

Bidang Ilmu: Mikrobiologi Farmasi

**LAPORAN
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL
BATCH I
Tahun Anggaran 2010**



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

Noor Erma Sugijanto
Gunawan Indrayanto
Sugijanto
Noor Cholies Zaini

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian
No: 150/SP2H/PP/DP2M/III/2010, Tanggal 01 Maret 2010

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
2010**

Bidang Ilmu: Mikrobiologi Farmasi

**LAPORAN
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL
BATCH I
Tahun Anggaran 2010**

100-2

100-2

100-2

Pro



**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

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

Noor Erma Sugijanto
Gunawan Indrayanto
Sugijanto
Noor Cholies Zaini

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian
No: 150/SP2H/PP/DP2M/III/2010, Tanggal 01 Maret 2010

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
2010**

i

HALAMAN PENGESAHAN

1. JUDUL : **Produksi antibiotika baru dari *Lecythophora sp.*, jamur endofit tanaman *Alyxia reinwardtii* BL**

2. Ketua Peneliti
 Nama : Dr. Noor Erma Sugijanto, MS, Apt.
 Jenis Kelamin : Wanita
 NIP : 195211281980022001
 Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 Jabatan struktural : -
 Bidang keahlian : Kimia Farmasi dan Mikrobiologi Farmasi
 Fakultas/Jurusan : Fakultas Farmasi
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti :

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

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian
 a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 tahun
 a. Biaya yang diusulkan : Rp. 100.000.000
 b. Biaya yang disetujui tahun 2010 : Rp. 81,250,000

Mengetahui,
 a/n Dekan Fakultas Farmasi
 Wakil Dekan I

(Dr. Isnaeni, M.S., Apt)
 NIP: 19560113198203 2001

Surabaya, 26 Oktober 2010
 Ketua Peneliti,

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

Mengetahui,
 Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat



(Dr. D. Joko Agus Purwanto, MS., Apt)
 NIP. 195908051987011001

RINGKASAN

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

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

Tujuan penelitian ini, melakukan isolasi dan elusidasi struktur metabolit jamur yang berkhasiat antimikroba khususnya dari *Lecythophora* sp. endofit dari *Alyxia reinwardtii*.

A. reinwardtii BL diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur telah diidentifikasi oleh Dr. Irawati, LIPI Biologi, Bogor dengan voucher no 710/IPH.1.02/If.8/2003). Jamur endofit *Lecythophora* sp. 30.1 dan 30.5 diisolasi dari *A. reinwardtii* BL, diidentifikasi oleh Dr. R.A.Samson (CBS Utrecht, The Netherlands, reg no 208-2003). Kultivasi dilakukan dalam media cair *Malt extract*, pH awal 6,5 pada suhu kamar selama 4 minggu. Metabolit dielusidasi strukturnya menggunakan spektroskopi $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H}^1\text{HCOSEY}$, $^1\text{H}^{13}\text{C COSY}$, dan Mass spektrometri.

Ekstrak *Lecythophora* sp. 30.1 & 30.5 menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap enam mikroba uji. Senyawa aktif yang berperan sebagai antimikroba diidentifikasi sebagai asam kojat, emodin, 7-kloremodin, p.hidroksi asam benzoat, 5,8 ergosterol peroksida dan suatu senyawa baru makrolakton-glikosida telah dielusidasi.

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

SUMMARY

An endophyte is a bacterial or fungal microorganism, which spends of its life cycle inside the healthy tissues of its host plant, colonizing either intercellularly and or intracellularly (Tan and Zou, 2001). Some metabolites may be produced by the endophytes to protect their host plant from disease caused by pathogens. The most frequently isolated endophytes are fungi (Strobel & Daisy, 2003).

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

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.

A. reinwardtii was collected from the Purwodadi Botanical Garden, in April 2003, was identified by Dr Irawati at the Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences, Bogor (voucher no 710/IPH.1.02/If.8/2003). Fungal strains 30.1 and 30.5 were identified by Dr R. A. Samson (CBS, Utrecht, The Netherlands, reg. no 208-2003) as members of the genus *Lecythophora*. Mass cultivation of the endophytes were carried out separately in Erlenmeyer (300 mL), which containing malt extract broth (15 g/L, initial pH 6.5) under static conditions at room temperature (ca 30 \pm 3°C) for 4 weeks. The structures of the compounds were determined by mass spectrometry in combination with several NMR spectroscopic techniques.

The extracts showed antimicrobial activity against six microbes. *Lecythophora* sp. yielded kojic acid, p-hydroxybenzoic acid, emodine, 7-chloroemodine, ergosterol-5,8 - peroxide and a new compound macrolactone glycoside has been elucidated.

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

ABSTRACT

A new macrolactone glycoside lecythomycin, 23-methyl-3-(1-O-mannosyl)-oxacyclotetra-cosan-1-one was isolated from the endophytic fungus *Lecythophora* sp. (code 30.1). The endophytic fungus was isolated from *Alyxia reinwardtii*. The structure of the new compound was elucidated on the basis of NMR and mass spectrometric data.

The antibacterial and antifungal activity of the isolate is studied.

Keywords: *Lecythophora* sp, *Alyxia reinwardtii*, endophytic fungus, lecythomycin, macrolactone glycoside

ABSTRAK

Senyawa baru makrolakton glikosida *lecythomycin*, atau 23-metil-3-(1-O-manosil)-okasiklotetra-kosan-1-on telah berhasil diisolasi dari jamur endofit *Lecythophora* sp. (dengan kode 30.1). Jamur endofit tersebut diisolasi dari *Alyxia reinwardtii*. Elusidasi struktur senyawa baru tersebut didasarkan atas data NMR dan spektrometri massa.

Aktivitas antibakteri dan antifungi isolat tersebut telah diteliti.

Kata kunci: *Lecythophora* sp, *Alyxia reinwardtii*, jamur endofit, *lecythomycin*, makrolakton glikosida

PRAKATA

Puji syukur Ahamdulillah saya panjatkan ke hadirat Allah swt karena atas perkenan dan rahmat yang dilimpahkan-Nya maka penyusunan laporan kemajuan HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL BATCH I KLASTER GIZI DAN KESEHATAN BATCH I TAHUN 2010, yang berjudul **Produksi antibiotika baru dari *Lecythophora* sp. jamur endofit tanaman *Alyxia reinwardtii* BL** dapat diselesaikan.

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

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

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

Tim Peneliti



DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
ABSTRAK	v
PRAKATA	vi
DAFTAR ISI	vii
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	7
BAB IV. METODE PENELITIAN	8
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	13
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	25
DAFTAR PUSTAKA	26

BAB I

PENDAHULUAN

1. Latar Belakang masalah

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

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

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

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

Alyxia reinwardtii diketahui telah lama digunakan sebagai jamu di Indonesia karena pertumbuhannya yang lambat dan penggunaannya yang banyak tanaman tersebut mendekati punah. Melalui penelitian ini diharapkan diperoleh metabolit sekunder jamur endofit yang diisolasi dari *Alyxia reinwardtii*, yaitu *Lecythophora sp* yang pada pengujian awal telah menunjukkan aktivitas antimikroba, dapat dielusidasi strukturnya dan dibuktikan aktifitasnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang jamur endofit dan metabolitnya

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

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

Berbagai golongan senyawa fungsional dapat dihasilkan dari endofit dan atau interaksinya dengan tanaman inang antara lain alkaloida, amina dan amida, derivat indole, pyrrolozidine, steroid, terpenoid dan terpen, quinon, flavon dan flavonoid, peptide, phenylpropanoid, phenol dan senyawa lain. Ergot alkaloida 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, misalnya Taxol (obat kanker dari tanaman *Taxus brevifolia*) dan camptothecin (bahan baku anti kanker) dari jamur endofit tanaman *Nothapodytes foetida* (Puri, 2005).

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

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

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

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

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

2.2 Tinjauan tentang *Alyxia reinwardtii* BL

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

2.3. Tinjauan tentang uji aktivitas antimikroba

Metode uji antimikroba ekstrak bahan alam dikenal 3 macam, yaitu difusi, dilusi dan bioautografi. Beberapa faktor mempengaruhi hasil uji: metode ekstraksi, volume inokulum, komposisi media, pH dan suhu inkubasi, jenis mikroba uji dan volume cuplikan (Rios, 1988). Metode difusi, sample dalam reservoir dibiarkan kontak dengan media yang sudah diinokulasi mikroba uji. Setelah inkubasi didapatkan zona yang jernih (daerah hambatan) yang menentukan jumlah antibiotika dalam ekstrak. Metode dilusi menentukan konsentrasi minimum sample yang menghambat pertumbuhan mikroba uji. Sedangkan metode bioautografi didasarkan pada efek biologis (antibakteri / antifungi) senyawa yang diuji yang sebelumnya dilakukan kromatografi lapis tipis terlebih dahulu. Zona hambat diamati dengan pereaksi penampak noda yang mendeteksi adanya aktivitas dehidrogenase (Choma, 2005).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 TUJUAN PENELITIAN

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

3.2 MANFAAT PENELITIAN

Antimikroba baru sangat diperlukan untuk terapi beragam penyakit infeksi pada manusia, hewan ternak dan agroindustri, mengingat telah terjadi resistensi pada beragam mikroba penyebab penyakit misalnya tbc. Jamur endofit berpotensi ekonomi penting sebagai sumber bahan baku obat, antibiotika, enzyme, insektisida, dan hormon pertumbuhan tanaman di masa depan. Beragam antibiotika dapat diproduksi jamur endofit a.l.: siklosporin A, sefalosporin, munumbicin, sitokalasin, penicillin N, sporiofungin dan sebagainya. Diharapkan dari penelitian yang dilakukan, dapat diisolasi berbagai senyawa berkhasiat antimikroba dari endofit yang diisolasi dari *Alyxia reinwardtii*.

