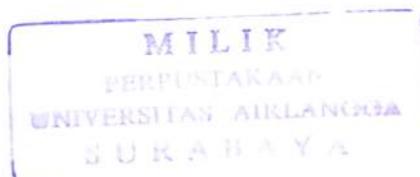
Kontrol inokulum (uji fertilitas) dan kontrol media ( uji sterilitas media) dilakukan sebagai berikut: masing-masing media *Nutrient Agar* sebanyak 8 ml dan media *Sabouraud Dextrose Agar* sebanyak 5 ml yang telah dicairkan dituang ke dalam cawan petri steril kemudian didiamkan hingga memadat. Inokulum bakteri yang telah disiapkan ditotolkan 0,5  $\mu$ L menggunakan mikropipet diatas permukaan agar pada tiap-tiap cawan petri ( kecuali cawan petri untuk kontrol media / uji sterilitas media), dan ditotolkan 3 kali pada masing-masing area penotolan bakteri. Bakteri *S.aureus* pada area A, *E.coli* pada area B, *P.aeruginosa* pada area C, *S.typhimurium* pada daerah D, dan *B.subtilis* pada daerah E. Jamur *Candida albicans*, ditotolkan pada permukaan media *Sabouraud Dextrose Agar*. Selanjutnya cawan petri yang telah diinokulasi dengan bakteri diinkubasi pada suhu 37 – 38 °C selama 24 jam sedangkan cawan petri yang terinokulasi dengan jamur diinkubasi pada suhu 32 - 33 °C selama 24 jam. Setelah 24 jam diamati koloni mikroba yang tumbuh pada permukaan media ekstrak uji dibandingkan dengan koloni mikroba yang tumbuh pada permukaan media kelompok kontrol. Nilai KHM ditentukan bila terdapat hambatan pertumbuhan koloni mikroba atau tidak ada pertumbuhan mikroba pada konsentrasi terendah sampel.

#### 4.2.5.4 Uji Aktivitas Antimikroba Dengan Metode Bioautografi

Pembuatan larutan uji dilakukan sebagai berikut: ditimbang 50 mg ekstrak uji dilarutkan sesuai dengan pelarutnya. Ekstrak etil asetat dengan etil asetat, ekstrak heksan dengan heksan, ekstrak butanol dengan metanol. Dimasukkan labu ukur 10 ml kemudian di ultrasonik sampai larut sempurna dan ditambahkan pelarut sampai 10,0 ml. Didapatkan larutan induk dengan kadar 5000 ppm selanjutnya diencerkan hingga didapat kadar 4000, 3000,2000 dan 1000 ppm. Masing masing ekstrak n. heksan, etil asetat dan n. butanol dilakukan kromatografi lapis tipis( KLT ) pada lempeng KLT( 10 x 10 cm ) Silica gel GF<sub>254</sub>. Larutan ekstrak uji ditotolkan sebanyak 20  $\mu$ L dengan kadar tertentu pada lempeng KLT.



Gambar 4.1. Skema pelaksanaan penelitian

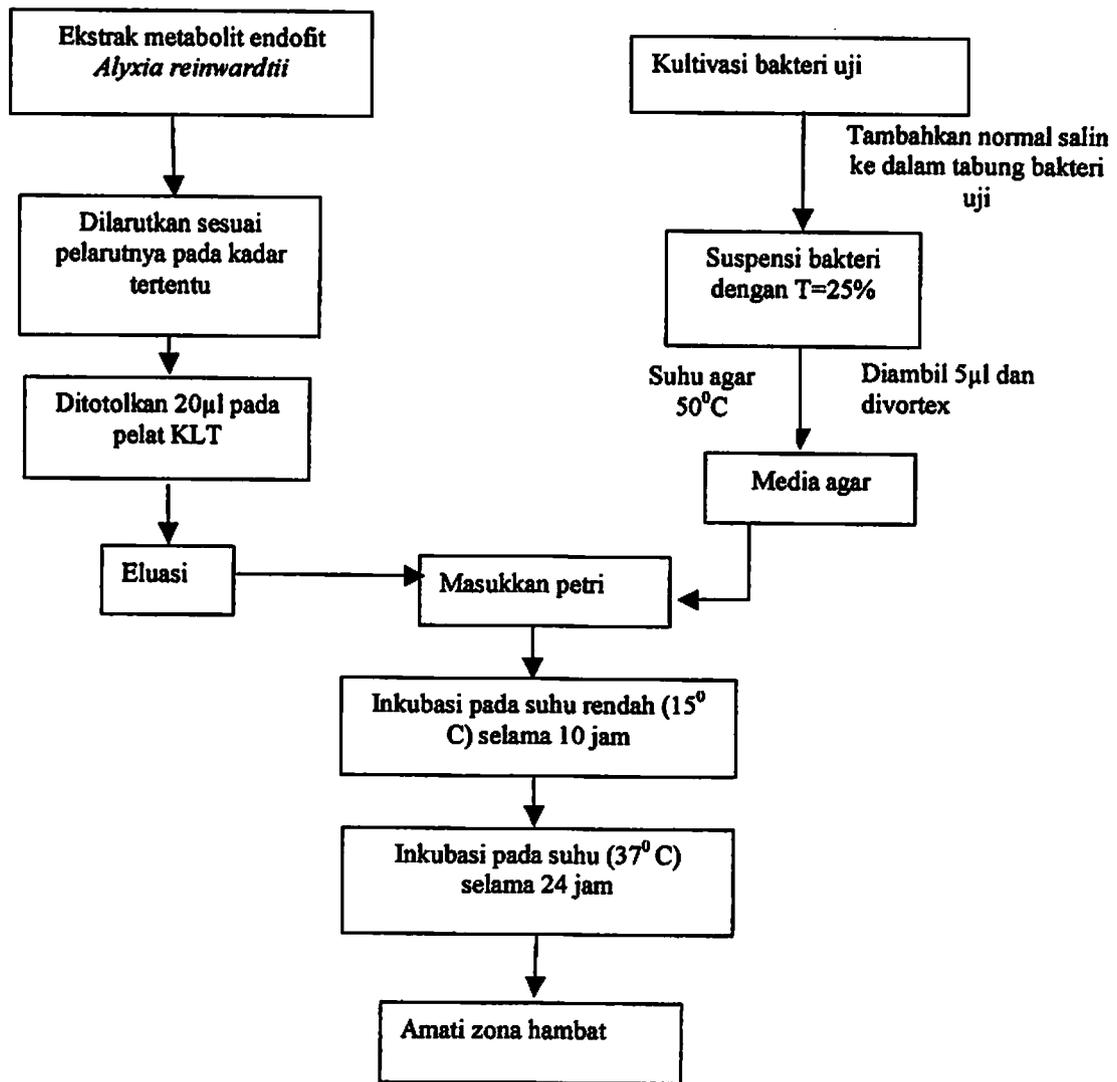


Ditotolkan juga streptomisin sulfat sebagai kontrol positif (100  $\mu\text{g}$ ) dan kemudian diekstraksi dengan fase gerak yang sesuai, ekstrak etil asetat dengan kloroform : metanol (9 : 1), ekstrak heksan dengan heksan : etil asetat (7 : 3), ekstrak butanol dengan kloroform : metanol : air (65 : 35 : 1). Bioautogram dibuat dengan meletakkan hasil KLT (yang telah dikeringkan dengan aliran udara untuk menghilangkan sisa eluen) di atas permukaan media agar perbenihan dalam cawan petri yang berisi media *Nutrient Agar* mengandung bakteri uji (5  $\mu\text{L}$  dalam 15 mL media), kemudian disimpan di dalam lemari es selama sepuluh jam agar proses difusi senyawa dalam noda kromatogram ke dalam media sempurna. Cawan petri dikeluarkan dari lemari es. Lempeng KLT diangkat dari permukaan agar, biakan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 24 jam. Diamati zona hambat pertumbuhan mikroba. Zona hambat ditandai dengan adanya daerah bening pada posisi noda. (Zheng, 2005). Ekstrak sample/cuplikan yang positif selanjutnya difraksinasi dan dimurnikan senyawa aktifnya.

#### **4.2.6 Karakterisasi dan elusidasi metabolit sekunder yang berkhasiat antimikroba.**

Dilakukan karakterisasi dan elusidasi struktur terhadap metabolit telah dimurnikan menggunakan 1D dan 2D-NMR, Mass spektrometri.

### Skema pelaksanaan uji anti mikroba



Gambar 4.2. Skema pelaksanaan uji anti mikroba secara bioautografi

## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Hasil Isolasi dan Determinasi Jamur Endofit

*Alyxia reinwardtii* BL diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 12 April 2003 dan telah dideterminasi oleh Dr.Irawati dari LIPI Bogor.

Beberapa jamur endofit berhasil diisolasi dari *Alyxia reinwardtii* BL, hasil determinasinya disajikan pada tabel 5.1. Sejauh ini belum ada publikasi tentang jamur endofit yang ada pada tanaman inang *Alyxia reinwardtii* BL yang tumbuh di Indonesia. Jamur endofit hasil isolasi dari *Alyxia reinwardtii* dengan kode AE 30.1 dan 30.5 adalah *Lecythophora sp* merupakan spesies yang baru dikenal seperti dinyatakan oleh CBS di Utrecht (Sugijanto, *et al.*, 2006). Jamur endofit yang lain juga telah diidentifikasi namun pada penelitian ini diutamakan pada metabolit dengan aktivitas antimikroba dari *Lecythophora sp* (30.1 dan 30.5).

Hubungan yang terjadi antara tanaman inang dengan endofitnya belum jelas benar namun dipostulatkan senyawa kimia (metabolit sekunder) yang dihasilkan jamur endofit bersifat antagonis terhadap serangga dan herbivora sehingga meningkatkan daya tahan tanaman inang (Carrol, 1998). Hal ini secara *in-vivo* efektif walaupun kejadian antagonisme antara endofit dan insekta ini tidak selalu terjadi. Jadi peran ekologis endofit ini penting sehingga secara rutin dilakukan uji penapisan jamur endofit yang ada untuk produksi *in-vitro* senyawa berkhasiat mengingat diversitas jamur endofit memiliki arti penting secara ekonomi (Lodge, 1996).

Tabel 5.1. Hasil determinasi endofit dari *A. reinwardtii* (Sugijanto, *et al.*, 2006).

Kode jamur	Hasil identifikasi
AE.30 (30.1 dan 30.5)	<i>Lecythophora sp.</i>
AE-A	<i>Hypocrea cf.koningii</i>
ALE 30 A.	<i>Kabatiella caulivora</i>
ALE 30 B	<i>Kabatiella caulivora</i>
ALE C.	<i>Cladosporium oxysporum</i>
ALE D.	<i>Aspergillus penicillioides</i>

## 5.2. Kultivasi jamur endofit dan ekstraksi metabolitnya.

Kultivasi jamur endofit *Lecytophora sp* (30.1 dan 30.5) dalam *Malt extract* pH awal 6,5 sebagai kultur diam (*static culture*) selama 4 minggu pada suhu kamar. Kultivasi dilakukan dua hingga enam minggu (Pulici, 1997). Dalam dua minggu biomassa yang dihasilkan relatif sedikit sementara pada kultivasi enam minggu resiko terjadi kontaminasi lebih besar. Didasarkan asumsi pembentukan metabolit sekunder ini umumnya terjadi pada fase *stationer* dan ditinjau dari fase pertumbuhan *Lecytophora sp*, fase *stationer* dicapai pada minggu ke-empat, dipilih waktu kultivasi 4 minggu.

Cairan kaldu fermentasi diekstraksi dengan etil aasetat, didapatkan ekstrak etil aasetat dan dari massa sel diperoleh ekstrak n - heksan dan ekstrak n - butanol. Ekstraksi dengan berbagai pelarut tersebut bertujuan mendapatkan semaksimal mungkin beragam metabolit sekunder yang ada. Pelarut yang berbeda memiliki kapasitas mengekstraksi senyawa fitokimia yang berbeda pula tergantung pada kelarutan atau kepolarannya (Marjorie, 1999).

## 5.3 Hasil Pengamatan Uji Aktivitas Antimikroba dengan dilusi padat

### 5.3.1 Hasil pengamatan ekstrak etil aasetat *Lecytophora sp* 30.1 dan 30.5

Uji aktivitas terhadap ekstrak etil aasetat *Lecytophora sp*. disajikan sebagai berikut:

Tabel 5.2. Hasil uji aktivitas ekstrak etil aasetat 30.5 terhadap mikroba uji

Sampel uji	Mikroba uji					
	S.a	E.c	P.a	S.t	B.s	C.a
Kadar ekstrak ( $1,2 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$ ) ppm	-	-	-	-	-	-
$2,5 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	-
$3,0 \times 10^3$ ppm <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	-
$3,0 \times 10^3$ ppm <sup>2</sup>	-	+	-	-	-	-
$3,5 \times 10^3$ ppm <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	-
$3,5 \times 10^3$ ppm <sup>2</sup>	+	+	+	+	+	-
$4,0 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	-
$5,0 \times 10^3$ ppm <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	-
$5,0 \times 10^3$ ppm <sup>2</sup>	+	+	+	+	+	-

Tabel 5.3. Hasil uji aktivitas ekstrak etil asetat 30.1 terhadap mikroba uji

Sampel uji	Mikroba uji					
	S.a	E.c	P.a	S.t	B.s	C.a
Kadar ekstrak						
( $1,2 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$ ) ppm	-	-	-	-	-	-
$2,5 \times 10^3$ ppm <sup>1</sup>	±	±	±	±	±	-
$2,5 \times 10^3$ ppm <sup>2</sup>	+	+	+	+	+	-
$3,0 \times 10^3$ ppm <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	-
$3,0 \times 10^3$ ppm <sup>2</sup>	+	+	+	+	+	-
$3,5 \times 10^3$ ppm <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	-
$3,5 \times 10^3$ ppm <sup>2</sup>	+	+	+	+	+	-
$5,0 \times 10^3$ ppm <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+
$5,0 \times 10^3$ ppm <sup>2</sup>	+	+	+	+	+	+

Keterangan :

*S. a* = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*E. c* = *Escherichia coli* ATCC 25922

*P. a* = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*S. t* = *Salmonella typhi*