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

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Bahan

4.1.1 Bahan penelitian

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

4.1.2 Bahan kimia

Bahan kimia digunakan untuk ekstraksi meliputi: etil asetat, metanol, *n*-heksan p.a (Mallinckrodt Baker Inc. Philipsburg, NJ), *n*-butanol (tehnis diredestilasi). Etanol (pharmaceutical grade) dan NaCl (E Merck). Pemurnian dan KLT digunakan Plate KLT *Silicagel 60 F₂₅₄*, dan *Silicagel 60 G for colum* (E. Merck), *n*-heksan, etil asetat, diklorometan, metanol p.a. (Mallinckrodt Baker Inc. Philipsburg, NJ), dan kloroform (E. Merck). Pereaksi penampak noda digunakan: anisaldehyd-H₂SO₄.

4.1.3 Bahan Media

Agar (food grade), Malt extract (E. Merck), Saboroud 2% dextrose broth (Oxoid, CMI), Potatoes Dextrose Agar (Difco), Nutrient broth (Oxoid, CMI). Kontrol positif digunakan streptomisin sulfat (PT. Meiji Indonesia no. Batch SS03364-1) dan mikonazol (pharmaceutical grade, P.T.Bernofarm, Surabaya).

4.1.4 Mikroba uji

Escherichia coli ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* dari ULP (Unit Layanan Pengujian) Fakultas Farmasi. *Bacillus subtilis* FNCC 0059 dari

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Bakteri uji diidentifikasi dengan pewarnaan Gram serta *Lactofenol Cotton Blue* untuk jamur *Candida albicans* sebelum digunakan.

4.2 Alat

Alat yang digunakan meliputi: *Autoclave* (Huxley HL – 340 Speedy), *Laminair Air Flow Cabinet* (Dalton), timbangan analitik (Mettler Toledo AB 204-s), pH-meter (Fischer Accumet Model 230A). Erlenmeyer 300 ml, *Chamber* kromatografi (Camag), Lampu UV, *ultrasonic, vortex, soccorex*, spektrofotometer UV-Vis (Lambda EZ 201-Perkin Elmer) dan Hitachi F-4000. HPLC untuk analisis kualitatif digunakan Dionex P580A LPG, detektor Dionex, photoarray detector UVD 340S, autosampler ASI-100T, programme Chromelon Ver 6.3.

Elusidasi struktur, ^1H dan ^{13}C NMR direkam dengan Bruker DPX 300, ARX 400, 500 atau AVANCE DMX 600 NMR *spectrometers* dengan standard software Bruker. Spektrum massa direkam pada Finnigan MAT 8430 Mass spectrometer. LC-MS equipment digunakan Finnigan LCQ-DECA dengan Agilent 1100 HPLC Series (Waldbronn, Germany) dengan sistem HPLC (pompa, detektor dan autosampler), kolom Knauer, (L) 125mm, (ID) 2mm, prepacked Eurospher-100 C18 ($5\mu\text{m}$). Mass spectrometer resolusi tinggi digunakan Micromass Q -TOF 2.

4.3 Kultivasi jamur endofit pada kultur *in-vitro*

Jamur endofit diambil satu $\check{\text{O}}$ se dari kultur persediaan, ditumbuhkan dalam media *malt extract* agar selama 7 hari sebagai inokulum. Kultivasi massal jamur endofit dilakukan dalam Erlenmeyer 300 ml, yang masing-masing mengandung 40 ml media cair (*Malt extract* 15 gram perliter air) dengan pH awal 6,5. Jamur dikultivasi dalam kondisi gelap, pada suhu kamar selama 4 minggu (Sugijanto *et al.*,2009).

4.4 Ekstraksi dan fraksinasi metabolit sekunder hasil kultivasi.

Kultur disaring, masing-masing bagian miselia dan cairan dipisahkan. Cairan media diekstraksi dengan etil asetat sepertiga volumenya, dikocok dengan shaker selama

1 jam dan fase etil asetatnya dikumpulkan. Ekstraksi ini diulang 3 kali. Miselia dikeringkan pada suhu 50°C selama 48 jam, dipotong-potong kecil, diekstraksi metanol dengan diultrasonografi 15 menit lalu disaring. Ekstrak metanol dipekatkan dengan rotavapor pada suhu 35°C hingga seperlima volume awal, selanjutnya dipartisikan kedalam *n*-heksan-air dan terakhir dengan *n*-butanol. Masing-masing ekstrak diuapkan / dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental yang kemudian dikeringkan di lemari asam. Ekstrak kering disimpan pada suhu dingin di lemari es hingga saat digunakan (Ebel, 2003).

4.5 Uji aktivitas antibakteri dan antifungi

Skринing aktivitas antimikroba sebagai antibakteri dan antifungi dilakukan menggunakan difusi cakram (*disc diffusion methode*) menurut Doughari, 2006. Bakteri uji disiapkan dengan mengambil satu \checkmark se dimasukkan media perbenihan nutrient broth (28 gram dalam 1 liter dapar fosfat pH 7,0) untuk jamur dibiakkan dalam Sabouroud Glukosa agar (neopepton 10 gram, glukosa 40 gram dan serbuk agar 15 gram dalam satu liter air). Jamur uji disiapkan dengan mengambil satu \checkmark se jamur dimasukkan tabung berisi air steril lalu disentrifuge selanjutnya diencerkan hingga diperoleh suspensi dengan transmittan 90% dibandingkan blanko air suling steril pada panjang gelombang 540 nm. Suspensi tersebut mengandung 10^6 hingga 10^8 spora/ml. Inokulum mikroba uji dibuat dengan menambahkan normal salin steril ke dalam tabung mikroba uji yang sudah dibiakkan selama 24 – 48 jam, dikocok hingga tersuspensikan ke dalam normal salin, kekeruhannya diukur dengan spektrofotometer pada 580 nm, sampai dicapai transmittan 25 % (Anonim, 1995).

Dibuat larutan induk ekstrak 20 mg/mL, untuk membantu kelarutan ditambahkan tween 20 dan dilakukan pengenceran hingga diperoleh konsentrasi 10 mg/mL dan 5,0 mg/mL. Ditetaskan 10 μ l larutan uji pada cakram kertas, diletakkan pada permukaan media yang telah diinokulasi dengan 2,5-5 μ l mikroba uji dalam 10 ml media, dan diamati daya hambatnya. Hambatan pertumbuhan kuman diamati sebagai daerah bening pada media, diulang tiga kali untuk tiap jenis mikroba uji (Doughari, 2006).

4.6 Pemurnian metabolit jamur endofit yang aktif sebagai antimikroba.

Fraksinasi dilakukan dengan khromatografi vakum, ditimbang ekstrak kering 3 gram dilarutkan dalam pelarut semula, ditambahkan *Silica gel 60 G for column chromatography* 9 gram hingga homogen dan dikeringkan melalui *vacuum rotavapor*. Kolom kromatografi vakum diisi adsorben *Silica gel 60 G for thin layer chromatography* 50 gram, dipadatkan dengan pompa vakum, ditambahkan adsorben hingga setinggi 5 cm. Serbuk ekstrak kering diletakkan di bagian atas, dilapisi lagi dengan *Silica gel 60 G for column chromatography* terakhir ditutup kertas saring. Dilakukan elusi gradien dengan berbagai perbandingan eluen *n*-heksan – etilasetat, diklorometan – metanol, metanol – air. Pelarut untuk eluasi masing masing fraksi digunakan campuran eluen 50 ml. Hasil fraksinasi ditampung, selanjutnya dilakukan KLT dengan eluen kloroform : metanol : air : 65 : 35 : 1 (v/v); etil asetat : metanol : air : 100 : 13,5 : 1,5 (v/v) dan *n*-heksan : etil asetat : 3 : 2 (v/v). Noda hasil kromatografi yang memisah dengan R_f sama dan memberikan warna yang sama pada pengamatan dengan sinar ultra violet pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm atau dengan pereaksi anisaldehyd – asam sulfat dikumpulkan untuk dimurnikan lebih lanjut.