*B. s* = *Bacillus subtilis*

*C. a* = *Candida albicans*

(±) ada hambatan pertumbuhan mikroba

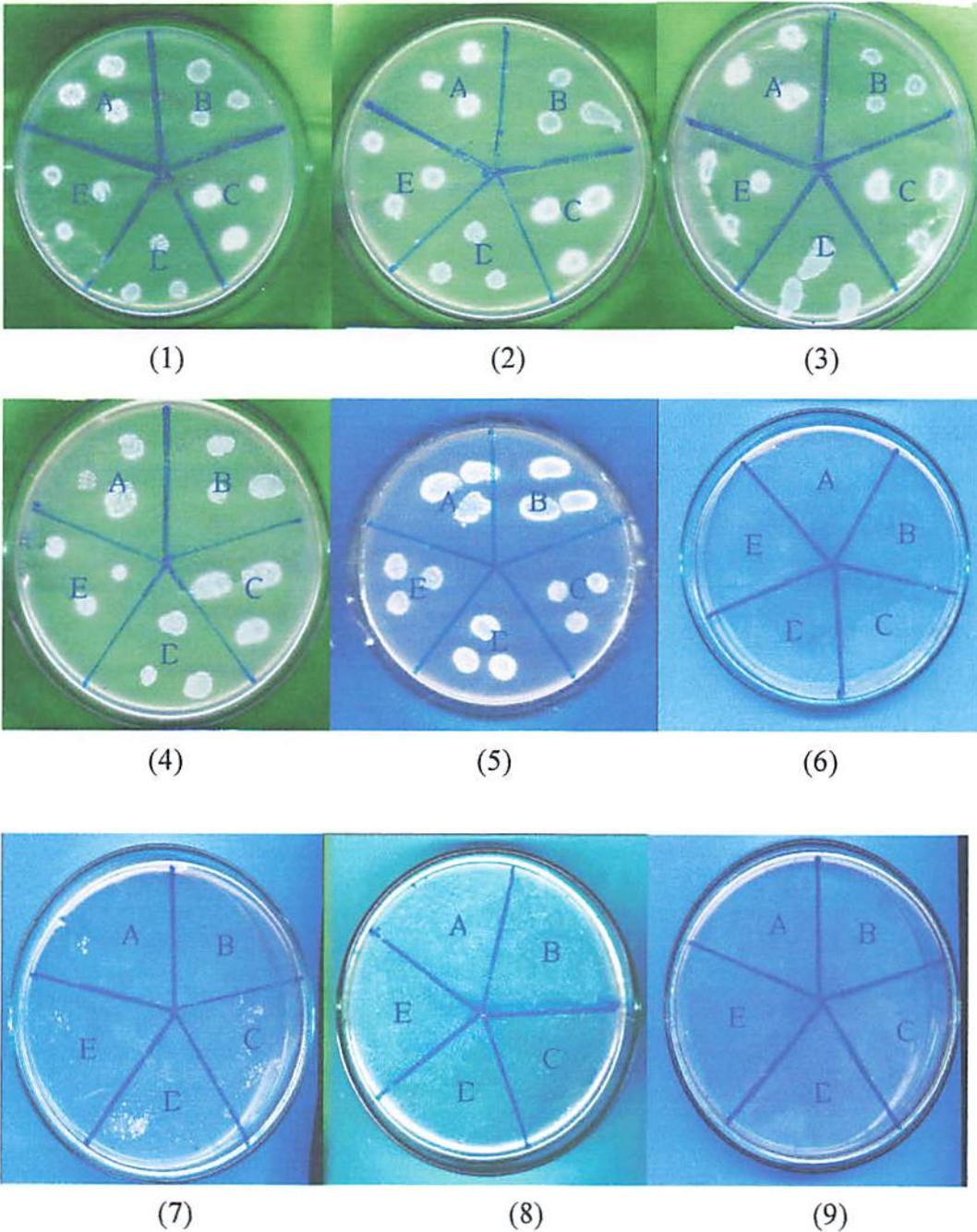
(+) mempunyai aktivitas antimikroba

(-) tidak mempunyai aktivitas antimikroba

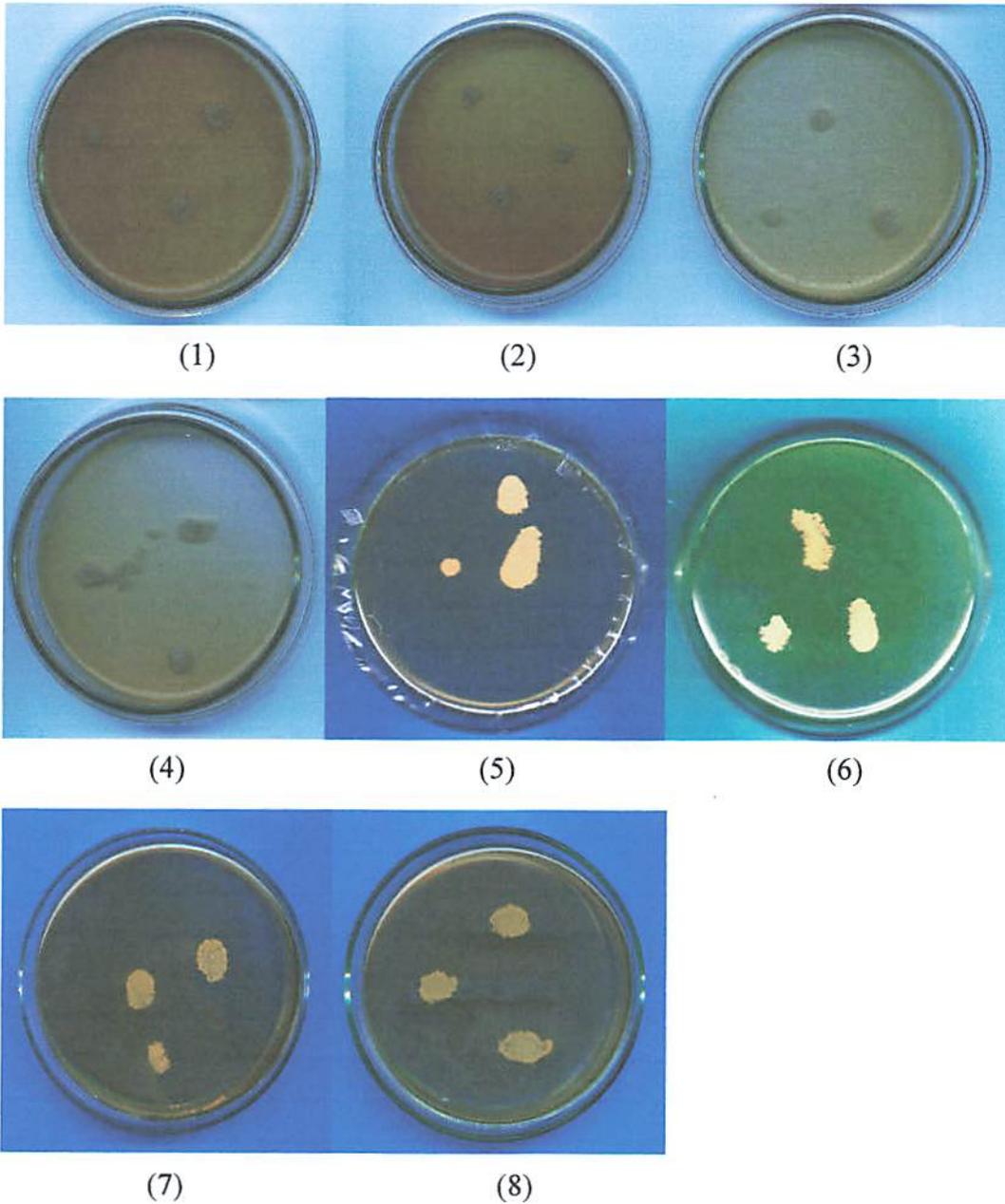
<sup>1</sup> pengamatan 24 jam

<sup>2</sup> pengamatan 48 jam

Uji aktivitas antimikroba dilakukan replikasi tiga kali. Pengamatan hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak *Lecythophora sp.* dalam hal ini diwakili oleh ekstrak dari 30.5 digambarkan pada gambar-gambar berikut ini.



Gambar 5.1. Hasil uji aktivitas ekstrak etil asetat *Lecythophora sp.* 30.5 terhadap bakteri uji pada (1) Konsentrasi  $1,2 \times 10^2$  ppm (2) Konsentrasi  $2,5 \times 10^2$  ppm (3) Konsentrasi  $5,0 \times 10^2$  ppm (4) Konsentrasi  $1,0 \times 10^3$  ppm (5) Konsentrasi  $2,5 \times 10^3$  ppm (6) Konsentrasi  $3,0 \times 10^3$  ppm (24 jam) (7) Konsentrasi  $3,0 \times 10^3$  ppm (48 jam) (8) Konsentrasi  $3,5 \times 10^3$  ppm (9) Konsentrasi  $5,0 \times 10^3$  ppm (A) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (B) *Escherichia coli* ATCC 25922 (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (D) *Salmonella typhi* (E) *Bacillus subtilis* FNCC 0059



Gambar 5.2. Hasil uji aktivitas ekstrak etil asetat *Lecythophora sp.* 30.5 terhadap *Candida albicans* pada (1) Konsentrasi  $1,2 \times 10^2$  ppm (2) Konsentrasi  $2,5 \times 10^2$  ppm (3) Konsentrasi  $5,0 \times 10^2$  ppm (4) Konsentrasi  $1,0 \times 10^3$  ppm (5) Konsentrasi  $2,5 \times 10^3$  ppm (6) Konsentrasi  $3,5 \times 10^3$  ppm (7) Konsentrasi  $4,0 \times 10^3$  ppm (8) Konsentrasi  $5,0 \times 10^3$  ppm.

### 5.3.2 Hasil pengamatan terhadap ekstrak n-heksana

Pengamatan uji aktivitas ekstrak n-heksana terhadap mikroba uji disajikan dalam tabel dan gambar sebagai berikut:

Tabel 5.4. Hasil uji aktivitas ekstrak n-heksana 30.5 terhadap mikroba uji

Kadar ekstrak uji	Mikroba uji					
	<i>S.a</i>	<i>E.c</i>	<i>P.a</i>	<i>S.t</i>	<i>B.s</i>	<i>C.a</i>
( $1,2 \times 10^2$ - $1,0 \times 10^3$ ) ppm	-	-	-	-	-	-
$2,5 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	-
$3,5 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	-
$4,0 \times 10^3$ ppm						-
$5,0 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	+

Tabel 5.5 Hasil uji aktivitas ekstrak n-heksana 30.1 terhadap mikroba uji

Kadar ekstrak uji	Mikroba uji					
	<i>S.a</i>	<i>E.c</i>	<i>P.a</i>	<i>S.t</i>	<i>B.s</i>	<i>C.a</i>
( $1,2 \times 10^2$ - $1,0 \times 10^3$ ) ppm	-	-	-	-	-	-
$2,5 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	-
$3,5 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	-
$5,0 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	+
$7,5 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	x

Keterangan :

*S. a* = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*E. c* = *Escherichia coli* ATCC 25922

*P. a* = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*S. t* = *Salmonella typhi*

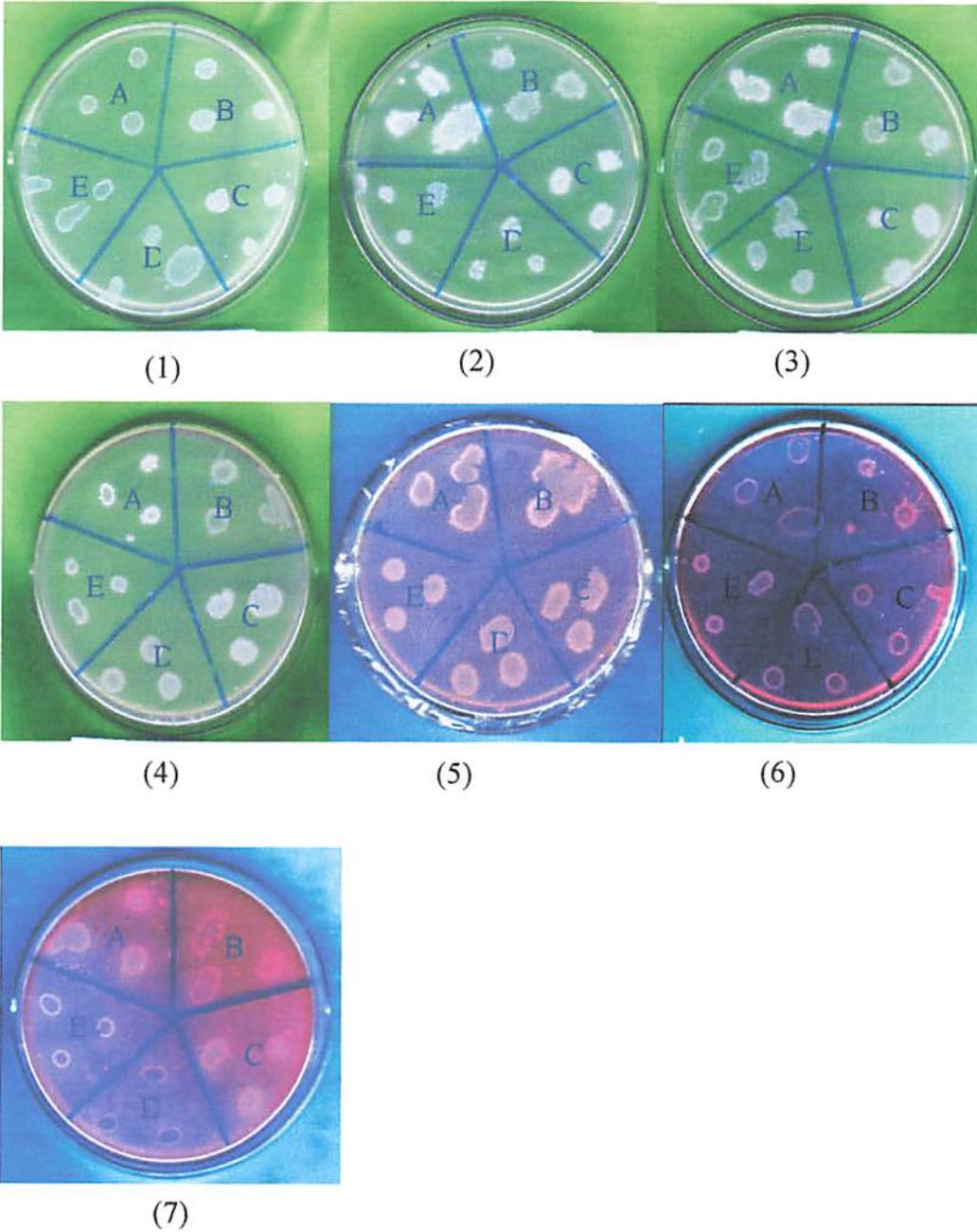
*B. s* = *Bacillus subtilis*

*C. a* = *Candida albicans*

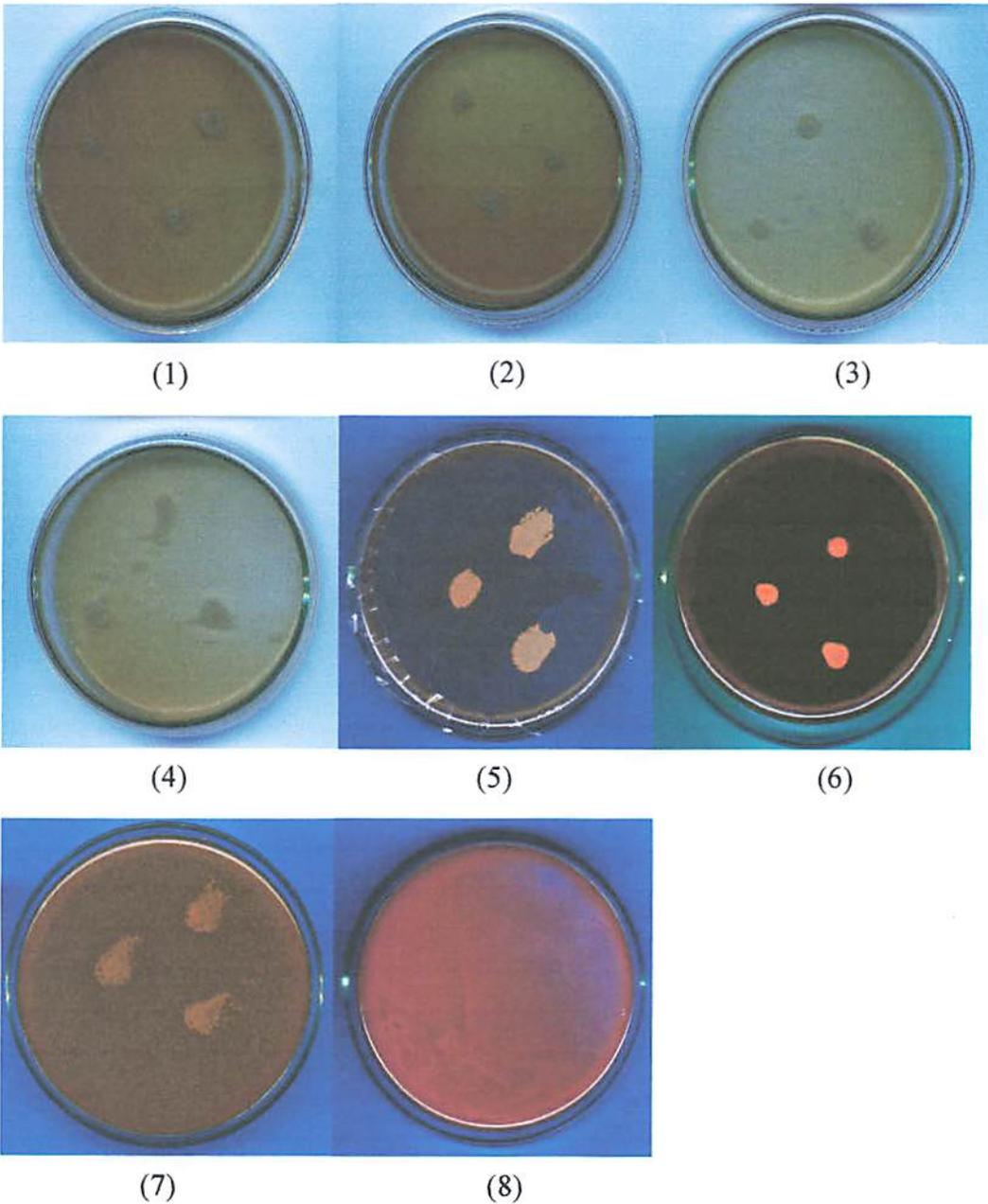
(+) mempunyai aktivitas antimikroba

(-) tidak mempunyai aktivitas antimikroba

(x) uji tidak dilakukan



Gambar 5.3. Hasil uji aktivitas ekstrak n-heksana 30.5 terhadap mikroba uji pada (1) Konsentrasi  $1,2 \times 10^2$  ppm (2) Konsentrasi  $2,5 \times 10^2$  ppm (3) Konsentrasi  $5,0 \times 10^2$  ppm (4) Konsentrasi  $1,0 \times 10^3$  ppm (5) Konsentrasi  $2,5 \times 10^3$  ppm (6) Konsentrasi  $3,5 \times 10^3$  ppm (7) Konsentrasi  $5,0 \times 10^3$  ppm (A) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (B) *Escherichia coli* ATCC 25922 (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (D) *Salmonella typhi* (E) *Bacillus subtilis* FNCC 0059