Fraksinasi dengan khromatografi kolom dilakukan dengan cara ditimbang ekstrak \pm 3 gram dan *Silica gel for column* 50 gram dengan eluen *n*-heksan : etil asetat : 4 : 1 (v/v). Eluasi dilanjutkan dengan campuran eluen *n*-heksan : etil asetat 6 : 4; 1 : 4, etil asetat 100 % dan etil asetat : metanol 9 : 1. Fraksi yang sama digabung dan selanjutnya dimurnikan dengan *chromatography preparative* menggunakan plate *Silicagel 60 F₂₅₄* dan RP-18. Sistem eluen digunakan dikhlormetan : metanol : 9 : 1 ; dan asetonitril : metanol : air: 2 : 1 : 1(v/v). Selanjutnya hasil *chromatography preparative* dikerok dan diekstraksi dengan pelarut yang sesuai lalu disaring, ekstraksi diulang beberapa kali. Filtrat hasil penyaringan diuapkan di lemari asam pada suhu kamar. Residu yang diperoleh diuji kemurniannya dengan KLT menggunakan beberapa sistem eluen. Residu yang belum murni dipisahkan dengan *chromatography preparative* lagi atau dicuci dengan pelarut yang sesuai dan diusahakan dapat membentuk kristal. Isolat dimurnikan dengan direkristalisasi dengan etil asetat dan aseton dan ditentukan kemurniannya dengan mengamati titik leburnya dengan DTA, juga dilakukan KLT

dengan tiga sistem. Digunakan juga KLT dua dimensi dengan eluen etil asetat : metanol : air : 100: 13,5 : 1,5 (v/v) dengan penampak noda sinar ultra violet pada 254 dan 365 nm atau pereaksi anisaldehyd - asam sulfat. Uji kemurnian juga dilakukan secara HPLC dan direkam spektra ultra violet dari khromatogram yang dihasilkan.

4.7 Karakterisasi dan elusidasi struktur senyawa aktif.

Dilakukan karakterisasi dan elusidasi struktur terhadap metabolit yang aktif pada uji aktifitas antimikroba baik sebagai antibakteri maupun sebagai antifungi menggunakan spektroskopi $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H}^1\text{HCOSEY}$, $^1\text{H}^{13}\text{C COSY}$, Mass spektrometri.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Kultivasi, ekstraksi dan fraksinasi metabolit jamur endofit

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

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

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

5.2 Uji aktivitas antibakteri dan antifungi

Hasil uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi cakram kertas terhadap ekstrak *Lecythophora* sp. strain 30.1 dan 30.5 dinyatakan dalam diameter zona hambat (mm) disajikan pada 5.1 dan 5.2

Keenam mikroba uji yang digunakan mewakili bakteri Gram positif dan negatif, serta jamur penyebab berbagai penyakit infeksi. Melalui penelitian ini terbukti ekstrak jamur endofit *Lecythophora* sp. 30.1 dan 30.5 memiliki aktivitas antimikroba. Daya antibakteri terbesar dimiliki ekstrak etil asetat, sedang ekstrak *n*-butanol dan *n*-heksan relatif kurang. Kemungkinan kadar bahan aktif yang ada dalam ekstrak *n*-butanol dan *n*-heksan sangat kecil sehingga kurang mampu menghambat pertumbuhan mikroba uji,

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

Tabel 5.1 Aktivitas antimikroba ekstrak *Lecythophora* sp. 30.1

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

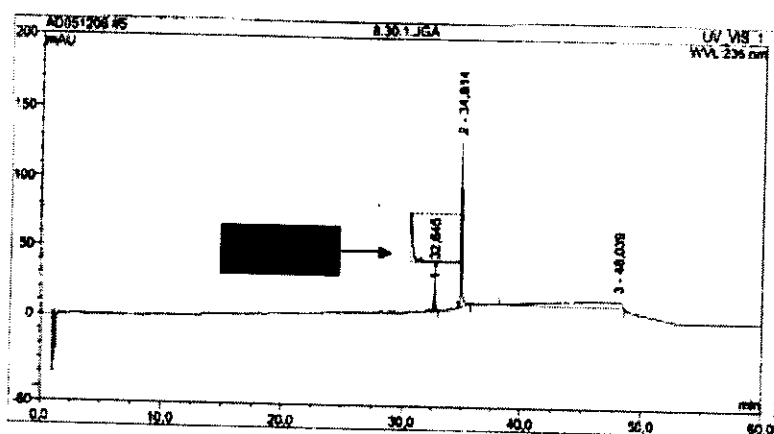
Tabel 5.2 Aktivitas antimikroba ekstrak *Lecythophora* sp. 30.5

Mikroba uji	E 5 mg	E 10 mg	H 5mg	H 10 mg	B 5mg	B 10 mg	K +
<i>E.coli</i> ATCC 25922	18,50	21,50	-	-	12,75	14,75	15,30
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	17,40	22,10	8,00	8,75	12,70	15,20	12,90
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	19,05	23,04	-	-	11,70	13,20	11,20
<i>S. typhimurium</i>	13,00	17,09	-	-	-	-	*
<i>B. subtilis</i> FNCC 0059	17,20	21,44	6,50	7,70	11,55	14,70	12,24
<i>C. albicans</i>	*	*	*	*	*	*	*

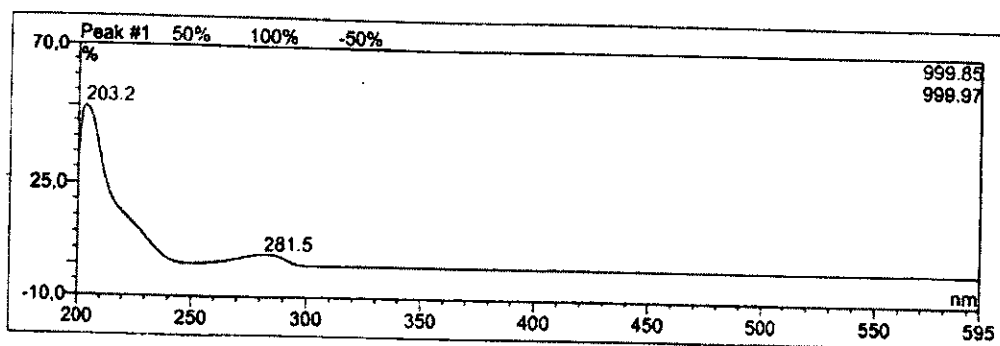
5.3 Karakterisasi dan elusidasi metabolit

5.3.1 Isolat 8

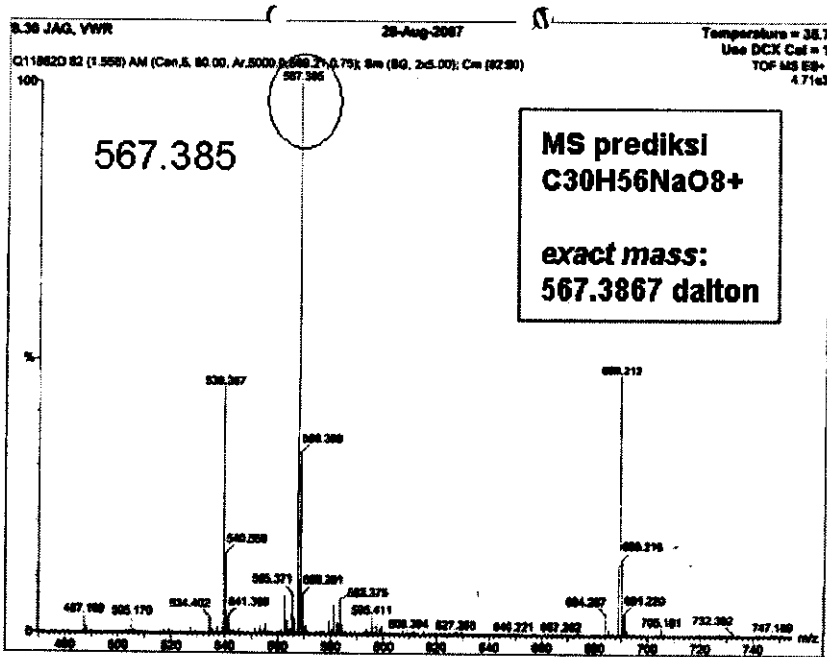
Isolat 8 merupakan serbuk putih, dari 0,48 g ekstrak heksan massa sel diperoleh 4,3 mg. KLT dengan Silicagel F₂₅₄ menggunakan eluen diklormetan : metanol: 9:1 (v/v) didapatkan R_f 0,51. KLT dengan RP-18 menggunakan eluen asetonitril : metanol : air : 2:1:1 (v/v) didapatkan noda dengan R_f 0,12.