Gambar 5.4 Hasil uji aktivitas ekstrak n-heksana 30.5 terhadap *Candida albicans* pada (1) Konsentrasi  $1,2 \times 10^2$  ppm (2) Konsentrasi  $2,5 \times 10^2$  ppm (3) Konsentrasi  $5,0 \times 10^2$  ppm (4) Konsentrasi  $1,0 \times 10^3$  ppm (5) Konsentrasi  $2,5 \times 10^3$  ppm (6) Konsentrasi  $3,5 \times 10^3$  ppm (7) Konsentrasi  $4,0 \times 10^3$  ppm (8) Konsentrasi  $5,0 \times 10^3$  ppm

### 5.3.3 Hasil pengamatan terhadap ekstrak n-butanol

Pengamatan uji aktivitas ekstrak n-butanol terhadap mikroba uji disajikan dalam tabel dan gambar sebagai berikut:

Tabel 5.6 Hasil uji aktivitas ekstrak n-butanol 30.5 terhadap mikroba uji

Sampel uji	Mikroba uji					
	<i>S.a</i>	<i>E.c</i>	<i>P.a</i>	<i>S.t</i>	<i>B.s</i>	<i>C.a</i>
( $1,2 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$ ) ppm	-	-	-	-	-	-
$2,5 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	-
$3,5 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	-
$4,0 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	-
$5,0 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	+

Tabel 5.7 Hasil uji aktivitas ekstrak n-butanol 30.1 terhadap mikroba uji

Sampel uji	Mikroba uji					
	<i>S.a</i>	<i>E.c</i>	<i>P.a</i>	<i>S.t</i>	<i>B.s</i>	<i>C.a</i>
( $1,2 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$ ) ppm	-	-	-	-	-	-
$2,5 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	-
$3,5 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	-
$4,0 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	-
$5,0 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	-
$7,5 \times 10^3$ ppm	-	-	-	-	-	-

Keterangan :

*S. a* = *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*E. c* = *Escherichia coli* ATCC 25922

*P. a* = *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*S. t* = *Salmonella typhi*

*B. s* = *Bacillus subtilis*

*C. a* = *Candida albicans*

(+) mempunyai aktivitas antimikroba

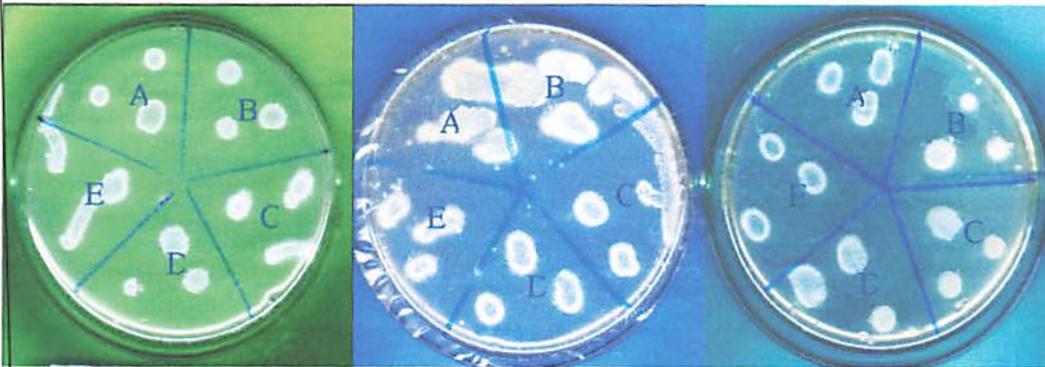
(-) tidak mempunyai aktivitas antimikroba



(1)

(2)

(3)



(4)

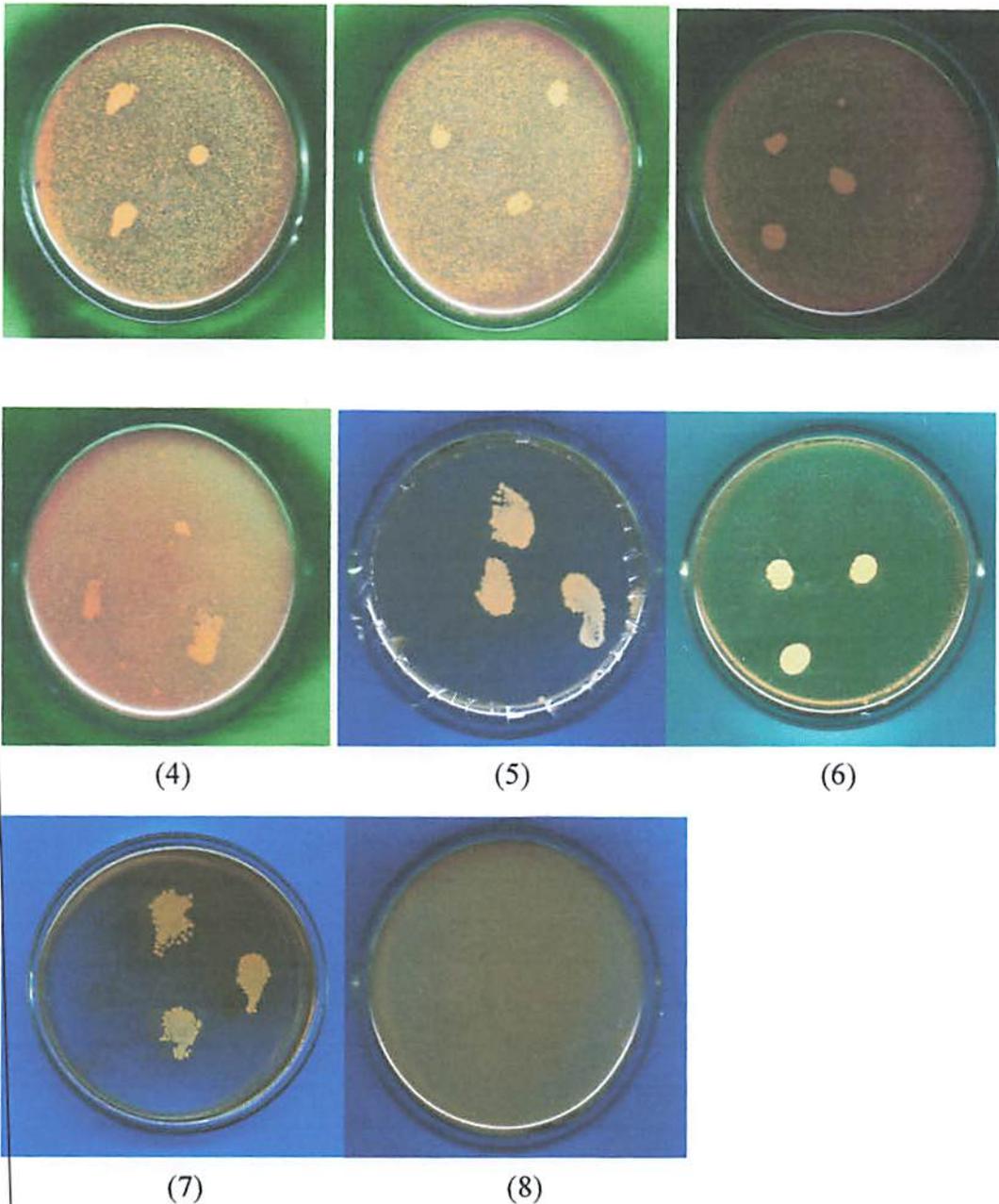
(5)

(6)



(7)

Gambar 5.5. Hasil uji aktivitas ekstrak n-butanol 30.5 terhadap mikroba uji pada (1) Konsentrasi  $1,2 \times 10^2$  ppm (2) Konsentrasi  $2,5 \times 10^2$  ppm (3) Konsentrasi  $5,0 \times 10^2$  ppm (4) Konsentrasi  $1,0 \times 10^3$  ppm (5) Konsentrasi  $2,5 \times 10^3$  ppm (6) Konsentrasi  $3,5 \times 10^3$  ppm (7) Konsentrasi  $5,0 \times 10^3$  ppm (A) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (B) *Escherichia coli* ATCC 25922 (C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (D) *Salmonella typhi* (E) *Bacillus subtilis* FNCC 0059



Gambar 5.6 Hasil uji aktivitas ekstrak n-butanol 30.5 terhadap *Candida albicans* pada (1) Konsentrasi  $1,2 \times 10^2$  ppm (2) Konsentrasi  $2,5 \times 10^2$  ppm (3) Konsentrasi  $5,0 \times 10^2$  ppm (4) Konsentrasi  $1,0 \times 10^3$  ppm (5) Konsentrasi  $2,5 \times 10^3$  ppm (6) Konsentrasi  $3,5 \times 10^3$  ppm (7) Konsentrasi  $4,0 \times 10^3$  ppm (8) Konsentrasi  $5,0 \times 10^3$  ppm

Pada penelitian awal uji aktivitas ini dilakukan optimasi dengan metode difusi cetak lubang, tetapi ternyata ekstrak n-heksan sulit berdifusi ke media agar meski telah digunakan pelarut tween 20% sehingga akhirnya digunakan metode dilusi padat. Metode dilusi padat dilakukan dengan mencampurkan larutan ekstrak uji dan media kemudian dituang ke dalam cawan petri steril, setelah media memadat,

suspensi mikroba uji ditotolkan di atasnya. Metode dilusi padat ini memiliki keuntungan dapat digunakan untuk ekstrak nonpolar karena dapat langsung dicampur dengan media agar, sehingga ekstrak langsung kontak dengan mikroba uji, selain itu proses uji aktivitas menjadi lebih efisien karena kelima bakteri uji dapat langsung diinokulasikan di atas permukaan media uji sehingga menghemat ekstrak uji (Rios *et al.*, 1988). Umumnya ekstrak bahan alam termolabil, sehingga terdegradasi bila disterilkan dengan pemanasan maupun radiasi sinar gama, kelebihan metode dilusi padat yang lain ekstrak uji tidak harus steril, meskipun demikian sampel sebaiknya dipreparasi secara aseptis. Terjadinya kontaminasi pada media agar juga mudah dideteksi (Hostettmann, 1991).

Dalam hal ini mikroba uji yang dipilih adalah *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, dan *Bacillus subtilis*. Keenam mikroba ini mewakili kelompok bakteri gram positif, gram negatif, serta jamur penyebab berbagai penyakit seperti infeksi saluran kemih, infeksi mata dan telinga (*Pseudomonas aeruginosa*), infeksi kulit kulit, jerawat, bisul, *cystitis*, *pyelitis* (*Staphylococcus aureus*), infeksi pada penderita *imunocompremise* (*Bacillus subtilis*), diare, gangguan pencernaan (*Eschericia coli*), demam tifoid, infeksi usus (*Salmonella typhimurium*), dan candidiasis (*Candida albicans*). Sebelum digunakan mikroba uji diidentifikasi dengan pewarnaan Gram untuk bakteri serta *Lactofenol Cotton Blue* untuk jamur *Candida albicans*.

Pada preparasi sampel, untuk membantu dispersi zat uji yang kurang polar dalam media yang polar dapat digunakan surfaktan misalnya Tween 20 atau Tween 80 (Rios *et al.*, 1988; Hostettmann, 1991). Hernandez *et al.*, 1999, menyarankan untuk senyawa non polar, digunakan pelarut 20% larutan Tween 20 dalam air, tetapi Rios *et al.*, 1988, menyebutkan bahwa konsentrasi akhir dari pelarut yang digunakan yang tidak mempunyai aktivitas antimikroba sebesar 2%. Pada penelitian awal, diketahui hingga konsentrasi 8% larutan Tween 20 dalam air tidak menunjukkan aktivitas antibakteri maupun antijamur sehingga untuk melarutkan ekstrak uji digunakan larutan tween 20 dengan konsentrasi 20% dalam air suling steril. Pelarut ini dipilih karena dapat melarutkan ekstrak butanol, ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan dengan baik walau pada ekstrak n-heksan terlihat dispersi yang halus. Pada kontrol media dan kontrol negatif menunjukkan mikroba uji masih tetap tumbuh.

Ekstrak etil asetat rentang konsentrasi 0,12 - 1,0 mg/mL belum memberi daya hambat, dalam hal ini belum tentu ekstrak tidak aktif karena aktif tidaknya suatu ekstrak dipengaruhi juga galur mikroba uji, pemilihan metode uji dan konsentrasi senyawa aktif di dalam ekstrak (Hostettmann, 1991; Kareem *et al.*, 2008). Ekstrak etil asetat konsentrasi 1,0 mg/mL mulai tampak menghambat pertumbuhan *E.coli* secara parsial, karena itu dilakukan peningkatan konsentrasi sebesar  $5,0 \times 10^3$  ppm dengan harapan ekstrak-ekstrak tersebut dapat menunjukkan aktivitas antimikrobanya. Selain itu terdapat pula suatu penelitian untuk menentukan KHM ekstrak dari *Solanum tomentosum* menggunakan metode dan mikroba uji yang hampir sama dengan penelitian ini dengan rentang konsentrasi mulai 0,1 hingga 5,0 mg/ml (Aliero & Afolayan, 2006).

Pada ekstrak etil asetat *Lecythophora* sp 30.1 konsentrasi 2,5 mg/mL (inkubasi 24 jam) pertumbuhan 5 bakteri uji terhambat. Setelah inkubasi 48 jam, 5 bakteri uji tumbuh lebih banyak. Kelima bakteri tersebut tidak mengalami pertumbuhan pada konsentrasi ekstrak etil asetat sebesar 3,0 mg/mL, sedang ekstrak butanol dan ekstrak n-heksan walau konsentrasinya ditingkatkan hingga 7,5 mg/mL kelima bakteri uji masih bisa tumbuh. Pada jamur ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan baru mampu menghambat pertumbuhan *C .albicans* pada konsentrasi 5,0 mg/mL. Pada ekstrak butanol, konsentrasi ekstrak uji ditingkatkan hingga 7,5 mg/mL tetapi tetap tidak mampu menghambat pertumbuhan jamur *C. albicans*. Disimpulkan ekstrak etil asetat endofit *Lecythophora* sp 30.1 memiliki aktivitas antibakteri sedangkan ekstrak etil asetat dan n-heksannya antijamur.

Ekstrak etil asetat *Lecythophora* sp. 30.5 pada konsentrasi  $3,5 \times 10^3$  ppm menunjukkan hasil positif terhadap kelima bakteri uji tetapi memberikan hasil negatif terhadap *Candida albicans*. Pada  $5,0 \times 10^3$  ppm terhadap *Candida albicans* sebenarnya pernah memberi hasil positif tetapi tidak reproduibel, kemungkinan karena konsentrasi bahan aktifnya yang sangat kecil dan tidak homogen. Pada konsentrasi  $5,0 \times 10^3$  ppm ekstrak n-heksana dan n-butanol memberikan hambatan terhadap *Candida albicans* tetapi tidak memberikan hambatan terhadap kelima bakteri uji.

Berdasarkan penelitian ini ekstrak etil asetat dari endofit *Lecythophora* sp. 30.5 mempunyai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) terhadap *Staphylococcus*

*aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi*, dan *Bacillus subtilis* FNCC 0059 sebesar  $3,0 \times 10^3$  ppm. Ekstrak etil asetat 30.5 tidak mempunyai daya hambat terhadap *Candida albicans* sampai konsentrasi  $5,0 \times 10^3$  ppm. Ekstrak n-heksana dan n-butanol 30.5 mempunyai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) sebesar  $5,0 \times 10^3$  ppm terhadap *Candida albicans* tetapi tidak mempunyai aktivitas antibakteri sampai konsentrasi  $5,0 \times 10^3$  ppm. Sementara itu KHM ekstrak etil asetat 30.1 terhadap 4 bakteri uji *S. aureus*, *P.aeruginosa*, *S. typhimurium* dan *B.subtilis* sebesar  $2,5 \times 10^3$  ppm sedangkan terhadap bakteri *E. coli* sebesar  $1,0 \times 10^3$  ppm dan terhadap *Candida albicans* adalah  $4,8 \times 10^3$  ppm.

Ekstrak etil asetat endofit *Lecytophora sp.* 30.1 dan 30.5 diketahui mengandung metabolit utama asam kojat yang cukup besar. Ekstrak butanol dari kultur jamur endofit ini juga mengandung asam kojat namun kadarnya relatif tidak sebesar dalam ekstrak etil asetat (Sugijanto, *et al.*, 2006). Asam kojat dilaporkan mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* untuk bakteri, serta terhadap *Candida albicans*, *Candida krusei* dan *Candida parapsilosis* untuk jamur (Aytemir, *et al.*, 2003). Hasil negatif pada pengujian ini belum tentu menunjukkan bahwa ekstrak jamur endofit *Lecytophora sp.* tidak mempunyai aktivitas antimikroba, mungkin hal ini disebabkan kondisi inkubasi yang kurang sesuai, oleh karena itu perlu dipastikan dengan cara mengubah suhu inkubasi ( $29-37,5^{\circ}\text{C}$ ), memperpanjang waktu inkubasi hingga lima hari, atau dengan mengganti media (Anonim, 1995). Apabila dengan ketiga cara tersebut masih memberikan hasil yang negatif berarti ekstrak jamur endofit tersebut tidak mempunyai aktivitas antimikroba.

Kesimpulan penelitian ini ekstrak jamur endofit *Lecytophora sp.* 30.1 dan 30.5 memiliki aktivitas antimikroba, daya antibakteri terbesar dimiliki ekstrak etil asetat sedangkan daya antijamur dimiliki ekstrak etil asetat, n. butanol dan n-heksan. Menarik untuk dicermati bahwa kedua jenis jamur *Lecytophora sp* 30.1 dan 30.5 ekstrak-ekstraknya memberi hasil uji tidak sama persis, kemungkinan senyawa yang dikandung dapat pula berbeda seperti yang dilaporkan pada metabolit dari dua strain *Lecanicillium evansii* (Hefni, 2004).

Berdasarkan data uji aktivitas tersebut di atas, disimpulkan bahwa ekstrak jamur endofit *Lecytophora sp.* 30.1 dan 30.5 mempunyai potensi dikembangkan sebagai sumber antimikroba baru yang berasal dari alam untuk itu dilanjutkan dengan uji bioautografi agar diketahui bagian atau fraksi yang berperan pada aktivitas antimikroba tersebut.

#### 5.4 Hasil Pengamatan Uji Aktivitas Antibakteri dengan Bioautografi

Pengamatan uji aktivitas ekstrak etil asetat 30.1 dan 30.5 terhadap tiga macam bakteri uji ditabelkan sebagai berikut:

Tabel 5.8 Hasil uji antibakteri ekstrak etil asetat

Mikroba	Ekstrak etil asetat 30.1					Ekstrak etil asetat 30.5					streptomisin sulfat ( $\mu\text{g}$ )
	Jumlah yang ditotolkan ( $\mu\text{g}$ )					Jumlah yang ditotolkan ( $\mu\text{g}$ )					
	100	80	60	40	20	100	80	60	40	20	
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

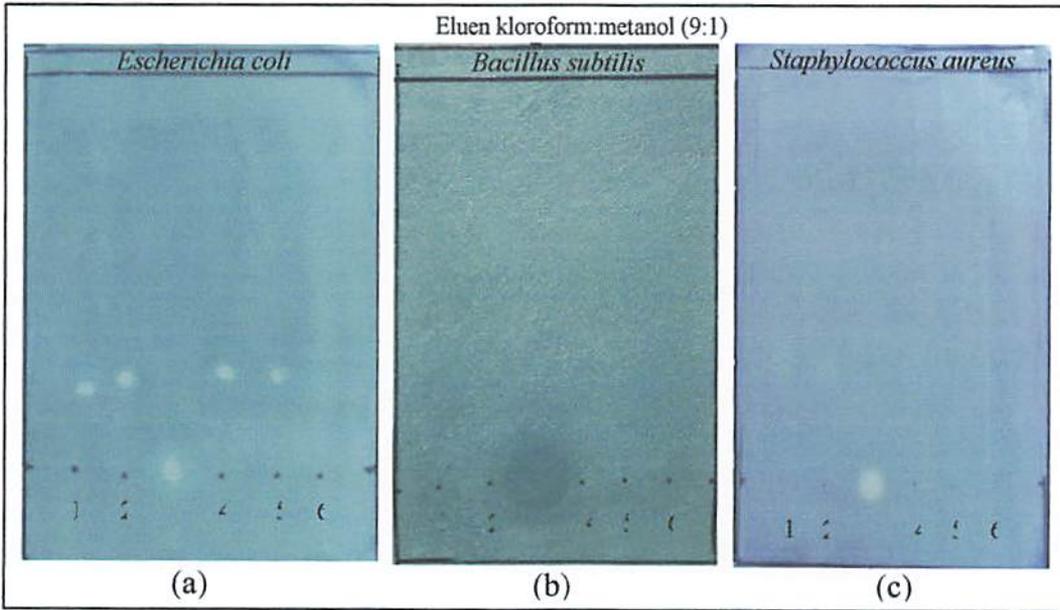
Keterangan: (+) mempunyai aktivitas antibakteri  
 (-) tidak mempunyai aktivitas antibakteri  
 Pembeding: streptomycin sulfat (100 $\mu\text{g}$ )

Pengamatan uji aktivitas untuk ekstrak heksan dan ekstrak butanol 30.1 dan 30.5 ditabelkan sebagai berikut:

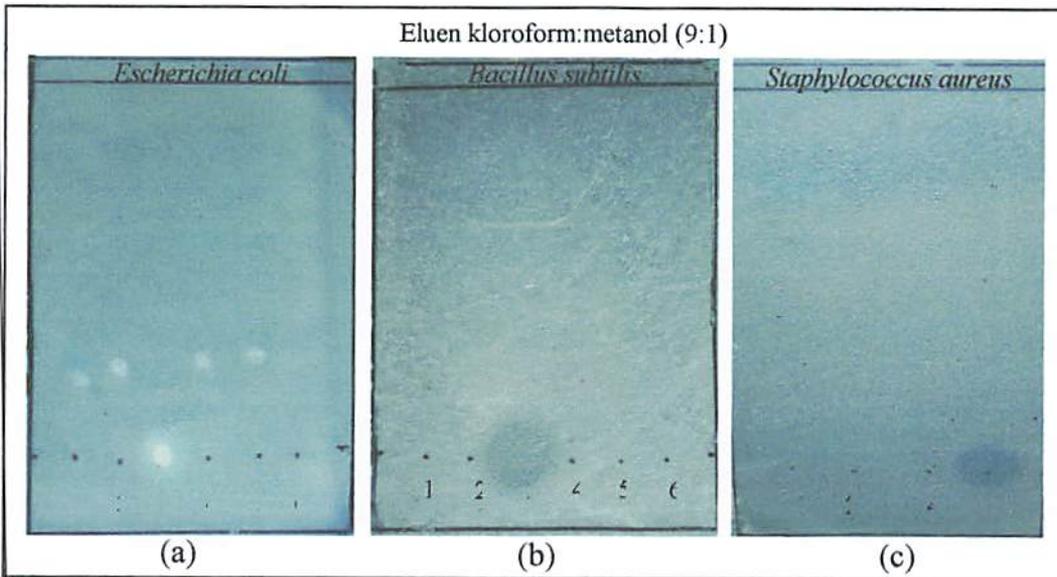
Tabel 5.9. Hasil uji ekstrak heksan dengan eluen heksan:etil asetat (7:3) dan ekstrak butanol dengan eluen kloroform:metanol:air (65:35:1)

Mikroba	Ekstrak heksan		Ekstrak butanol	
	Jumlah yang ditotolkan (100 $\mu\text{g}$ )		Jumlah yang ditotolkan (100 $\mu\text{g}$ )	
	30.1	30.5	30.1	30.5
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-

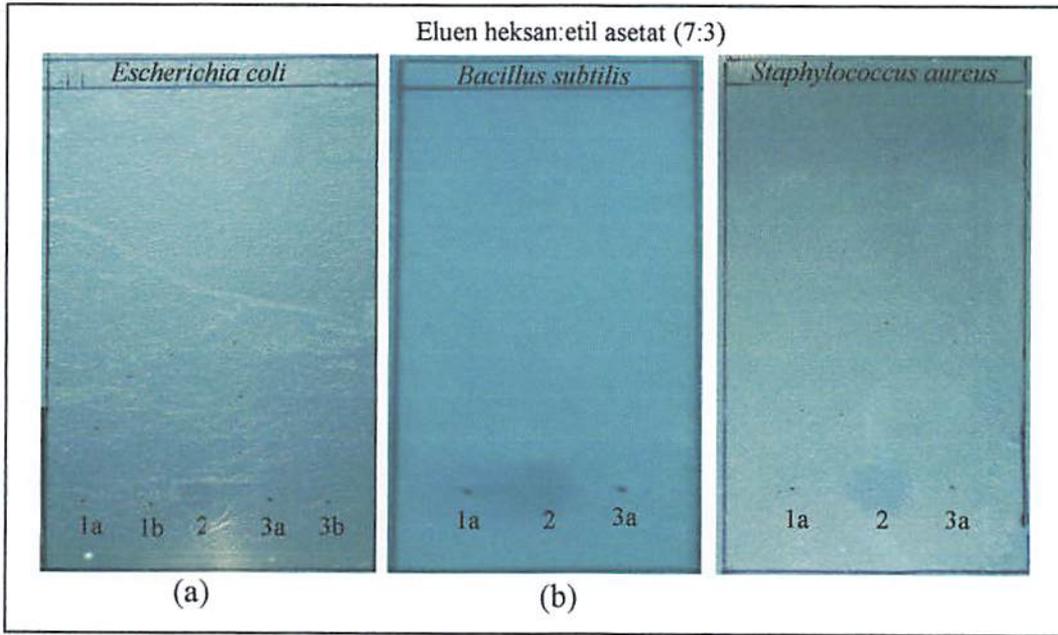
Keterangan: (+) mempunyai aktivitas antibakteri  
 (-) tidak mempunyai aktivitas antibakteri



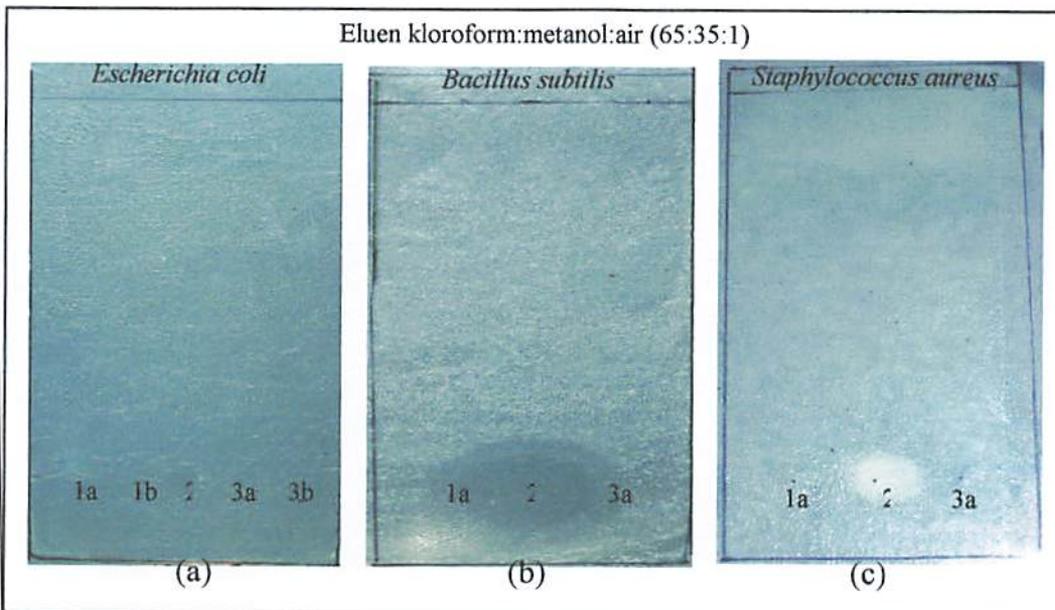
Gambar 5.7 Bioautogram ekstrak etil asetat 30.1 (a) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 (b) terhadap *Bacillus subtilis* (c) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Keterangan gambar: (1) ekstrak etil asetat 30.1 100 µg (2) ekstraksi etil asetat 30.1 80 µg (3) streptomisin sulfat 4 µg (4) ekstrak etil asetat 30.1 60 µg (5) ekstrak etil asetat 30.1 40 µg (6) ekstrak etil asetat 30.1 20 µg



Gambar 5.8 Bioautogram ekstrak etil asetat 30.5 (a) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 (b) terhadap *Bacillus subtilis* (c) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. (1) ekstrak etil asetat 30.5 100 µg (2) ekstrak etil asetat 30.5 80 µg (3) streptomisin sulfat 4 µg (4) ekstrak etil asetat 30.5 60 µg (5) ekstrak etil asetat 30.5 40 µg (6) ekstrak etil asetat 30.5 20 µg



Gambar 5.9 Bioautogram ekstrak heksan (a) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 (b) terhadap *Bacillus subtilis* (c) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Keterangan gambar: (1a) ekstrak heksan 30.1 100  $\mu\text{g}$  (1b) ekstrak heksan 30.1 80  $\mu\text{g}$  (2) streptomisin sulfat 4  $\mu\text{g}$  (3a) ekstrak heksan 30.5 100  $\mu\text{g}$  (3b) ekstrak heksan 30.5 80  $\mu\text{g}$



Gambar 5.10 Bioautogram ekstrak butanol (a) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 (b) terhadap *Bacillus subtilis* (c) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Keterangan gambar: (1a) ekstrak butanol 30.1 100  $\mu\text{g}$  (1b) ekstrak butanol 30.1 80  $\mu\text{g}$  (2) streptomisin sulfat 4  $\mu\text{g}$  (3a) ekstrak butanol 30.5 100  $\mu\text{g}$  (3b) ekstrak butanol 30.5 80  $\mu\text{g}$ .

Bioautografi merupakan metode uji yang melokalisir aktivitas biologis pada kromatogram (Berghe and Vlietinck, 1991). Metode ini penting untuk mendeteksi aktivitas antibakteri baru atau senyawa antibakteri yang belum teridentifikasi yang masih berada dengan campurannya. Keuntungan metode ini selain untuk pemisahan dan identifikasi, juga dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas biologis secara langsung dari matrik yang kompleks, terutama terkait kemampuan senyawa untuk menghambat pertumbuhan mikroba (Rahalison *et al.*, 1994).

Pada awal penelitian dilakukan optimasi metode uji, didapatkan bahwa metode yang paling mungkin dilakukan dan cukup sederhana adalah bioautografi kontak. Kendala pada bioautografi langsung, silika rontok ketika dituang dengan suspensi bakteri dan MTT (Methyl Thiazolyl Tetrazolium) sebagai penampak zona hambat. Kendala pada bioautografi imersi sulitnya menghomogenkan media agar diatas pelat KLT dan membutuhkan MTT sebagai penampak zona hambat sedangkan dengan bioautografi kontak tidak membutuhkan MTT karena zona hambat bisa langsung diamati dan tidak terjadi silika yang rontok. Kendala bioautografi kontak adalah terjebaknya gelembung udara diantara pelat KLT dengan media agar, tapi hal ini bisa diatasi menggunakan kertas yang bisa menyerap gelembung udara.

Bioautografi kontak diawali dengan KLT terhadap ekstrak uji, ekstrak yang ditotolkan 20  $\mu$ L. Lempeng KLT yang sudah ditotol dengan ekstrak uji dieluasi, kemudian diletakkan di permukaan media agar yang mengandung bakteri uji. Supaya terjadi kontak antara kromatogram dengan bakteri uji. Setelah itu disimpan di dalam lemari es selama sepuluh jam agar proses difusi senyawa dalam noda kromatogram ke dalam media sempurna. Tujuan difusi disimpan di lemari es agar terjadi difusi senyawa dari kromatogram ke media perbenihan, sementara itu pada suhu tsb bakteri ujinya belum tumbuh. Berdasarkan kromatogram KLT diketahui komponen dalam sampel yang ditotolkan dari jumlah noda (diketahui dengan menggunakan pereaksi penampak noda atau sinar UV), sedangkan data bioautogram memberikan informasi jumlah komponen yang memiliki aktivitas terhadap bakteri uji (Zheng, 2005).