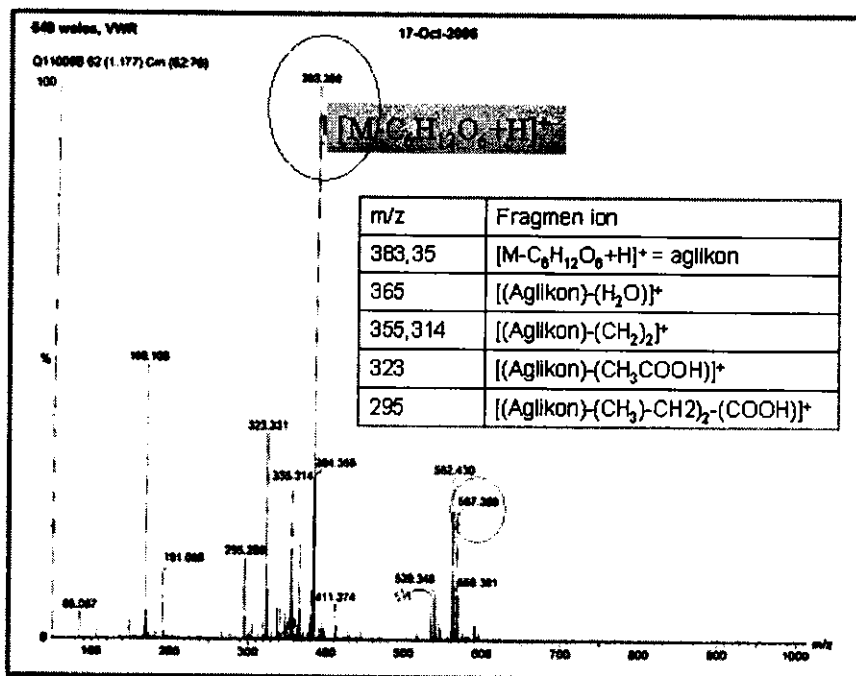
Gambar 5.1 Kromatogram HPLC isolat 8 (waktu retensi 32,645 menit) pada λ 235 nm, kolom RP 18 (Eurospher-100 C-18), fase mobil isokratik metanol: dapar fosfat pH 2, (10:9) selama lima menit, dilanjutkan elusi gradien tiap 5 menit hingga metanol 100 % dalam 30 menit diteruskan hingga 40 menit dengan metanol 100 %. Volume disuntikkan 20 μ l dengan Diode Array detektor sinar ultra violet λ 235, 254, 280 dan 340 nm



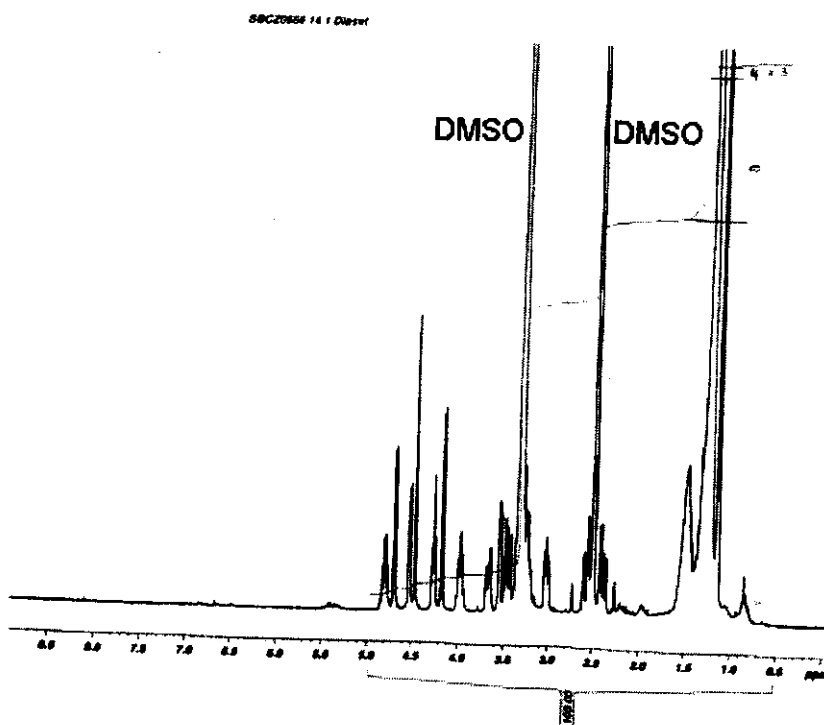
Gambar 5.2 Spektrum UV isolat 8



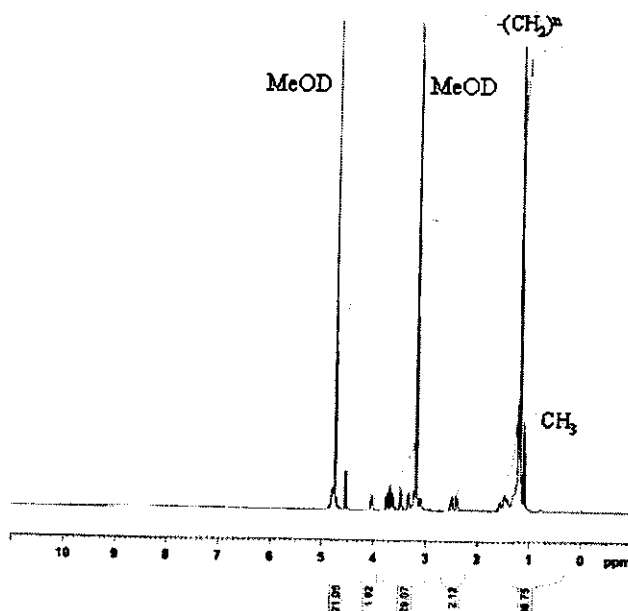
Gambar 5.3 Spektrum massa (HR- positif ESI-MS) isolat 8



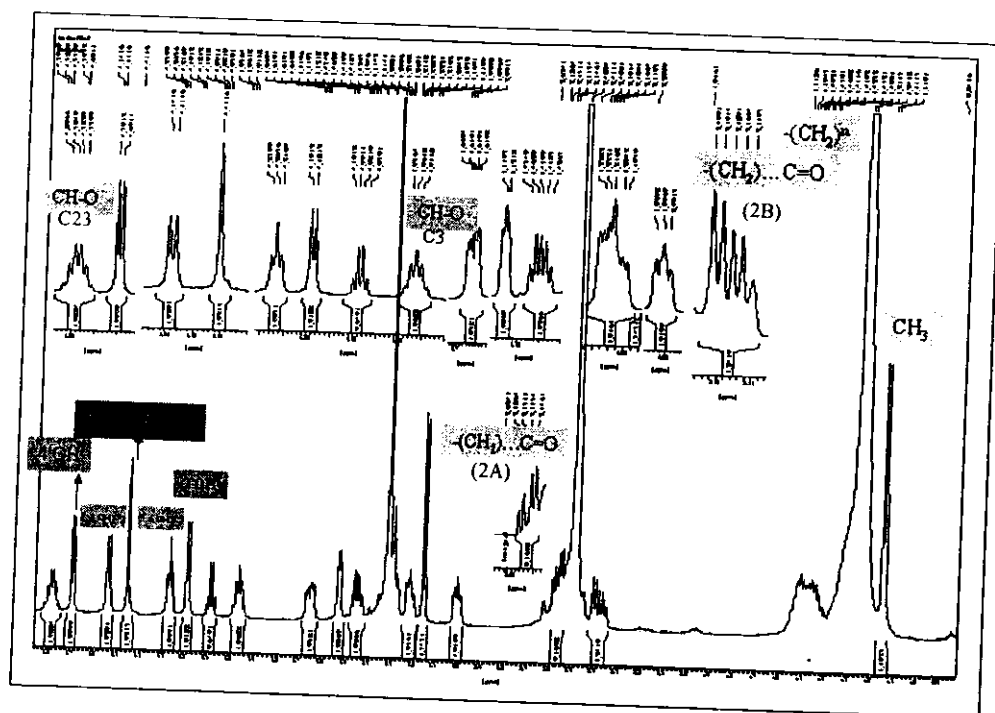
Gambar 5.4 Spektrum massa ESI-MS positif isolat 8



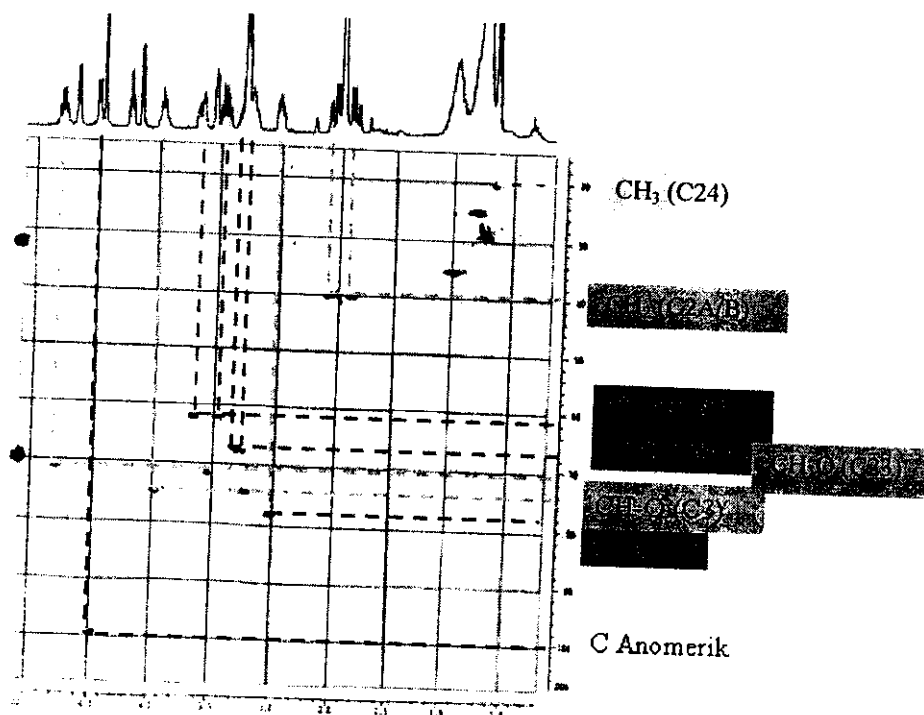
Gambar 5.5 Spektrum ^1H NMR isolat 8 (DMSO)