Ekstrak etil-asetat dibuat 5 konsentrasi yaitu 5000 ppm, 4000 ppm, 3000 ppm, 2000 ppm dan 1000 ppm dengan jumlah penotolan sebanyak 20  $\mu$ L yang setara dengan 100  $\mu$ g, 80  $\mu$ g, 60  $\mu$ g, 40  $\mu$ g dan 20  $\mu$ g. Hal ini karena pada penotolan

sejumlah 100 µg didapatkan hasil yang positif. Hasil uji didapatkan ekstrak etil-asetat dengan penotolan sejumlah 100 - 40 µg menunjukkan aktivitas positif terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 sedangkan pada penotolan 20 µg tidak menunjukkan aktivitas. Ekstrak etil-asetat tidak menunjukkan aktivitas terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis*. Hasil KLT ekstrak etil-asetat yang memiliki aktivitas antibakteri dengan berbagai penampak noda menunjukkan Rf 0,33 (30.1) dan 0,35 (30.5) tampaknya sangat berdekatan dan bisa jadi berasal dari senyawa yang sama karena kondisi KLT yang dipengaruhi berbagai faktor seperti suhu, kejenuhan dsb maka Rfnya tidak persis sama. Senyawa aktif setelah direkristalisasi dan dielusidasi ternyata adalah asam kojat.

Jumlah yang ditotolkan ekstrak heksan dan butanol hanya 100 µg karena kedua ekstrak menunjukkan hasil negatif terhadap ketiga bakteri uji, walaupun ekstrak heksan pernah satu kali positif terhadap *Bacillus subtilis* tapi setelah diuji lagi hasilnya negatif. Hal ini mungkin disebabkan karena sampel yang kurang homogen atau pelarut yang menguap sehingga banyak senyawa yang semula larut mengendap dan saat dilarutkan kembali sulit atau kadar senyawa aktif sangat kecil.

Metode bioautografi ini hanya untuk mendeteksi antibakteri yang mempunyai potensi tinggi (Berghe dan Vlietinck, 1991). Hal ini memberikan harapan bahwa senyawa aktif dari ekstrak etil asetat berpotensi sebagai antibakteri. Bioautografi kontak merupakan metode yang berguna untuk mendeteksi senyawa antibakteri yang sifatnya bakteristatik yaitu senyawa yang memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri tapi bakteri akan kembali tumbuh setelah senyawa tersebut dihilangkan atau tidak kontak lagi (Jawetz *at al.*, 1996).

Ekstrak heksan dan butanol yang negatif terhadap ketiga bakteri uji ataupun ekstrak etil asetat yang negatif terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis* perlu diteliti lebih lanjut aktivitas antibakterinya dengan metode yang lain dan bakteri uji yang lain. Kemungkinan ekstrak tersebut sebenarnya mempunyai potensi antibakteri tapi kurang sensitif atau senyawa aktif yang ada kadarnya terlalu kecil sehingga tidak terdeteksi dengan metode bioautografi kontak.

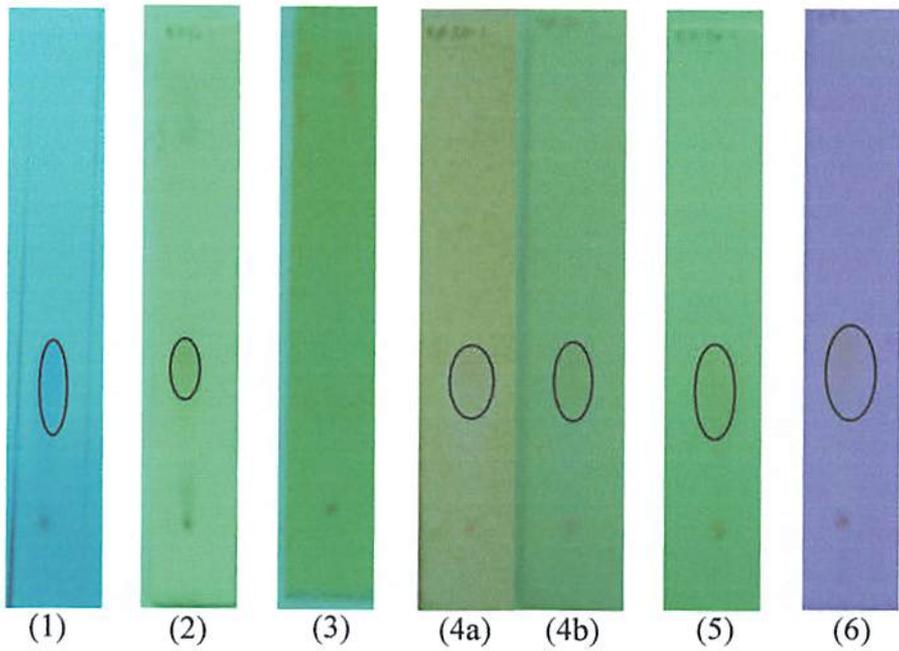
Uji antifungi secara bioautografi hasilnya tidak konsisten sehingga untuk selanjutnya difokuskan pada isolasi senyawa aktif melalui pemurnian dan identifikasi dengan kromatografi.

### 5. 5 Hasil Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak dengan Beragam Penampak Noda

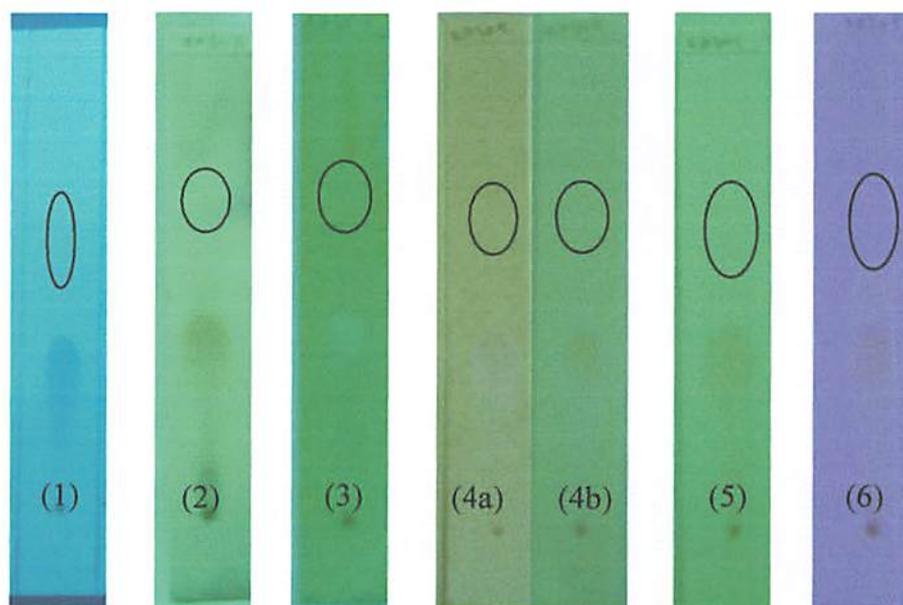
Hasil kromatografi lapis tipis metabolit jamur yang memiliki aktivitas antibakteri dengan berbagai penampak noda ditabelkan sebagai berikut:

Tabel 5.10 Data Rf dan warna noda metabolit ekstrak etil asetat 30.1 dan 30.5

Ekstrak etil asetat	Rf	Penampak noda				
		Sinar UV 254 nm	Anisaldehyd	Dragendorff	Ceri - asam sulfat	Citrat-borat
30.1	0,33	Ungu	Kuning kecoklatan	-		Kuning
	0,32	-	-	-	Kuning	-
30.5	0,35				Kuning	
	0,36	Ungu		putih		Kuning
	0,37		Kuning kecoklatan			



Gambar 5.11 Kromatogram ekstrak etil asetat 30.1 dengan penampak noda: (1) sinar UV 254 nm (2) anisaldehyd (3) Dragendorff (4a) ceri-asam sulfat sesaat setelah penyemprotan (4b) ceri-asam sulfat setelah beberapa menit (5) citrat borat (6) DPPH dengan Rf 0,34 warna kuning.



Gambar 5.12 Kromatogram ekstrak etil asetat 30.5 dengan penampak noda: (1) sinar UV 254 nm (2) anisaldehyd (3) Dragendorff (4a) ceri-asam sulfat sesaat setelah penyemprotan (4b) ceri-asam sulfat setelah beberapa menit (5) citrat borat (6) DPPH dengan Rf 0,34 warna kuning

Tabel 5.11 Data Rf dan warna noda serta aktivitas antibakteri metabolit ekstrak etil asetat 30.1 dan 30.5

Ekstrak	Rf	Penampak noda					Bakteri
		UV 254 nm	Anisaldehyd	Dragendorff	Ceri-as sulfat	Citrat Borat	
30.1	0,32	-	-	-	kuning	-	
	0,33	Ungu	Kuning kecoklatan	-	-	Kuning	aktif
30.5	0,35	-	-	-	Kuning	-	aktif
	0,36	Ungu	-	Putih	-	kuning	
	0,37	-	Kuning kecoklatan	-	-	-	

Setelah ekstrak etil asetat menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, dilakukan percobaan ulang dengan melakukan KLT simultan untuk uji bioautografi dan pemeriksaan golongan senyawa dari zat yang aktif sehingga bisa diduga senyawa yang aktif termasuk golongan senyawa apa. Guna mengetahui golongan senyawa dilakukan penyemprotan dengan berbagai

penampak noda yaitu Dragendorff, anisaldehyd, ceri-asam sulfat dan citrat borat. Selain itu juga dilihat dibawah sinar UV 254 nm dan 365 nm.

Hasil deteksi dengan penampak noda Dragendorff ini untuk 30.1 tidak muncul noda sedangkan untuk 30.5 muncul noda berwarna putih dengan Rf 0,36. Hasil deteksi dengan penampak noda anisaldehyd muncul satu noda dengan Rf 0,33 untuk 30.1 warna kuning kecoklatan dan 0,37 untuk 30.5 warnanya juga kuning kecoklatan. Senyawa yang menghasilkan warna ungu dengan penampak noda anisaldehyd menunjukkan senyawa tersebut merupakan golongan steroid (Zaini dan Indrayanto, 1978), sedangkan warna merah hingga ungu menunjukkan senyawa tersebut merupakan golongan seskuiterpen (Pulici *et al.*, 1995). Hasil dengan anisaldehyd senyawa berwarna kuning kecoklatan sehingga tidak termasuk golongan steroid dan sekuisterpen. Hasil deteksi dengan penampak noda ceri-asamsulfat muncul satu noda dengan Rf 0,32 warna kuning untuk 30.1 dan 0,35 warna kuning untuk 30.5. Penampak noda ini merupakan penampak noda yang digunakan untuk mendeteksi golongan flavon dan juga steroid (Chen *et al.*, 1999; Brooks *et al.*, 1993). Hasil deteksi dengan penampak noda citrat borat muncul satu noda dengan Rf 0,33 warna kuning untuk 30.1 dan 0,36 warna kuning untuk 30.5. penampak noda ini untuk mendeteksi golongan flavonoid yang jika positif menunjukkan warna kuning.

Hasil pengamatan dengan sinar UV 254 nm dan 365 nm muncul satu noda dengan Rf 0,33 warna ungu untuk 30.1 dan 0,36 warnanya juga ungu untuk 30.5. Hal ini menunjukkan noda tersebut memadamkan fluoresensi dan merupakan senyawa UV aktif yaitu senyawa yang menyerap sinar pada panjang gelombang tersebut dan memadamkan indikator fluoresensi yang ada pada lempeng KLT sehingga tampak sebagai noda berwarna ungu pada latar belakang yang berfluoresensi kuning-hijau (Stahl, 1985; Gibbons and Gray, 1998).

Selain itu, juga disemprot dengan DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) yang merupakan radikal bebas. Deteksi awal dengan DPPH ditujukan untuk melihat adanya efek antioksidan dari sampel. Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna dari ungu menjadi kuning hingga putih (Endang *et al.*, 2005). Penyemprotan dengan DPPH didasarkan pada hasil dengan penampak noda Dragendorff yaitu berwarna putih sehingga diduga senyawa tersebut bisa mereduksi

iodium yang ada dalam Dragendorff. Hasil penyemprotan dengan DPPH baik 30.1 dan 30.5 noda berwarna kuning yang dikelilingi warna putih (lihat gambar 5.5 dan 5.6) sehingga disimpulkan ekstrak etil asetat mempunyai aktivitas sebagai antioksidan seperti yang dilaporkan dalam penelitian terdahulu.

Senyawa aktif terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dalam ekstrak etil asetat mempunyai Rf 0,33 untuk 30.1 dan 0,35 untuk 30.5 hal ini sama dengan noda yang ada baik dengan pereaksi ceri-asam sulfat (Rf 0,32 untuk 30.1 dan 0,35 untuk 30.5) maupun sitrat borat (Rf 0,33 untuk 30.1 dan 0,36 untuk 30.5). Diduga senyawa tersebut merupakan golongan flavonoid atau mempunyai struktur mirip flavonoid karena menunjukkan hasil positif dengan ceri-asam sulfat dan citrat borat.

Berdasarkan pengamatan KLT metabolit ekstrak etil-asetat cukup besar konsentrasinya dan macamnya relatif cukup beragam maka dilakukan fraksinasi menggunakan khromatografi vakum dengan elusi gradien n - heksan – etil asetat, diklorometan – metanol dan metanol air. Hasil khromatografi vakum dilakukan KLT menggunakan eluen kloroform : metanol : air (75 : 25 : 1) (v/v), fraksi yang sama digabung, melalui proses ini didapat satu isolat utama yang berhasil dimurnikan dan direkristalisasi.

## **5. 6 Identifikasi metabolit**

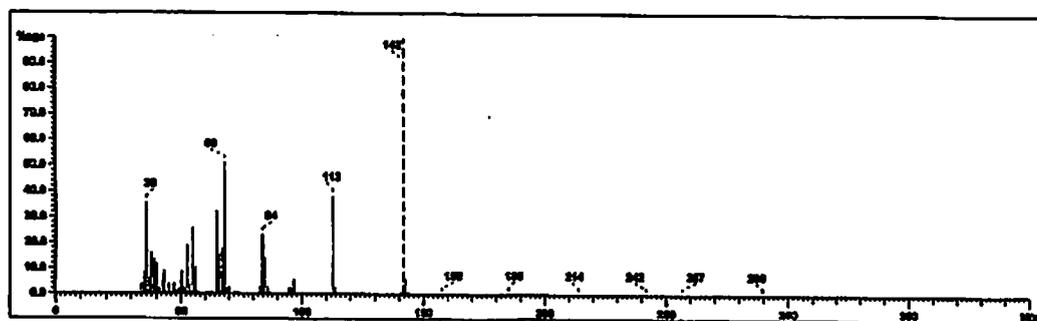
### **5. 6.1 Identifikasi metabolit dari ekstrak etil-asetat.**

#### **5.6.1.1 Isolat 1**

Metabolit jamur endofit *Lecythophora sp.* dari ekstrak etil-asetat dilakukan rekristalisasi dengan etil-asetat dan aseton didapatkan kristal jarum yang berwarna putih kekuningan dengan titik lebur 151 – 153 °C pada penentuan dengan DTA. Uji kemurnian kristal isolat metabolit tsb dilakukan KLT dua dimensi dengan eluen etil - asetat : metanol : air (100 : 13,5 : 1,5) (v/v) dengan penampak noda sinar ultra violet didapatkan noda tunggal ditengah bidang yang berpendar ungu pada 254 nm dengan Rf = 0,53. Didapatkan kristal yang berbentuk jarum dan dlakukan KLT dengan eluen khloroform : metanol: air (75: 25 :1) (v/v) didapatkan satu noda dengan Rf 0,82. Pada analisis HPLC kristal tersebut mempunyai khromatogram seperti ditampilkan pada gambar 12, dengan waktu retensi 2,4 menit. Data spektra massa dengan *Electron impact* menunjukkan BM (Berat molekul ) senyawa 142, dan berdasarkan

kesesuaian data  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, COSY dan HMBC (dilakukan di Heinrich Heine Universitas Düsseldorf) diketahui sebagai asam kojat (Sugijanto, *et al.*, 2006).