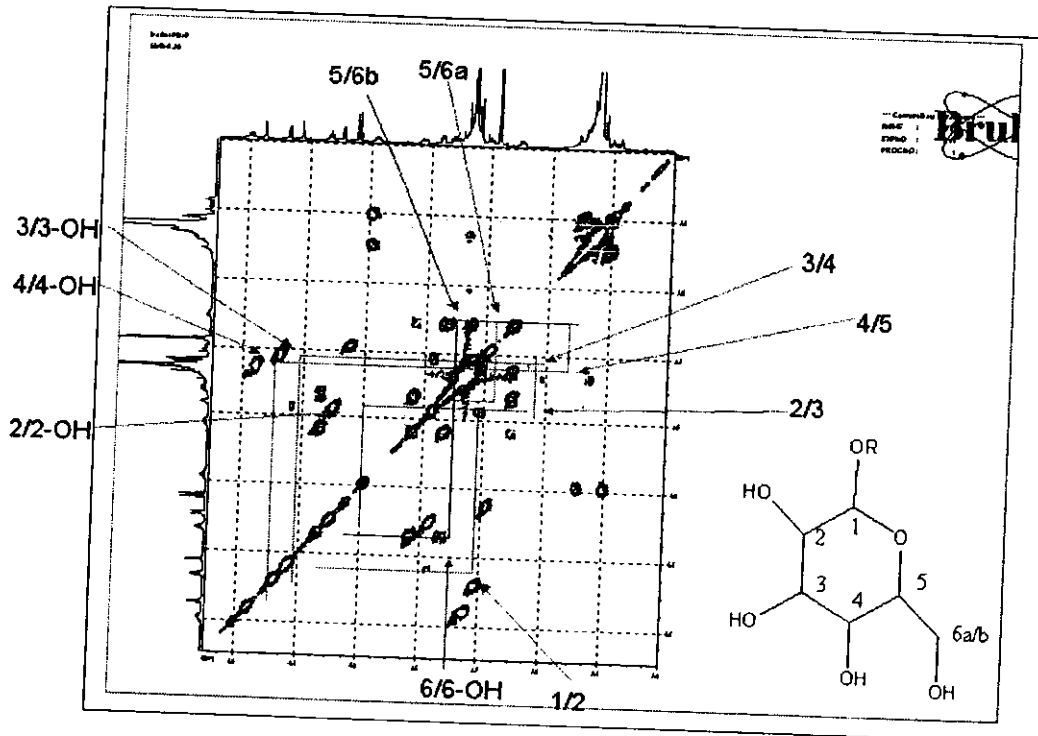
Gambar 5.6 Spektrum ^1H NMR isolat 8 (MeOD)



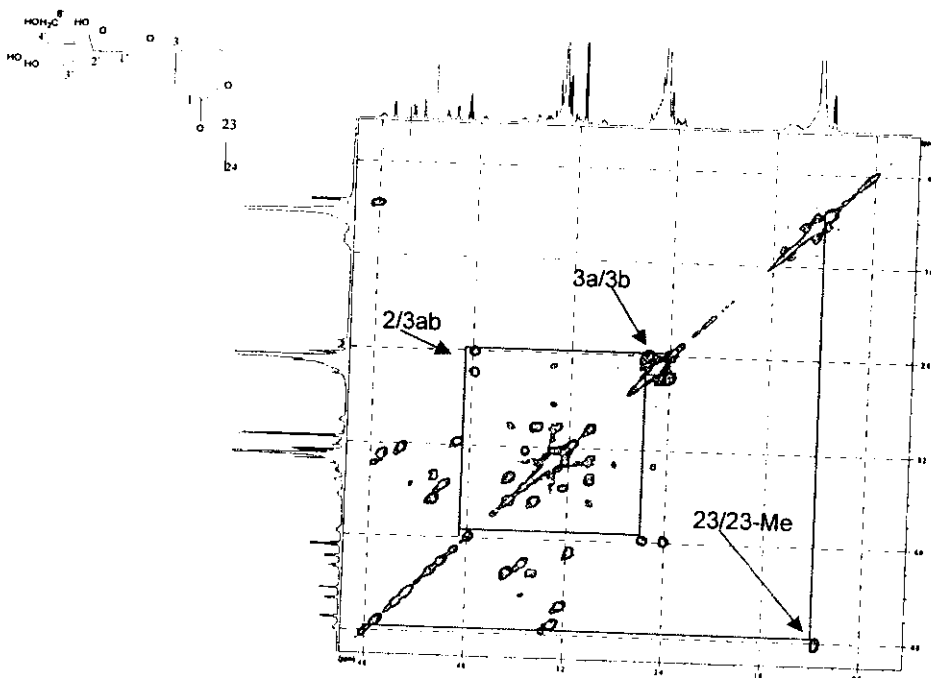
Gambar 5.7 Spektrum ^1H NMR isolat 8 yang diperbesar.



Gambar 5.8 Spektrum C-H Direct NMR isolat 8



Gambar 5.9 Spektrum H-H COSY NMR isolat 8



Gambar 5.10 Spektrum H-H COSY NMR isolat 8

Tabel 5.3: Data ^1H and ^{13}C NMR isolat 8

C no	$\delta^1\text{H}$ (ppm), mult. J (Hz) (MeOD)	$\Delta^1\text{H}$ (ppm), mult. J (Hz) (DMSO- d_6)	^{13}C ppm*	COSY	HMBC
1			171.0		
2A	2.61, dd, 14.8, 6.0	2.57, m	39.5	3, 2B	C-1, C-3
2B	2.50, dd, 14.8, 5.7	2.38, m		3, 2A	C-1, C-3
3	4.13, t, 6.0	3.96, t, 6.0	73.7	2A, 2B	C-1, C-2, C-1'
4-22- CH_2	1.3 - 1.6*	1.20 - 1.60*	20 - 40		
23	4.8*	4.78, m	70.0	23- CH_3	C-1
23- CH_3	1.21, d, 6.3	1.14, d, 6.3	19.3	23	C-23
1'	4.63, s	4.45, s	98.5	2'	C-2',C-3', C-5'
2'	3.80, t, 3.1	3.52, t, 3.4	70.5	1', 2'-OH, 3'	C-3', C-4'
2'- OH		4.18, d, 5.1		2'	C1', C-2', C-3'
3'	3.44, dd, 9.4, 3.2	3.21, m	73.4	2', 3'-OH, 5'	C-3'
3'- OH		4.54, d, 6.0		3'	
4'	3.59, t, 9.5	3.27, m	66.6	3', 4'-OH, 5'	C-3'
4'- OH		4.69, d, 5.1		4'	C-1',C-3', C-5'
5'	3.21, ddd, 9.6, 5.2, 2.4	3.00, t, 7.0	77.0	4', 6'	
6'A	3.86, dd, 11.7, 2.4	3.65, m	61.0	5',6'B, 6'-OH	C-5'
6'B	3.74, dd 11.7, 5.2	3.45, m		5',6'A, 6'-OH	C-5'
6'- OH		4.26, t, 5.4		6'	C-5', C-6'

*: signal overlapping

Keterangan*: Sinyal ^{13}C NMR diperoleh dari data CH *direct* dan HMBC.

Isolat 8 pada spektrum HR-MS menunjukkan ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ di m/z 567,385 dalton (100) yang memprediksikan rumus molekul $\text{C}_{30}\text{H}_{56}\text{NaO}_8^+$ dengan BM senyawa 544,3867. Terlihat dari spektrum positif ESI-MS puncak dasar fragmen ion di m/z 383,350 $[\text{M}-(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)+\text{H}]^+$ (100) berasal dari aglikon glikosida, m/z 355.314 $[\text{M}-(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)-\text{CH}_2]_2^+$ juga teramati. Pada spektrum positif ESI-MS ini terdapat ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$ di m/z 567,389 (20), $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ di m/z 562,430 (30) dan sinyal pada m/z 539,348 yang merupakan fragmen ion $[(\text{M}+\text{Na}-(\text{CH}_2)_2]^+$ menunjukkan senyawa ini

mengandung struktur hidrokarbon alkana. Adanya struktur alkana pada aglikon diindikasikan juga oleh fragmen ion di m/z 355,314 (25) dari $[(\text{Aglikon})-(\text{CH}_2)_2]^+$. Sinyal pada m/z 365 (15) menunjukkan fragmen ion $[(\text{Aglikon})-(\text{H}_2\text{O})]^+$ dan m/z 323 (35) dari $[(\text{Aglikon})-(\text{CH}_3\text{COOH})]^+$ dan m/z 295 (12) dari $[(\text{Aglikon})-(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}]^+$.

^1H NMR isolat 8 menunjukkan puncak doublet proton metil (CH_3) di δ 1,14 ppm (d, $J = 6,3$ Hz) (dalam DMSO) dengan bilangan integrasi 3 (dalam MeOH di δ 1,15 ppm). Sinyal singlet proton metilen (CH_2) di δ 1,41 dengan bilangan integrasi 46 (dalam MeOH) menunjukkan akumulasi proton gugus metil dan metilen (dalam DMSO sinyal ini terlihat di δ 1,20 ppm (d, $J = 5,95$ Hz). Sinyal proton multiplet tampak pada δ 2,38 ppm dan 2,57 ppm (DMSO) (di δ 2,45 ppm dan 2,65 ppm dalam MeOH) dengan bilangan integrasi dua ditunjukkan oleh gugus metilen (CH_2) yang terletak di dekat gugus karbonil. Sinyal triplet proton metin yang mengikat O (gugus oksimetin atau CH-O) di δ 3,96 dan multiplet proton oksimetin yang lain di δ 4,78 ppm.