*Lecythophora sp.* 30.1 maupun 30.5 cairan fermentasinya mengandung asam kojat. Asam kojat digunakan sebagai bahan tambahan dalam makanan dan pengawet. Senyawa ini juga digunakan dalam industri kosmetik karena sifatnya mengabsorpsi radikal bebas dan menghambat pembentukan melatonin (Zborowski, 2003). Asam kojat dilaporkan menghambat aktivitas catecholase-tyrosinase pada biosintesa melanin, sehingga digunakan sebagai pemutih disamping aktivitas farmakologisnya sebagai anti oksidan (Brtko *et al.*, 2001). Asam kojat dilaporkan memiliki efek bakteriostatik, zat pengatur pertumbuhan tanaman dan sebagai bahan baku antara dalam industri kimia (Anonim, 2001). Derivat asam kojat dilaporkan juga memiliki daya antibakteri (Erol, 1995).



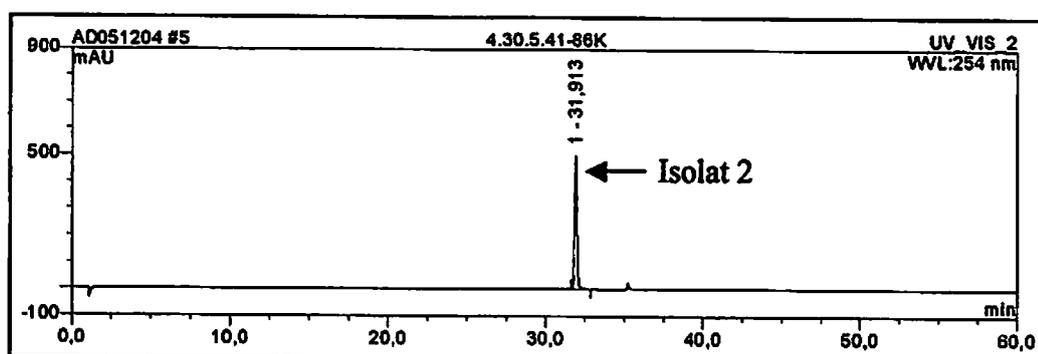
Gambar 5.13 Spektra massa (EI-MS) asam kojat metabolit *Lecythophora sp.*

Asam kojat mudah larut dalam air, etanol, aseton dan etil-asetat sehingga mudah diderivatisasi membentuk senyawa baru yang berpotensi memiliki beragam khasiat biologis. Hal ini didukung oleh sifat fisikokimiawinya seperti hidrofobitasnya, keasaman, kemampuan membentuk kompleks yang berperan penting dalam aktivitas biologis asam kojat dan turunannya. Turunan asam kojat memiliki kesamaan dengan flavonoid, utamanya sifat antifungi, antineoplastik dan kemampuan melakukan khelat (Novotny *et al.*, 1999). Aktivitas anti fungi ditunjukkan juga oleh derivat halogenya dan garam tembaga (Brtko *et al.*, 2001). Asam kojat diketahui memiliki efek anti inflamasi dan derivat halogenya mampu menghambat sel leukemia L1210 dan sel tumor pituitary tikus (Brtko *et al.*, 2001). Asam kojat dapat diderivatisasi untuk sediaan anti inflamasi, bronkhodilator, anestesi

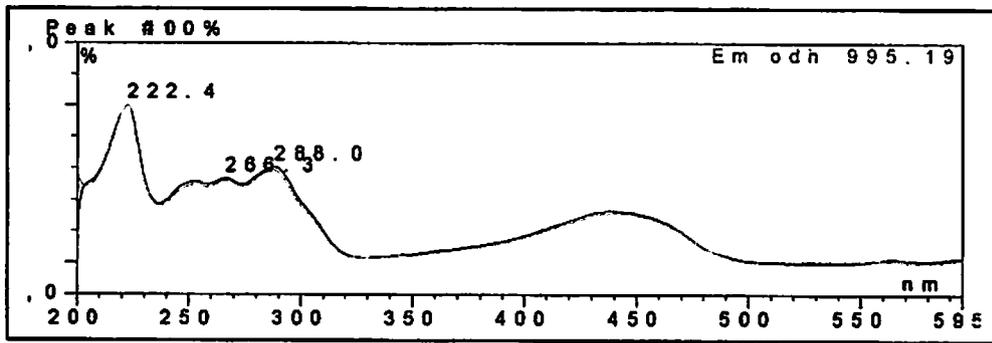
lokal, fungisida, insektisida atau pestisida dan digunakan dalam rekayasa senyawa baru yang bersifat aktif secara biologis (Brtko *et al*, 2001).

### 5.6.1.2 Isolat 2

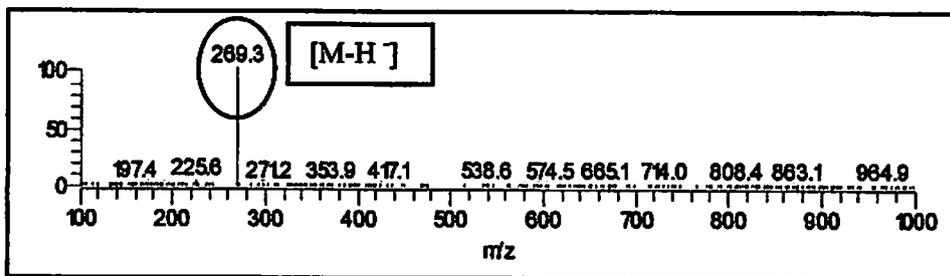
Isolat 2 dari ekstrak heksan yang berasal dari biomassa sel dan ekstrak etil asetat dari kaldu fermentasi setelah fraksinasi dan pemurnian melalui kromatografi kolom dan beberapa tahap KLT preparative. Kesesuaian data NMR dan MS isolat 2 dengan literature menunjukkan isolat 2 adalah emodin (Hefni, 2004). Emodin digunakan sebagai pelancar buang air, antioksidan, anti inflamasi, antitumor, bakterisida, antimutagenik, immunospresan dan penghambat aktivitas enzim (Hefni, 2004). Emodine menghambat system asam linoleat yaitu menghambat peroksida lemak. Glikosida anthrakuinon sejak lama digunakan sebagai katartiks dan laksan. Emodine berlaku sebagai *intermediate* proses pembentukan metabolite jamur (Sanakawa, 1980; Seigler, 1998). Emodine dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba pada *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* tetapi tidak aktif terhadap *Staphylocooccus aureus*, *Sacharomyces cerevisiae* dan *Cladosporium herbarum* pada kadar 100  $\mu\text{g}$  (Hefni, 2004 ).



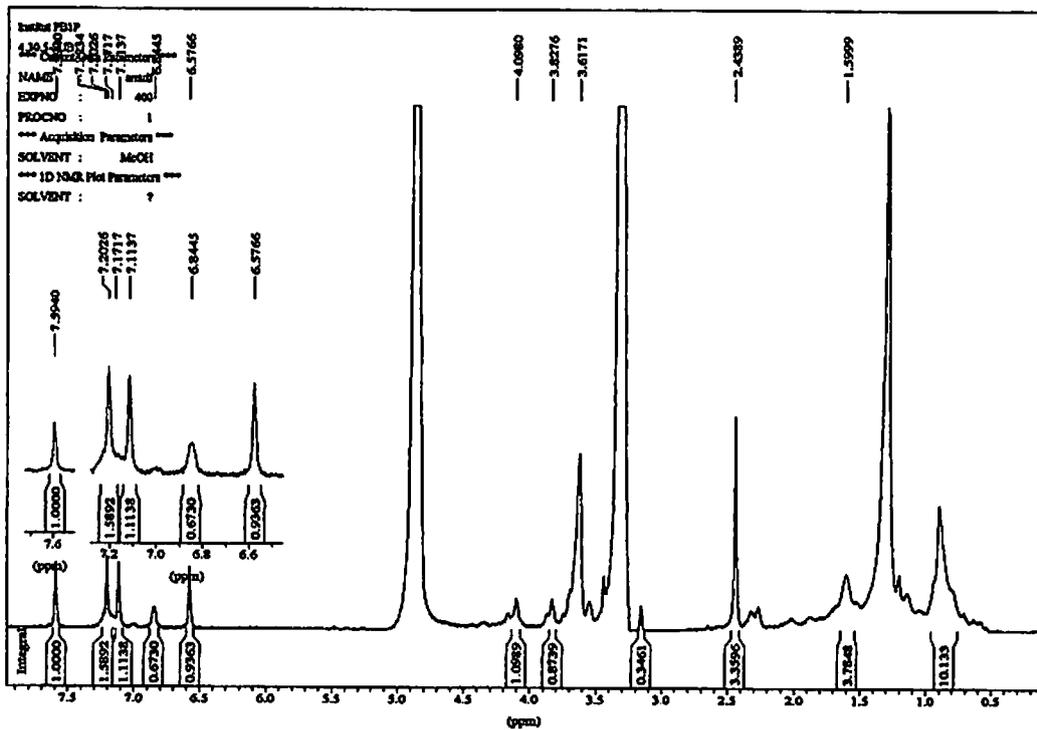
Gambar 5.14 Kromatgram HPLC isolat 2 (waktu retensi 31,913 menit) pada  $\lambda$  254 nm, kolom RP 18 (Eurospher-100 C-18) fase mobil isokratik metanol: dapar fosfat pH 2, (10:9) selama lima menit, dilanjutkan elusi gradien tiap 5 menit hingga metanol 100 % dalam 30 menit diteruskan hingga 40 menit dengan metanol 100 %. Volume yang disuntikkan 20  $\mu\text{l}$  dengan *Diode Array* detektor sinar ultra violet  $\lambda$  235, 254, 280 dan 340 nm.



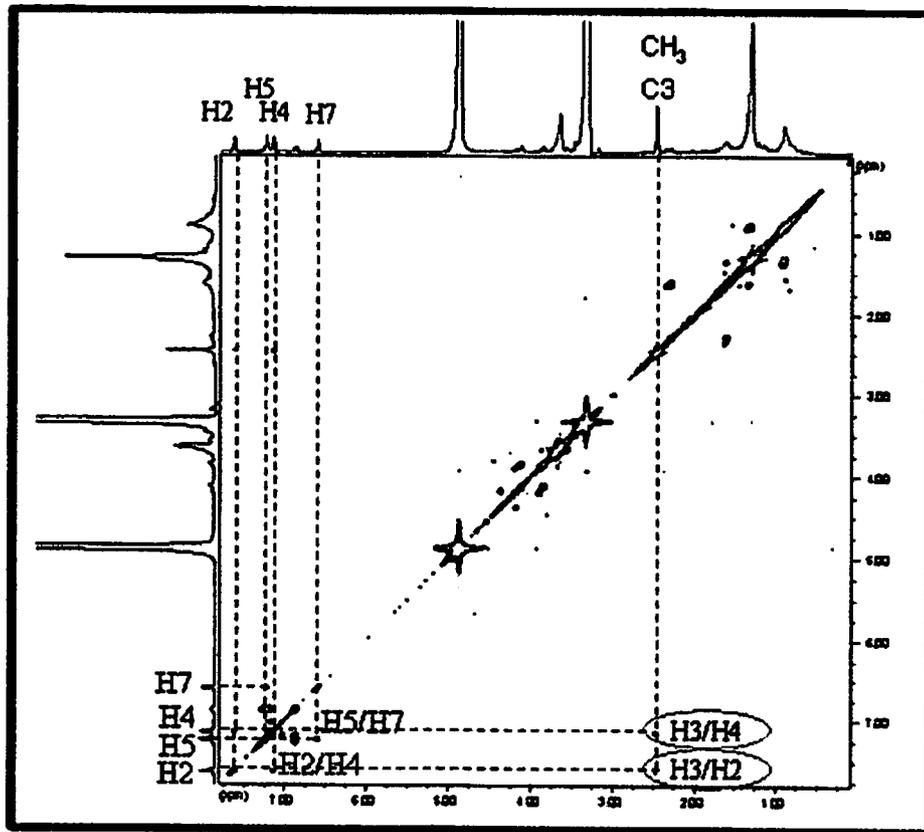
Gambar 5.15. Spektrum UV isolat 2



Gambar 5.16. Spektrum massa negatif ESI-MS isolat 2



Gambar 5.17 Spektrum <sup>1</sup>H NMR isolat 2 dalam MeOD

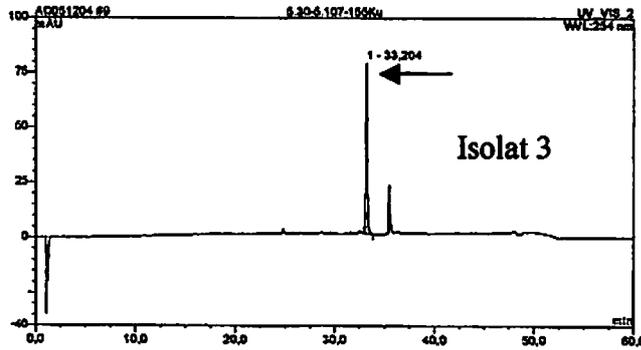


Gambar 5. 18 Spektrum H-H COSY NMR isolat 2 (MeOD)

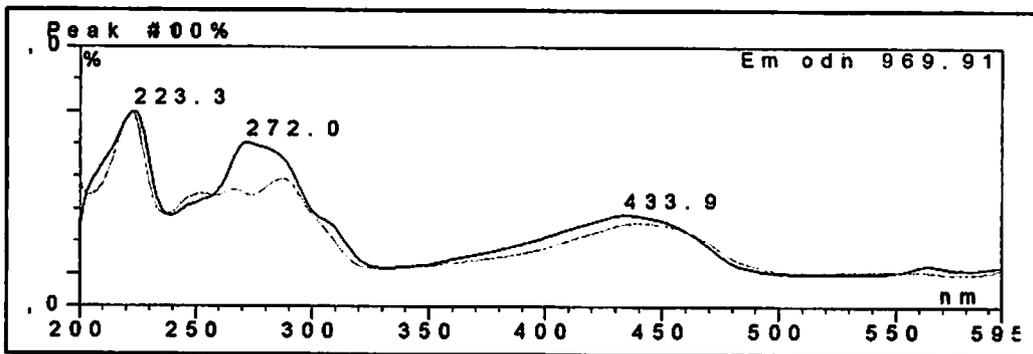
### 5.6.1.3 Isolat 3

Isolat 3, serbuk yang berwarna kuning jingga. diperoleh dari ekstrak heksan (2,3 g) yang berasal dari biomassa sel dan ekstrak etil asetat dari kaldu fermentasi setelah fraksinasi dan pemurnian melalui khromatografi kolom dan beberapa tahap KLT preparative didapat 6,6 mg.

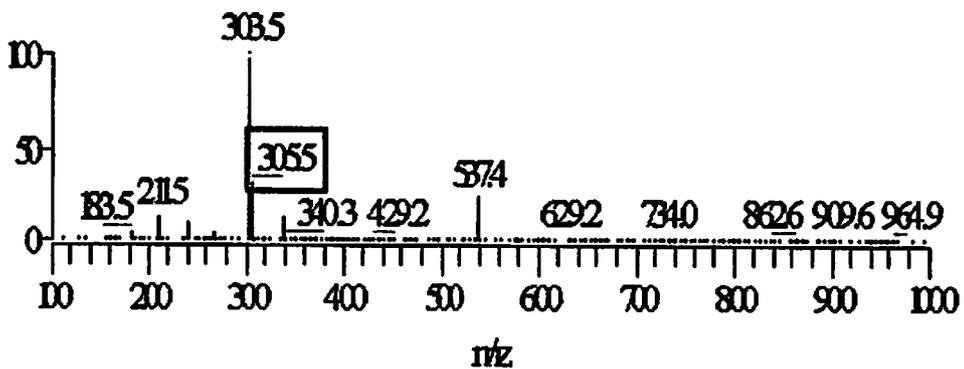
Kesesuaian data NMR dan MS isolat 3 dengan literature menunjukkan bahwa isolat 3 adalah 7-kloremodin (Cohen and Towers, 1995).