^{13}C NMR dari spektrum C-H direct, HMQC dan HMBC isolat 8 menunjukkan sinyal metil (CH_3) di δ 19,3 ppm, metilen di δ 26,8 - 28,5 ppm (akumulasi CH_2 -), metilen (CH_2) di δ 39,5 gugus oksimetin (CH-O) di δ 70,0 dan 73,7 ppm, karbonil (C=O) di δ 171,0 ppm.

Akumulasi sinyal C metilen (CH_2) di δ 26,8 -28,5 ppm dari spektrum C-H direct, HMQC dan HMBC menunjukkan koneksi dengan akumulasi proton metilen di δ 1,15 ppm. Ditinjau dari prediksi rumus molekul $\text{C}_{30}\text{H}_{56}\text{O}_8$, dikurangi 6 atom C dari unit heksosa, maka aglikon isolat 8 ini terdiri dari 24 atom C. Data ^1H dan ^{13}C NMR menunjukkan pada aglikon terdapat satu metil (CH_3 di 1,14 ppm/19,3 ppm), satu karbonil (C=O di 171,0 ppm), gugus oksimetin (CH-O di 3,96 ppm dan 4,78 ppm, δ 70,0 dan 73,7 ppm) dan metilen (CH_2 di δ 2,38 (A) dan 2,57(B), di δ 39,5 ppm) berarti sinyal akumulasi metilen tersebut berasal dari 19 gugus CH_2 .

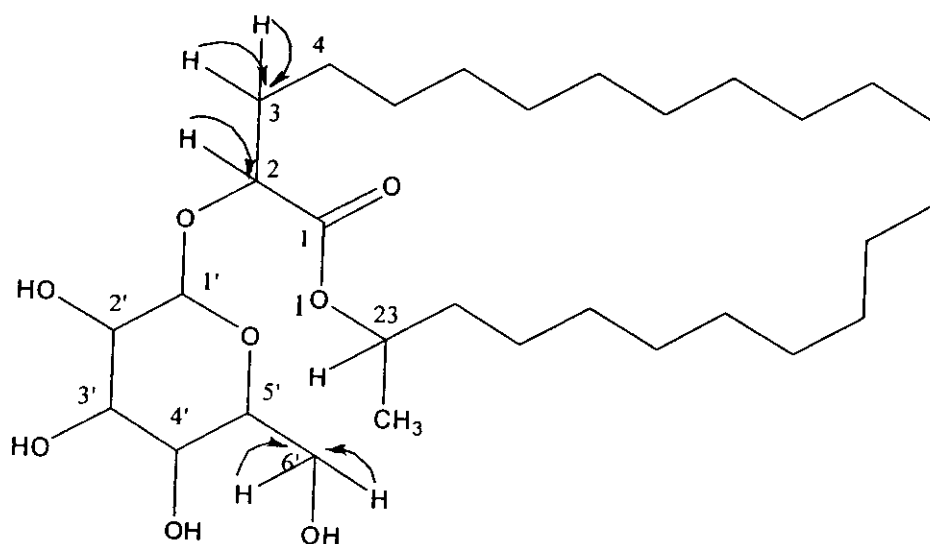
Posisi gugus karbonil (C=O) (δ 171,0 ppm) dikonfirmasi dari data HMBC menunjukkan koneksi dengan puncak proton δ 3,96 ppm (H3), δ 2,38 ppm (H2B), δ 2,57 ppm (H2A) dan δ 4,78 ppm (H23) dengan angka geseran kimia mirip α hidroksi lakton seperti yang dilaporkan Prestwich, (1982). Posisi sinyal proton C3 ini (3,96 ppm) dan

sinyal ^{13}C NMR-nya di 73,7 ppm dan C23 di 70,0 ppm dapat dianalogikan dengan posisi C3 dan Cw dari α hidroksi makrolida (Prestwich, 1982; 1981). Gugus metil (δ 1,14 ppm) terikat pada karbinil C23 (CH-O di δ 4,78 ppm, m) diindikasikan oleh korelasi puncak silang H-H COSY (Gambar 5.10), dengan demikian gugus metil tidak terdapat sebagai gugus terminal dari rangkaian metilen tetapi terikat pada C23 dan juga tidak adanya atom C alkena menunjukkan aglikon isolat 8 ini cincin makrosiklis (Prestwich, 1981, 1982). Spektrum HMBC mengkonfirmasi bahwa gugus metil terikat pada C-23. COSY dan HMBC menunjukkan korelasi H-3 (3,96 ppm) ke H2 (2,57 dan 2,38 ppm), C-1 (171,0 ppm) dan C-1' (98,5 ppm). Hal ini menunjukkan C-3 berada pada posisi β dari gugus karbonil (C-1) dan merupakan tempat terikatnya unit mannosil. Jadi aglikon isolat 8 ini adalah 23-metil-oksasiklotetrakontan-1-on.

Adanya satu gugus gula ditandai oleh sinyal satu proton anomerik di δ 4,45 ppm (H-1', s) dan C-1' (δ 98,5). Anomerik proton tampak sebagai doublet dengan δ 4,45 ppm, yang terletak antara 4,4 - 4,8 ppm menandakan posisi β sesuai Agrawal, (1992). Sinyal proton metin dan metilen nonanomerik dengan δ 3,0 - 4,2 ppm yaitu di 3,00; 3,21; 3,27; 3,45; 3,52; 3,65 mengindikasikan proton dari unit heksosa sesuai Agrawal, (1992). Hal ini diperkuat data spektrum C-H direct (C-H COSY) seperti terlihat pada Tabel 5.3. Proton-proton tersebut terikat pada karbon dengan harga geseran kimia yang sesuai untuk geseran kimia karbon unit heksosa, masing-masing di δ 98,5; 70,5; 73,4; 66,6; 77,0, dan 61,0 ppm. Resonansi atom C antara δ 60-85 ppm terlihat lima sinyal mengindikasikan monosakarida heksosa (Agrawal, 1992). Sinyal atom C anomerik isolat 8 ini terlihat jelas di δ 98,5 sesuai O-glikosida monosakarida yaitu antara δ 90 -112 ppm (Agrawal, 1992). Orientasi β dari mannosida dikonfirmasi dari pengamatan tetapan kopling H-1' ke H-2' yaitu ($J = 0-1$ Hz), sedang H-2' dan H-3' masing-masing dengan tetapan kopling $J=3,2$ Hz sesuai Agrawal (1992).

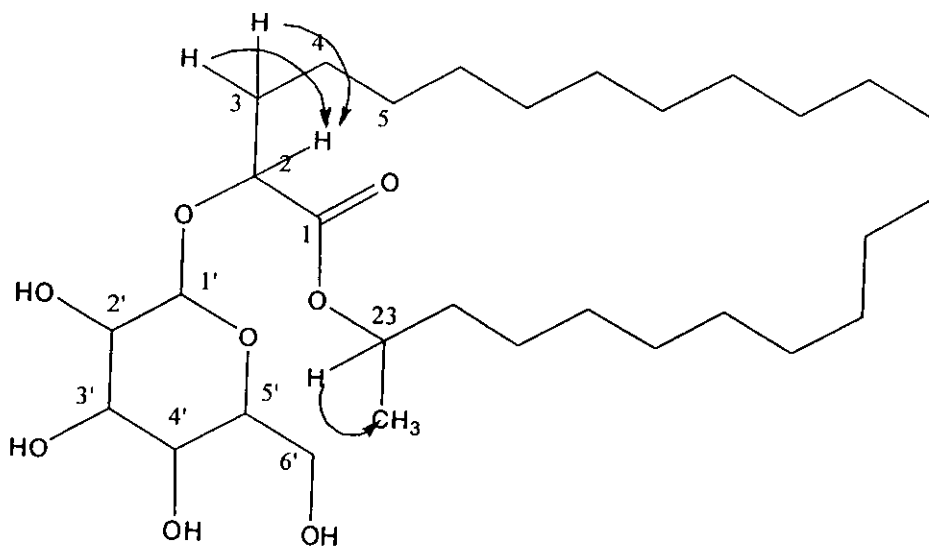
Berdasarkan data spektroskopi MS, 1D dan 2D NMR, isolat 8 dapat diidentifikasi sebagai 23-metil-3-(1-O-mannosil)-oksasiklotetrakosan-1-on.

Uji aktivitas antibakteri dan antifungi senyawa isolat 8 ini saat ini sedang dalam proses diteliti, ternyata aktif terhadap *Aspergillus fumigatus* dan *Candida krusei*.



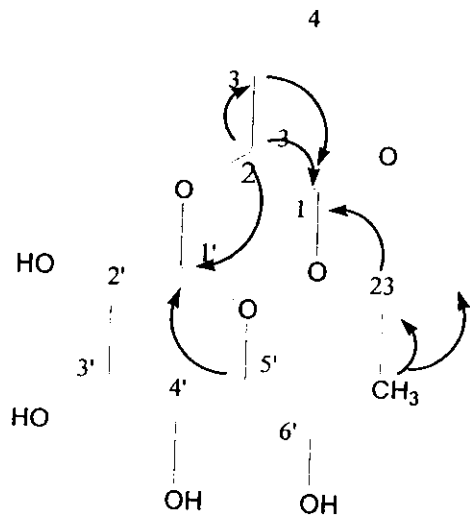
Gambar 5.1 Korelasi C-H COSY senyawa makrolakton-glikosida.

Korelasi H-H Cosy



Gambar 5.2 Korelasi H-H COSY senyawa makrolakton-glikosida.

Korelasi HMBC



Gambar 5.3 Korelasi HMBC senyawa makrolakton-glikosida.

BAB VI.

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

1. Ekstrak jamur endofit *Lecythophora* sp. 30.1 & 30.5 memiliki aktivitas biologis antibakteri dan antijamur.
2. Senyawa aktif yang berperan sebagai antibakteri dan antifungi dari jamur endofit tersebut diidentifikasi sebagai 5-hidroksi-2 (hidroksimetil)-4H-piran-4-on (asam kojat), p.hidroksi asam benzoat dan 5,8 ergosterol peroksida, sedang emodin dan 7-kloremodin sebagai antibakteri.
3. Berdasarkan hasil penelitian ini, disimpulkan isolat 8 adalah senyawa baru: 23-metil-3-(1-O-mannosil)-okasiklotetra-kosan-1-on yang ternyata aktif terhadap jamur *Aspergillus fumigatus* dan *Candida krusei*.

SARAN

1. Kemampuan *Lecythophora* sp. 30.1 dan 30.5 menghasilkan beragam metabolit berkhasiat diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai alternatif sumber bahan baku obat dan diuji juga aktivitas biologis yang lain, misalnya sebagai antikanker, antiviral, antimalaria dan sebagainya.
2. Senyawa baru 23-metil-3-(1-O-mannosil)-okasiklotetra-kosan-1-on perlu diteliti lebih lanjut aspek efektifitas dan keamanannya sebelum dapat digunakan sebagai bahan obat.
3. Jamur endofit lain yang telah berhasil diisolasi dari *Alyxia reinwardtii* BL memiliki peluang dan prospek untuk diteliti lebih lanjut dan dikembangkan sebagai sumber bahan obat berkhasiat antimikroba dan beragam aktivitas biologis yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A., Hakim, E.H., Makmur, L., Yuliawati, L.D., Syah, Y.M., 2003. Ilmu Kimia dari Keanekaragaman Hayati Indonesia, Simposium Nasional Kimia Bahan Alam XIII, Bandung.
- Agrawal, P.K., 1992. NMR Spectroscopy in The Structural Elucidation of Oligosaccharides and Glycosides. *Phytochemistry*, 31,10, 3307-3330.
- Anonim, 1995. *Farmakope Indonesia*, Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 855, 896-897.
- Bacon, C.W 1988. Procedure for Isolating the endophyte from *Tall fescue* and screening isolates for Ergot Alkaloids. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 11 p 2615-2618.
- Breitmaier E, and Voelter W. (1990) *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, VCH, New York, 3rd ed, USA pp. 247-263.
- Brunner, F. and Petrini, O., 1992. Taxonomy of some *Xylaria sp.* and Xylariceous Endophytes by Isozyme Electrophoresis. *Mycol. Res.* 96: 723 – 733.
- Choma, I., 2005. The Use of Thin-Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis.
<http://www.lcgceurope.com/lcgeurope/artikel,diakses> 23-12- 2007.
- Demain, A.L. and Solomon, N.A., 1986. *Manual of industrial microbiology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Doughari, J.H., 2006. Research Article Antimicrobial Activity of *Tamarandus indica* Linn. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 597-603
- Dreyfuss, M.E, Hoffman, H.H, Kobel, H, Pache, W, Tsecherter, H., 1986. Cyclosporin A and C: New Metabolites from *Trichoderma polysporum* (Link Experts) Rifai. *Appl. Environ. Microbiol.* 3, 125 – 133.
- Ebel R., 2003. Heinrich Heine Institute of Pharmaceutical Biology, University of Duesseldorf Germany. Personal communications.
- Harborne, JB, 1987, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Edisi kedua, Diterjemahkan: Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro, Penerbit ITB Bandung.

- Kitagawa I, Shibuya H, Beak NI, Yokokawa Y, Nitta A, Wiriadinata H, Yoshikawa M. (1988) Pulosarioside, a new bitter trimeric-iridoid diglucoside, from an Indonesian jamu the bark of *Alyxia reinwardtii* BL. Apocynaceae. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 36, 4232-4235.
- Marjorie, M.C. 1999. *Plant products as antimicrobial agents*. *Clinical Microbiology Review*, 12 (4). p.564-582
- Morris, K.N., 2001. Endophytic fungi offer several advantages to grasses. However advances in this field are hard to come maintenance good infection. <http://grounds-mag.com/ar/grounds>. Tgl diakses 23 Maret 2003
- Petrini, O., Sieber, T. N., Toti, L. and Viret, O., 1992. Ecology metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat. Toxins*, 1, 185 -196.
- Prestwich, G.D., 1981. Macrocyclic Lactones as the Defense Substance of the Termite Genus *Armitermes*. *Tetrahedron Lett.* 22, 46, 4587-4590.
- Prestwich, G.D., 1982. From Tetracycles To Macrocycles. *Tetrahedron* 38, 13, 1911-1919.
- Proksch, P., Edrada, R.A., and Ebel, R., 2003 a. Review: Drugs from the Sea – Opportunities and Obstacles. *Mar. Drugs* 1, 5-17.
- Proksch, P., Ebel, R., Edrada, R.A., Schupp, P., Lin, W.H., Sudarsono, Wray V., Steube, K., 2003 b. Detection of pharmacologically active natural products using ecology. Selected examples from Indopacific marine invertebrates and sponge-derived fungi. *Pure Appl. Chem.*, 75, 2-3, 343-352.
- Pulici, M., Sugawara, F., Koshino, H., Okada, G., Esumi, Y., Uzawa, J., Yoshida, S., 1997. Metabolites of *Pestalotiopsis* spp. Endophytic fungi of *Taxus braevifolia*, *Phytochemistry*, 46, 2, 313-319.
- Puri, S.P., Verma, V., Amna, T., Qazi, G.N., 2005. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces Camptothecin. *J. Nat. Prod.* Published on Web 00/00/0000 page est 2,6
- Puri, S.C., Nazir, A., Chawla, R., Arora, R., Hasan, S.R., Amna, T., Ahmed, B., Verma, V., Singh, S., Sagar, R., Sharma, A., Kumar, R., Sharma, R.K., Qazi, G.N., 2006.

- The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. *J. Biotechnol.*, 122, 494-510.
- Rayner ADM, 1991. The challenge of the individualistic mycelium. *Mycologia* 83: 48 – 71.
- Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A., 1988. Screening methods for Natural Products with Antimicrobial Activity: A Review of the Literature. *J. Ethnopharmacol.* 22, 127 – 149.
- Steffan, B., 2006. *Inhaltsstoffe aus Pflanzen der indonesischen Volksmedizin (Jamu): Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften.* Inaugural-Dissertation zue Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Stierle, A., and Strobel, G., 1995. The search for a Taxol producing microorganism among the endophytic fungi of the Pasific Yew, *Taxus brevifolia*. *J. Nat. Prod.* 58, 9, 1315-1324.
- Sugijanto, N. E., Diesel A., Ebel R., Indrayanto, G., Cholies, N., 2009, Chemical Constituents of the Endophytic Fungus *Lecythophora* sp. Isolated from *Alyxia reinwardtii*, *Natural Product Communications*, 4, 2009
- Strobel, G., and Daisy, B., 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 4, 491-502.
- Tan, R.X., and Zou, W.X., 2001, Endophytes a rich source of fungsional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18, 448 – 459.
- White, J.F., Reddy, P.V., Bacon, C.W., .2000. Biotrophic endophytes of grasses a systematic appraisal. In Bacon C.W., White J.F. Jr., (Eds) *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker, Inc. 49 - 62.
- Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrunsi, N., Meevootisom, V., 2004. Endophytic fungi with antimicrobial, anti cancer and anti malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 3, 265 - 272.

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

gunawanindrayanto@yahoo.com

Received: ; ; Accepted: xx,

A new macrolactone glycoside lecythomycin, 23-methyl-3-(1-O-mannosyl)-oxacyclotetra-cosan-1-one was isolated from the endophytic fungus *Lecythophora* sp. (code 30.1). The endophytic fungus was isolated from *Alyxia reinwardtii*. The structure of the new compound was elucidated on the basis of NMR and mass spectrometric data.

Keywords: *Lecythophora* sp, *Alyxia reinwardtii*, endophytic fungus, lecythomycin, macrolactone glycoside

Nowadays an increasing attention is being given to the endophytic fungi as sources of novel bioactive compounds [1-3]. The chemical constituents of endophytic fungus *Lecythophora* sp., which isolated from *Alyxia reinwardtii*, were reported recently [4].

This present work reported the isolation and structure elucidation of lecythomycin (**1**), a new macrolactone glycoside isolated from the endophytic fungus of *Lecythophora* sp. (Code 30.1).