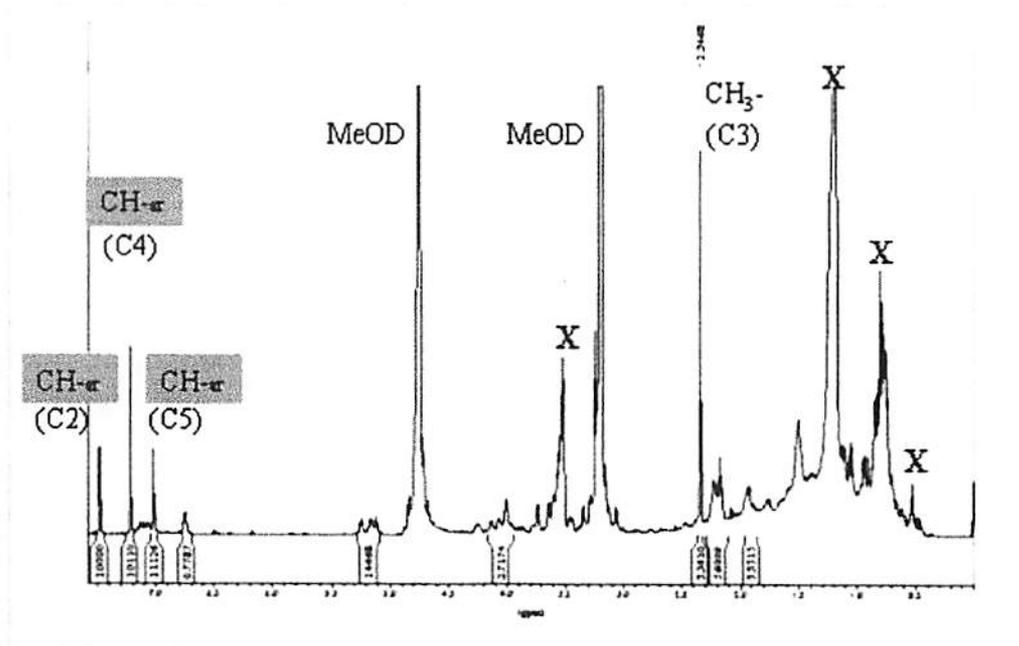
Gambar 5.19 Kromatogram HPLC isolat 3 (waktu retensi 33,204 menit) pada  $\lambda$  254 nm, kolom RP 18 (Eurospher-100 C-18), fase mobil isokratik metanol: dapar fosfat pH 2, (10:9) lima menit, dilanjutkan elusi gradien tiap 5 menit hingga metanol 100 % dalam 30 menit diteruskan hingga 40 menit dengan metanol 100 %. Volume yang disuntikkan 20  $\mu$ l dengan Diode Array detektor sinar ultra violet  $\lambda$  235, 254, 280 dan 340 nm



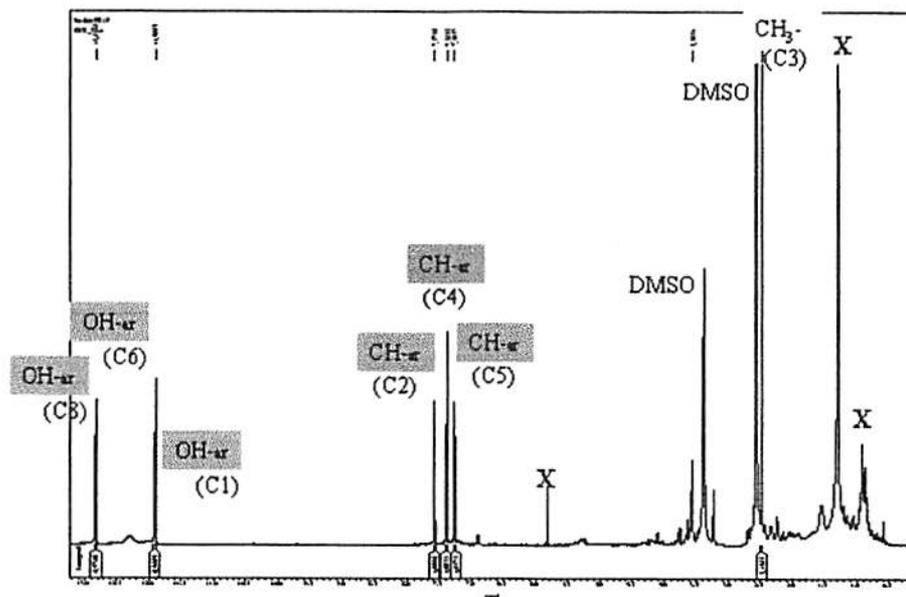
Gambar 5.20 Spektrum UV isolat 3



Gambar 5.21 Spektrum massa negatif ESI -MS isolat 3



Gambar 5.22 Spektrum  $^1\text{H}$  NMR isolat 3 (MeOD)

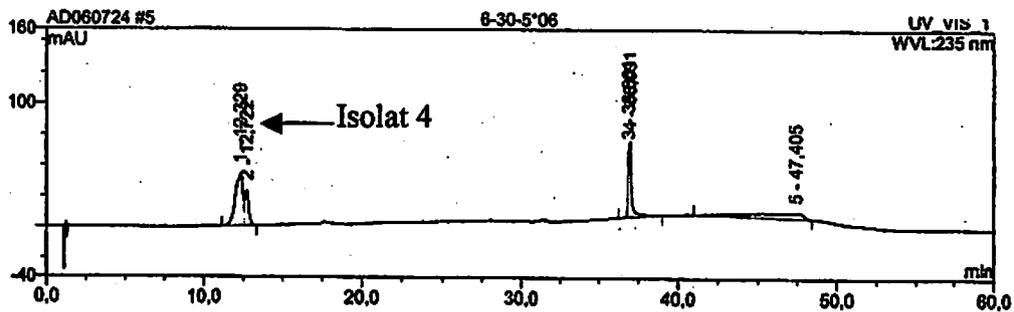


Gambar 5.23 Spektrum  $^1\text{H}$  NMR isolat 3 (DMSO)

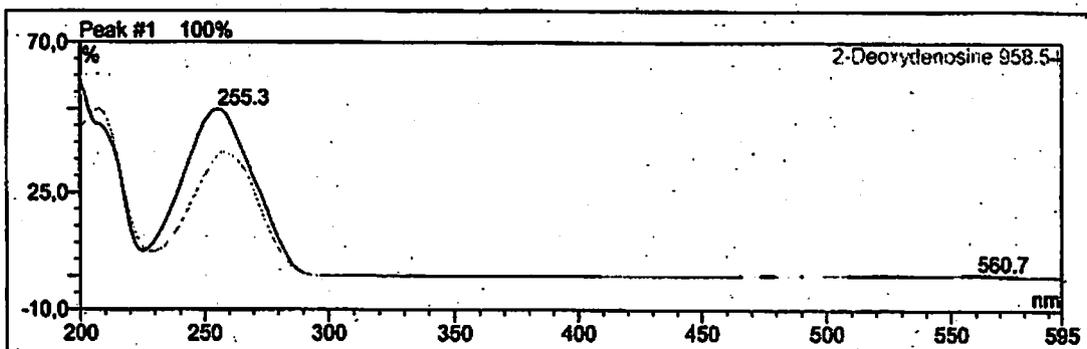
Isolat 3 ternyata adalah 7-kloremodin dilaporkan memiliki aktivitas antivirus (Cohen et al., 1996), antitumor, antiinflamasi dan bakterisida (Rosso et al., 2003).

#### 5.6.1.4 Isolat 4

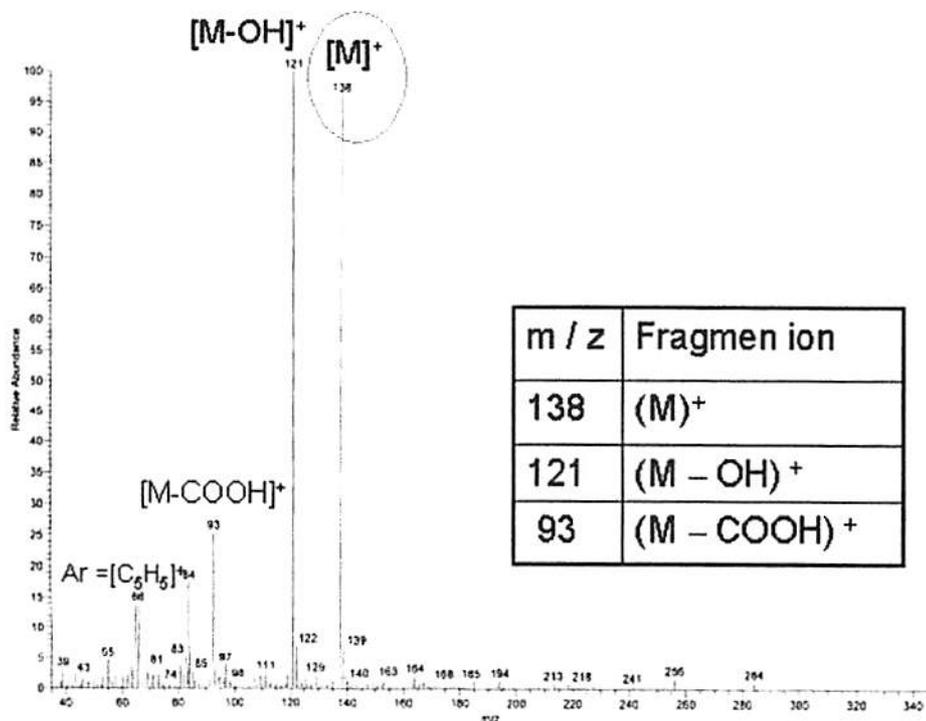
Isolat 4 merupakan kristal berwarna putih, dari 3,8 g ekstrak etil asetat kaldu fermentasi diperoleh 6,2 mg. Pada KLT dengan *Silicagel* F<sub>254</sub> menggunakan eluen kloroform : metanol (9:1) (v/v) didapatkan noda positif UV pada  $\lambda$  254 dan 365 nm dengan Rf 0,57.



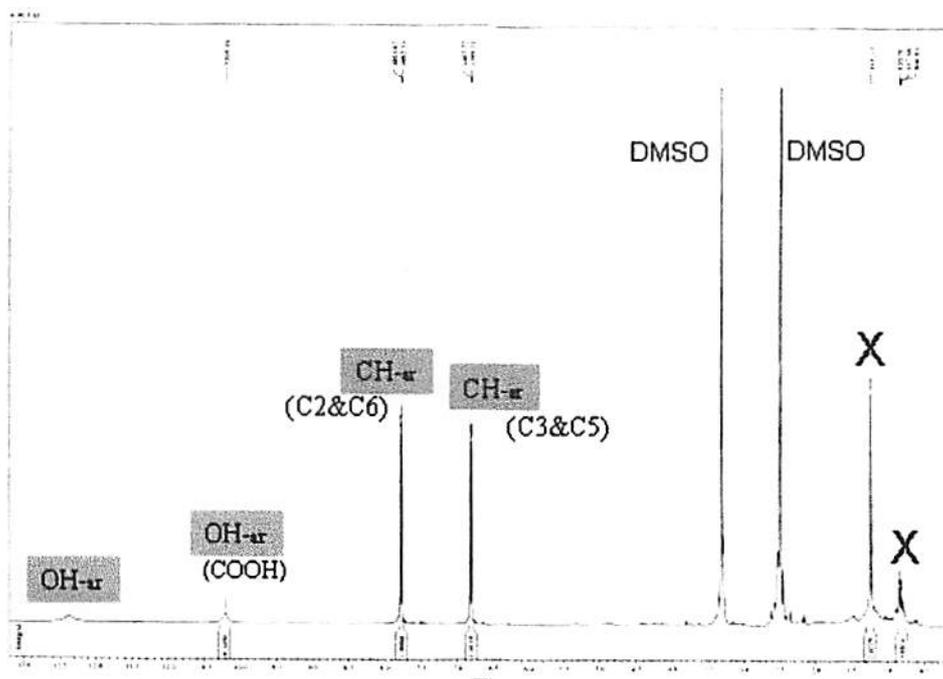
Gambar 5.24 Kromatogram HPLC isolat 4 (waktu retensi 12,7 menit) pada  $\lambda$  235 nm kolom RP 18 (Europher-100 C-18), fase mobil isokratik metanol: dapar fosfat pH 2, (10:9) selama lima menit, dilanjutkan elusi gradien tiap 5 menit hingga metanol 100 % dalam 30 menit diteruskan hingga 40 menit dengan metanol 100 %. Volume yang disuntikkan 20  $\mu$ l dengan *Diode Array* detektor sinar ultra violet  $\lambda$  235, 254, 280 dan 340 nm.



Gambar 5.25 Spektrum UV isolat 4



Gambar 5.26 Spektrum massa (EI-MS isolat 4

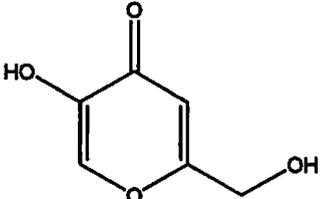
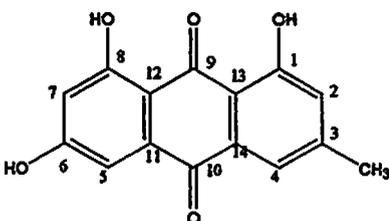
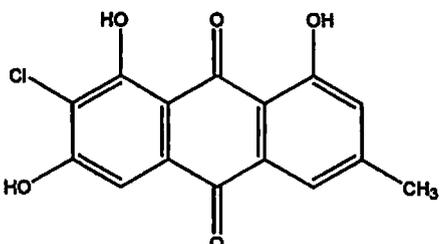
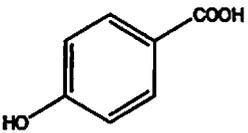


Gambar 5.27 Spektrum <sup>1</sup>H NMR isolat 4 (DMSO)



Isolat 4 diperoleh dari ekstrak etil asetat yang berasal dari kaldu fermentasi, data NMR dan MS memiliki kesesuaian dengan asam p-hidroksi benzoat (SDBS for Organic Compounds, <http://riodb01.ibase.aist.ac.jp/sdb/compound/>). Asam p-hidroksi benzoat dilaporkan menghambat bakteri *E.coli* dan *Corynebacterium flaccumfaciens* (Venkatasubbaiah and Chilton, 1991).

Tabel 5.12 Metabolit *Lecythophora sp.* dan bioaktivitasnya berdasarkan pustaka.

Nama metabolit	Bioaktivitas
<p>Asam kojat</p> 	<p>Antibakteri (Erol, 1995), antibakteri dan antifungi (Aytemir <i>et al</i>, 2003).</p>
<p>Emodin</p> 	<p>Bakterisida, penghambat aktivitas enzim peroksidase (Hefni, 2004), anti virus (Cohen <i>et al</i>, 1996 a)</p>
<p>7-Kloroemodin</p> 	<p>Antivirus (Cohen <i>et al</i>, 1996 a), bakterisida (Rosso <i>et al</i>, 2003).</p>
<p>Asam p-hidroksibenzoat</p> 	<p>Antibakteri dan antifungi (Venkatasubbaiah and Chilton, 1991)</p>

Menilik aktivitas biologis ke-empat senyawa yang telah dikenal semuanya sebagai antibakteri dan antifungi, beberapa juga sebagai antivirus, maka disimpulkan metabolit yang dihasilkan berguna bagi jamur endofit dan juga tanaman inang. Hal

ini memperkuat fakta, bahwa diproduksinya 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 inangnya (Strobel and Daisy, 2003).

Interaksi antara endofit dan lingkungannya dalam memproduksi metabolit sekunder berpotensi sebagai sumber alternatif bahan alami berkhasiat karena begitu besar keragaman ceruk biologis yang unik, dalam hal ini *Alyxia reinwardtii* 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 contoh 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 juga 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).

Apabila jamur endofit ini mampu memproduksi antibakteri atau antifungi 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 produksi senyawa berkhasiat ini.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN.

#### KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, disimpulkan:

1. Uji antibakteri dengan bioautografi kontak dengan bakteri uji *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan dari ketiga ekstrak *Lecythophora sp* 30.1 dan 30.5 ekstrak etil-asetat mempunyai daya antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 pada kadar 40 µg/perspot. Ekstrak butanol maupun ekstrak heksan tidak menunjukkan daya antibakteri terhadap ketiga bakteri uji pada kadar 100 µg/perspot.
2. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etil asetat 30.1 secara dilusi agar, terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah 1,0 mg/mL sedangkan KHM terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis* adalah 2,5 mg/mL.
3. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etil asetat 30.5 secara dilusi agar, terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis* adalah 3,0 mg/mL.
4. Uji antifungi dengan *Candida albicans* menunjukkan dari ketiga ekstrak *Lecythophora sp* 30.1 ekstrak etil-asetat dan ekstrak heksan mempunyai KHM pada kadar 4,8 mg/mL, sedang pada 30.5 ekstrak butanol dan ekstrak heksan mempunyai KHM pada konsentrasi 5,0 mg/mL.
5. Ekstrak jamur endofit *Lecythophora sp*. 30.1 dan 30.5 mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai sumber antimikroba yang berasal dari alam.
6. Metabolit *Lecythophora sp* 30.1 dan 30.5 dalam *malt extract* pH 6,5 yang memiliki daya antibakteri setelah dielusidasi struktur yaitu asam kojat, emodine, 7-kloremodin dan asam p-hidroksi benzoat.
7. Metabolit *Lecythophora sp* 30.1 dan 30.5 yang memiliki aktivitas sebagai antifungi yaitu asam kojat dan asam p-hidroksi benzoat.