HR-TOFMS of **1** exhibited a pseudo-molecular ions at m/z 567.385 $[M+Na]^+$ for the molecular formula $C_{30}H_{56}NaO_8^+$ (MW = 544); others ions 539.348 $[(M+Na)-(CH_2)_2]^+$, 383.350 $[M-(C_6H_{12}O_6)+H]^+$, and 355.314 $[M-(C_6H_{12}O_6)-CH_2]^+$ were also observed.

¹H NMR spectra (in DMSO-*d*₆ and MeOD) of **1** also indicated the presence of a hexose unit [5]. The presence of 4 hydroxyls group of the sugar was confirmed by ¹H NMR spectrum of **1** in MeOD. By careful analysis of ¹H coupling constants, COSY and comparing its ¹³C NMR spectrum with published data [6], the sugar was identified as mannose.

¹H NMR showed the accumulation protons of methylenes (1.20-1.60 ppm in DMSO-*d*₆, 1.30-1.60 in MeOD). ¹³C NMR of **1** confirmed the presence of 19 methylenes (20-40 ppm, C₄-C₂₂). ¹³C NMR of **1** also revealed a carbonyl (171.0 ppm), 2 oxymethines (70.0 ppm, C-23 and 73.7 ppm, C-3), and a methyl group (19.3 ppm). Based on the molecular formula of **1**, which has 3 double bonds equivalent, it can be concluded that **1** must be a lactone, and this confirmed by comparing with a hydroxyl macrocyclic ring [7]. Position of carbonyl (δ 171.0 ppm, C-1) was confirmed through HMBC which showed its connection to H at δ 3.96 ppm (H-3), δ 2.38 ppm (H-2B), δ 2.57 ppm (H2A) and δ 4.78 ppm (H-23). A high field doublet shift of a methyl group (1.14 ppm, $J=6.3$ Hz) was observed, this methyl group was coupled with proton H-23 (4.78 ppm, m). HMBC spectrum confirmed that the methyl group was attached to C-23. COSY and HMBC spectra showed correlations of H-3 (3.96 ppm) to H-2 (2.57 and 2.38 ppm), C-1 (171.0 ppm) and C-1' (98.5 ppm). This confirmed that C-3 should be located at β position of the carbonyl function (C-1), and the site of the attachment of the mannopyranosyl unit. The downfield shift of H-1' (δ 4.45) and of C-1' (δ 98.5)

confirmed the attachment of the mannopyranosyl unit [5]. The β -orientation of the mannoside linked was confirmed by the observation of the coupling constant of H-1' to H-2', which yielded very small value ($J=0.1$ Hz), whilst H-2' and H-3' was coupled each other ($J=3.2$ Hz) [5].

Based on these spectroscopic data (MS and 1D and 2D NMR) **1** can be identified as 23-methyl-3-(1-O- β -D-mannosyl)-oxacyclotetracosan-1-one. We are now in progress to determine the bioactivity of **1**.

Experimental

General: NMR spectra were recorded on Bruker AVANCE DMX 600 and ARX 500 spectrometers. HRMS was measured on a Micromass QTOF mass spectrometer. LC-MS was measured on a ThermoFinnigan LCQ Deca mass spectrometer, coupled to an Agilent 1100 HPLC system.

Materials: All solvents used for extraction and chromatographic purifications were of analytical-reagent grade (Mallinckrodt Baker Inc. Philipsburg, NJ, USA), Chloroform analytical grade, Pre-coated TLC plates *Silicagel* 60 F₂₅₄, RP-18 and *Silicagel* 60 G for column chromatography (E. Merck, Darmstadt, Germany).

Cultivation of the endophytic fungi: The fungus *Lycythophora* sp. Code 30.1 code 30.1 was cultivated as described before [4].

Isolation: Mycelia of fungus *Lycythophora* sp. Code 30.1 (66.75 g), which collected from 800 Erlenmeyer flasks extracted with MeOH then partitioning with *n*-hexane-water yielded of 2.888 g *n*-hexane extract. The *n*-hexane extract (2.3 g) was subjected to repeated chromatographic purifications (CC, silica, *n*-hexane : EtOAc: 8:2; 6:4; 2:8; EtOAc 100%, EtOAc: MeOH 9:1; 8:2; 5:5) produced yielded 14 fractions. Fraction 13 was purified by using preparative by TLC three times (Silica gel F₂₅₄, *n*-hexane: EtOAc (1:4) followed CH₂Cl₂:MeOH : 9:1 ($R_f = 0.5$); then using RP-18's plates, and ACN:MeOH:H₂O: 2:1:1 as mobile phase ($R_f = 0.12$), yielded compound **1** (4.3 mg). The chemical constituents of the other fractions were already reported previously [4].

Lecythomycin (1)

White powder

¹H NMR-¹³C NMR: Table 1

HRTOFMS pos: [M+Na]⁺ calcd for C₃₀H₅₆NaO₈: 567.3850, found: 567.3687, 562.430 [M+NH₄]⁺

Acknowledgments.

We thanks the Directorate General of Higher Education, Ministry of National Education, Indonesia for financial support via Hibah Penelitian Strategis Nasional 2009-2010, Dr. Victor Wray (GBF, Braunschweig) for his MS and NMR measurements,

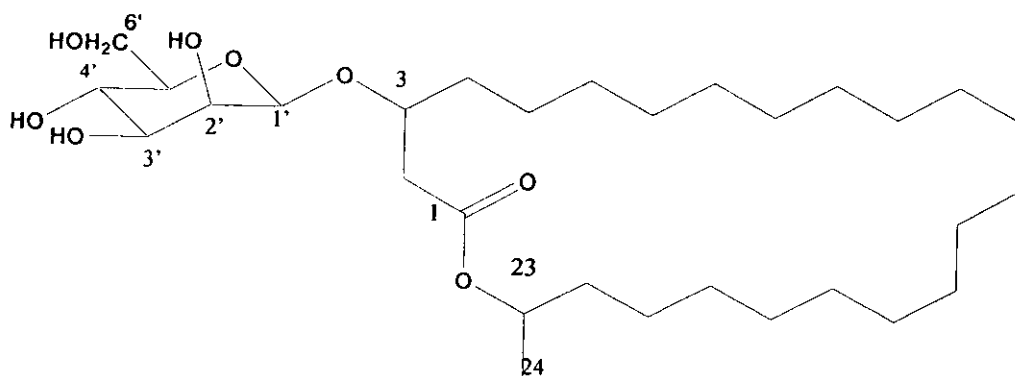


Fig 1. Chemical structure of compound **1** (lecythomycin)

Tabel 1: ¹H and ¹³C NMR chemical shift data for compound 1

C no	$\delta^1\text{H}$ (ppm), mult. J (Hz) (MeOD)	$\Delta^1\text{H}$ (ppm), mult. J (Hz) (DMSO-d ₆)	¹³ C ppm*	COSY	HMBC
1			171.0		
2A	2.61, dd, 14.8, 6.0	2.57, m	39.5	3, 2B	C-1, C-3
2B	2.50, dd, 14.8, 5.7	2.38, m		3, 2A	C-1, C-3
3	4.13, t, 6.0	3.96, t, 6.0	73.7	2A, 2B	C-1, C-2, C-1'
4-22-CH ₂	1.3 - 1.6*	1.20 - 1.60*	20 - 40		
23	4.8*	4.78, m	70.0	23-CH ₃	C-1
23-CH ₃	1.21, d, 6.3	1.14, d, 6.3	19.3	23	C-23
1'	4.63, s	4.45, s	98.5	2'	C-2', C-3', C-5'
2'	3.80, t, 3.1	3.52, t, 3.4	70.5	1', 2'-OH, 3'	C-3', C-4'
2'-OH		4.18, d, 5.1		2'	C1', C-2', C-3'
3'	3.44, dd, 9.4, 3.2	3.21, m	73.4	2', 3'-OH, 5'	C-3'
3'-OH		4.54, d, 6.0		3'	
4'	3.59, t, 9.5	3.27, m	66.6	3', 4'-OH, 5'	C-3'
4'-OH		4.69, d, 5.1		4'	C-1', C-3', C-5'
5'	3.21, ddd, 9.6, 5.2, 2.4	3.00, t, 7.0	77.0	4', 6'	
6'A	3.86, dd, 11.7, 2.4	3.65, m	61.0	5', 6'B, 6'-OH	C-5'
6'B	3.74, dd 11.7, 5.2	3.45, m		5', 6'A, 6'-OH	C-5'
6'-OH		4.26, t, 5.4		6'	C-5', C-6'

*: signal overlapping

References

- [1] Tan RX, and Zou WX. (2001) Endophytes a rich source of fungsional metabolites. *Natural Product Report*, **18**, 448 – 459.
- [2] Strobel G, and Daisy B. (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**, 491-502.
- [3] Gunatilaka LAA. (2006) Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*, **69**, 509-526.
- [4] Sugijanto NE, Diesel A, Ebel R, Indrayanto G, Zaini A. (2009) Chemical constituents of the endophytic fungus *Lecythophora* sp. isolated from *Alyxia reinwardtii*". *Natural Product Communications*, **4**, 1485-1488.
- [5] Agrawal PK. (1992) NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*. **31**, 3307-3330.
- [6] Breitmaier E, and Voelter W. (1990) *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, VCH, New York, 3rd ed, USA pp. 247-263.
- [7] Prestwich GD. (1982) From tetracycles to macrocycles. *Tetrahedron*, **38**, 1911-1919.