## **SARAN**

1. Perlu dilakukan uji aktivitas antimikroba lebih lanjut terhadap senyawa metabolit
1. yang lain pada ekstrak heksan, etil-asetat dan butanol.
2. Perlu diteliti lebih lanjut aktivitas metabolit sekunder yang lain.
3. Adanya metabolit asam kojat dalam fermentasi *Lecythophora sp* 30.1 dan 30.5 dapat digunakan sebagai alternatif sumber bahan baku asam kojat dalam industri farmasi khususnya kosmetika.

## Daftar Pustaka.

- Achmad SA, Hakim EH, Makmur L, Yuliawati LD, Syah YM, 2003. *Ilmu Kimia dari Keanekaragaman Hayati Indonesia*, Simposium Nas. Kimia Bahan Alam XIII, Bandung.
- Anonim, 1995. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal. 855, 896-897.
- Anonim, 1998. Buku Panduan Seminar Nasional XIV *Tumbuhan Obat Indonesia* Bogor: Fakultas Pertanian Jurusan Budi Daya Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Anonim, 2000. *Kojic Acid* , <http://www.tokyokasei.co.jp/finechem/koji.html> tgl 12-04 - 05.
- Anonim, 2001. *Kojic acid* ( IARC Summary & Evaluation, volume 79, 2001 ). IPCS INCHEM : <http://www.inchem.org/documents/iarc/monoeval/eval.html> tgl 12 - 4 - 05.
- Aliero, A.A., Afolayan, A.J., 2006. Antimicrobial Activity of *Solanum tomentosum*. *African Journal of Biotechnology*. No. 4, Vol. 5, p. 369-372
- Anonim, 2003. *Menuai Berkah dari Hutan*. <http://www.kompas.co.id/kompas-cetak/0310/25/inspirasi/646114.htm> .
- Anonim. 2008. *Drop Plate Method for Counting Biofilm Cells*, Center for Biofilm Engineering, Montana State University, <http://www.biofilm.montana.edu>.
- Anonim. 2008. *Doctor fungus : Valid Species, Synonyms, Teleomorph – Anamorph Relationship for Lecythophora spp.*, <http://www.doctorfungus.org/imageban/synonyms/lecythophora.htm>.
- Anonim. 2008. *Fungus*. Merriam-Webster Online Dictionary. [http:// www.merriam-webster.com](http://www.merriam-webster.com). tanggal akses 9 September 2008.
- Anonim. 2008. World Intellectual Property Organization. *Antimicrobial Formulations*, <http://www.wipo.int/portal/index.html.en>
- Alexopoulos, C.J., 1962. *Introductory Mycology*. 2<sup>nd</sup> Ed., New York: John Wiley and sons, p. 3-6.

- Aytemir M.D, Erol DD, 2003. Synthesis and evaluation of anti microbial activity of new 3 Hidroxy-6-methyl-4-oxo-4 H-pyran-2-carboxamide derivatives. *Turk J. Chem* 27, 757-764.
- Bacon, C., 1991. *Isolation, Culture and Maintenance of Endophyte fungi and Grasses*. In Hand Book of Mycology (D.K. Aurora, D. Rai, K.G. Mukeri, dan G.R. Knudsen, Vol I), Athens. Georgia.
- Bailey, Scott, 1974. *Diagnostic Mikrobiology*. Saint Louis: The CV Mosby Company, hal 11-114.
- 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, hal 47-57.
- Bills, GF, 1996. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants , in (Redlin S and Carris LM eds) *Systematics, Ecology and Evolution of Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants*. APS Press St. Paul, MN.
- 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.
- Black, JG., 1999. *Microbiology : Principles and Exploration*, 4<sup>th</sup> ed, New Jersey : Prentice Hall Inc, p. 351-357
- Bonang, G. and Roeswandono, 1989. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kedokteran*. Jakarta: PT Gramedia, hal 116-154.
- Brooks, C.J.W., Walsh, M.I., Rizk, M., Zakhari, N.A., Toubar, S.S., Watson, D.G., 1993. Assay of certain oral contraceptive formulations by gas chromatography – mass spectrometry – selected ion monitoring, *Acta Pharmaceutica Hungarica*, Vol. 63, p. 19-27.
- Brtko J, Hudecova D, Branssova J, Novotny L, Eybl V, Melnk M., Uher M., 2001. Kojic acid A superior source for preparation of biologically active

- compound (Current experience) *Biomarkers and Environment* Volume 4, Supplement Symposium.
- Brunner, F and Petrini O., 1992. Taxonomy of some *Xylaria* sp. and Xylariceous Endophytes by Isozyme Electrophoresis. *Mycol. Res.* 96: 723 – 733.
- Burdock FA, Soni MG, Carabin IG., 2001. "Evaluation of health aspects of kojic acid in food". *Regulatory Toxicology and Pharmacology* . 33 (1): 80–101.
- Cannell RP, 1998. *Natural Products Isolation*, Humana Press, New Jersey 45 -52.
- Carrol G. 1998. Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to mutualistic Symbiont. *Ecology* 69 (1) : 2-9.
- Chen, T., Li, J., Cao, J., Xu, Q., Komatsu, K., Namba, T., 1999. A new flavone isolated from rhizome *Smilacis gabrae* and the structural requirements of its derivatives for preventing immunological hepatocyte damage, *Planta med.*, Vol. 65, p. 56-9.
- Choma, Irena., 2005. *The Use of Thin-Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis*. [www.lcgceurope.com /lcgceurope / artikel](http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/artikel)
- Clay, K., 1988. Fungal endophytes of grasses: A defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*. Vol. 69 No. 1, p. 10-16.
- Cohen PA and Towers GH, 1995. Anthraquinones and phenanthroperylene-quinones from *Nephroma laevigatum*. *J. of Natural Product* 58: 4, 520 –526.
- Coll JC and Bowden F, 1986. The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixtures. *J of Natural Product* 49: 5, 934-936.
- Demain AL and Solomon NA, 1986. Manual of industrial microbiology and Biotechnology. *American Society for Microbiology*, Washington DC.
- Dreyfuss ME, Hoffman HH, Kobel H, Pache W, Tsecherter H, 1986. Cyclosporin A and C: New Metabolites from *Trichoderma polysporum* (Link Expers) Rifai. *Appl. Environ. Microbiol.* 3: 125 – 133.
- Dutton MF, Westlake W, 1985. Occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in Natal, South Africa. *J.A.O.A.C.* 68, 839-842.
- Dwidjoseputro D, 1987. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Penerbit Djambatan, hal 116-154.

- Ebel R., 2003. *Heinrich Heine Institute of Pharmaceutical Biology*, University of Düsseldorf Germany. Personal communications.
- Erol DD, Calis U, Yulug N, 1995. Synthesis and anti microbial activities of some dithiocarbamate derivatives of Kojic acid. *Bull. Chim. Farmaceutico – anno* 134 620-623.
- Faeth SH, 2002. Are endophytic fungi defencive plant mutualists ? *Oikos* 98: 25 – 36.
- Findley JA, Gua QL, Pemer PE, 1995. Novel diterpenoid insect toxins from conifer endophyte. *J.of Natural Products* 58: 2, 197-200.
- Fried, B, and Sherma, J, 1994. *Thin-Layer Chromatography*. 3<sup>rd</sup> Ed., New York: Marcel Dekker, Inc., p. 3-5, 177-179.
- Gibbons S, and Gray AI, 1998. Isolation by planar chromatography. *In:.* Cannell R JP (Ed). *Natural Products Isolation*, Totowa, New Jersey: Humana Press, pp. 209-222.
- Harborne JB, 1984. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Diterjemahkan: Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro, Penerbit ITB Bandung.
- Harborne, JB, 1999. Phytochemical dictionary: *A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, 2<sup>nd</sup> Ed., Philadelphia: Taylor and Francis Inc, p 490.
- Hefni Effendi, 2004. *Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites of sponge-derived fungi collected from the Mediterranean sea (Italy) and Bali sea (Indonesia)*. Germany, Disertation, der Mathematisch Naturwissen-schftlichen Fakultat der Heinrich-Heine Universitat Düsseldorf p 7.
- Heyne K, 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia* Jilid III, Cetakan ke-1. Jakarta.Badan Litbang Departemen Kehutanan, Yayasan Sarana Wana Jaya, 1636-1637.
- Horvath G, Kocsis B, Botz L, Nemeth J, Szabo LG, 2002. Antibacterial activity of *thymus* phenols by direct bioautography, *Acta Biologica Szegediensis*, 46 3-4, p 145-146.

- Hostettmann, K . 1991. *Methods in Plant Biochemistry*. Switzerland : Institute of Pharmacognosy and Phytochemistry, p. 47-69
- Hostettman K, 1995. *Cara Kromatografi Preparatif Pengantar Pada Isolasi Senyawa* (terjemahan), Bandung Penerbit ITB, hal. 9-11.
- Hou WC, Wu WC, Yang CY, Chen HJ, Liu SY and Lin YH, 2004. Antioxidant activities of methanolic and hot water extracts from leaves of three cultivars of Mai Men Dong ( *Liriope spicata* L). *Bot. Bull Acad. Sin* 45: 285 – 290.
- Houghton PJ, and Raman A, 1998. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts* 1 st ed. London: Thomson Science, 54 - 93.
- Jawetz E, Melnick JL, and Adelberg EA,1991. *Medical Microbiology*. 19<sup>th</sup> ed. Connecticut : Prentice-Hall Int Inc, 194-199.
- Jawetz E, Melnick JL, dan Adelberg EA, 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. 20 ed. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, hlm 54.
- Kareem, S. O., Akpan, I., and Ojo, O. P., 2008. *Antimicrobial activities of Calotropis procera on Selected Pathogenic Microorganisms*. African Journal of Biomedical Research, vol.11., p. 105-110.
- Kayahara, H., Shibata, N., Tadasa, K., Maeda, H., Kotani, T., and Ichimoto, I., 1990. *Agr. Biol. Chem.* 54 (9), 2441-2442.
- Lestari N, 1998. *Uji Aktivitas Antimikroba Hasil Fraksinasi dari Metanol Daun Stachytarpheta jamaicensis (L) Vahl Dengan Metode Bioautografi Langsung*. Skripsi, Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, hal. 32-34
- Leuschner M, 1998. *Untersuchung zur Enzymatik der UGD-glucose Coniferylalkohol- $\beta$ -Glucosyltransferase in Zellkulturen von Linum album und Linum nodiflorum*, Germany der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf p 7.
- Lim D, 1998. *Microbiology*, 2<sup>nd</sup> ed. Boston : Mc. Graw-Hill, pp 132-133
- Lodge D, Fisher PJ, Sutton BC, 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia* 88:733 –738.
- 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>.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J, 2000. *Biology of Microorganisms*. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall Inc, pp 729-732.
- Marjorie, M.C. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*, 12 (4). p.564-582
- Mardisiswojo S, dan Rajakmangunsudarso H, 1985. *Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang I*. Cetakan pertama, Jakarta: PN Balai Pustaka, hlm 167.
- Mikat DM and Mikat KW, 1981. *A Clinical Dictionary Guide To Bacteria And Fungi*. 4<sup>th</sup> Ed. PT. Darya Varia Laboratoria, pp. 22-23, 50, 76.
- Moore, B.S., and Hertweck, C., 2002. Biosintesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Nat. Prod. Rep.* 19, 70 – 99.
- Moussaif M, Jacques P, Schaarwachter P, Budzikiewicz H, Thonart P, 1997. Production of Cyclosporin from *Acremonium luzulae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1739- 1743.
- Neneng, Liswara., 2000. *Karakterisasi Senyawa Antibiotik yang Resisten Terhadap  $\beta$ -Laktamase Tipe TEM-1 dari Isolat ICBB 1171 Asal Ekosistem Air Hitam, Kalimantan Tengah*. <http://www.icbb.org/indonesia/penelitian/penelitian01.htm>
- Novotny L, Rauko P, Abdel-Hamid, Valchalkova A, 1999. Kojic acid a new leading molecule for a preparation of compounds with an anti-neoplastic potential. *Minireview Neoplasma*, 46: 2, 89-92.
- Pelczar MJ, 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi I*. Terjemahan, Jakarta: Universitas Indonesia Press, hlm 189-199.
- Petrini O, Sieber T N, Toti L and Viret O, 1992. Ecology metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, 1: 185 -196.
- 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
- Rao N S, 1994. *Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*. Edisi kedua, Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia, hlm 41-43.
- Rayner ADM, 1991. The challenge of the individualistic mycelium. *Mycologia* 83: 48 –71.
- 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, pp 41-43.
- Rios JL, Recio MC and Villar A, 1988. *Journal Of Ethnopharmacology* 23 : 127-149.
- 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.
- 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.
- Sanakawa, U., 1980. The Biosynthesis of anthraquinonoid mycotoxins from *Penicillium isandicum* Sopp and related fungi. In Steyen P. (ed). *The Biosynthesis of mycotoxins* Academic Press, New York, 357-394.
- Schlegel HG, 1994. *Mikrobiologi Umum (terjemahan)*. Bulaksumur, Yogyakarta: Gadjah Mada University Press, hlm 177-181.
- Seigler, D.S., 1998. *Plant secondary metabolism*. Kluwer Academic Publisher. London, 759.

- Smith, D. T., Conant, N. F., Berad, J. W., Willet, H. P., Overman, J. R., Larsh, J. E., Brown, I. W., Sharp, D. G., Poston, M. A. 1960. *Microbiology*. Appleton-Century-Crofts, Inc. New York, 12<sup>th</sup> Ed. p.243-249, 380-385, 414-415, 425-426, 474-476, 830-835.
- Spectral Database for Organic Compounds, SDBS*, Japan National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) <http://riodb01.ibase.aist.ac.jp/sdb/>, tgl diakses 24 Januari 2008.
- Stahl E, 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Spektroskopi* (terjemahan). Bandung: Penerbit ITB, hlm. 3-18, 249.
- 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. of Natural Product*, 58 : 9, 1315-1324.
- Strobel, G., and Daisy, B., 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 4, 491-502.
- Sugijanto, N.E., Gunawan Indrayanto, Noor Cholies, 2003. *Isolasi dan determinasi jamur endofit dari Aglaia eusideroxylon, Aglaia odorata dan Alyxia reinwardtii* Laporan Penelitian DIKS, Universitas Airlangga
- Sugijanto, N. E., Indrayanto, G., Cholies, N., 2005. *Paradigma baru produksi bahan obat menggunakan jamur endofit dari tanaman Alyxia reinwardtii*, Laporan Penelitian PHB -Universitas Airlangga.
- Sugijanto, N. E., Indrayanto, G., Cholies, N., 2006. *Paradigma baru produksi bahan obat menggunakan jamur endofit dari tanaman Alyxia reinwardtii*, Laporan Penelitian PHB tahun ke 2 -Universitas Airlangga
- Tan RX and Zou WX, 2001. Endophytes a rich source of fungsional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18, 448-459.
- Tjitrosoepomo G, 1988. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)* Yogyakarta: Gajah Mada University Press, hlm 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.
- Wiyakrutta S, Sriubolmas N, Panphut W, Thongon N, Danwisetkanjana K, Ruangrunsi N, Meevootisom V, 2004. Endophytic fungi with antimicrobial, anticancer and antimalarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 3, 265-272.
- Zaini NC, dan Indrayanto G, 1978. *Cara-Cara Skrining Fitokimia*, Disajikan pada acara kursus penyegaran dalam rangka Lustrum III Fakultas Farmasi UNAIR, hlm. 3-11.
- 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 Journal Of Microbiology & Biotechnology* 21: pp. 201-206.
- Zborowski K, Grybos R, Proniewicz LM, 2003. Determination of the most stable structures of selected hydroxypyrones and their cations and anions. *J.of Molecular Structure (Theochem)* 639, 87-100.

