

Kesehatan, penyakit tropis, gizi & obat-obatan
Bidang Ilmu: Mikrobiologi Farmasi

**LAPORAN HASIL
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
TAHUN ANGGARAN 2012**



**PRODUKSI ANTIBIOTIKA BARU DARI
JAMUR ENDOFIT TUMBUHAN
AGLAIA ODORATA LOUR
*CLADOSPORIUM OXYSPORUM***

Peneliti

**Prof. Dr. Noor Erma N. Sugijanto
Prof. Dr. Gunawan Indrayanto
Prof. Dr. Noor Cholies Zaini**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga sesuai dengan
Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Tahun Anggaran 2012 Nomor 2613/H3/KR/2012, Tgl 9 Maret 2012**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
2012**

i

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian :Produksi antibiotika baru dari jamur endofit tumbuhan *Aglaia odorata* Lour *Cladosporium oxysporum*

2. Ketua Peneliti

a. Nama lengkap : Prof. Dr. Noor Erma N. Sugijanto, MS
 b. Jenis Kelamin : Perempuan
 c. NIP : 1952 11 28 1980 02 2001
 d. Pangkat/Golongan : Pembina Utama Madya/ IV d
 e. Jabatan Fungsional : Guru Besar
 f. Bidang Keahlian : Kimia Farmasi / Mikrobiologi Farmasi
 g. Fakultas/Jurusan/Puslit : Farmasi UNAIR/Kimia Farmasi
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti :

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

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian:

a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 2 Tahun
 b. Biaya yang diusulkan : Rp. 120.000.000
 c. Biaya yang disetujui tahun 2012 : Rp. 60.000.000

Surabaya, 30 Oktober 2012

Ketua Peneliti,

Mengetahui,
 Dekan Fakultas Farmasi

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

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

Menyetujui,
 Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat



(Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi.)
 NIP: 195908051987011001

RINGKASAN

Jamur endofit berpotensi ekonomi penting di masa depan sebagai sumber bahan baku obat, antibiotika, enzim, insektisida dan hormon pertumbuhan tanaman (Pimentel *et al.*, 2010, Strobel and Daisy, 2003). *Cladosporium oxysporum* yang diisolasi dari *Aglaia odorata* Lour pada penelitian awal ekstrak etil asetatnya menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. Mendesaknya kebutuhan memperoleh senyawa antimikroba baru untuk mengatasi resistensi kuman patogen berbagai penyakit infeksi khususnya yang berkembang di daerah tropis dan adanya jamur endofit yang mampu menghasilkan metabolit berkhasiat antimikroba maka penelitian mendapatkan senyawa anti mikroba baru dari endofit *Cladosporium oxysporum* perlu dilakukan.

Tujuan penelitian tahun pertama mendapatkan fraksi aktif dari ekstrak etil asetat *Cladosporium oxysporum* yang berkhasiat antimikroba dan untuk tahun ke-dua mendapatkan struktur kimia senyawa aktif tersebut melalui pemurnian dan elusidasi struktur. Tujuan jangka panjangnya memperoleh temuan antimikroba baru yang poten berkhasiat dan aman sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat dan dipatenkan.

Endofit dikultivasi *in-vitro*, metabolitnya diekstraksi dan difraksinasi. Fraksi-fraksi diuji aktivitas antimikrobanya. Fraksi aktif dipisahkan dan dimurnikan hingga diperoleh senyawa tunggal. Isolat metabolit dilakukan karakterisasi dan elusidasi struktur menggunakan spektroskopi NMR dan MS.

Prospek ekonomi penelitian ini diharapkan diperoleh metabolit sekunder yang berkhasiat antimikroba dan metode produksinya dari jamur endofit yang dapat dipatenkan.

Kata kunci: Antimikroba, endofit, *Cladosporium oxysporum*, *Aglaia odorata*

SUMMARY

Endophytic fungi are one of the potential resources that likely have several economically important applications in the future for production of enzymes, medicines and biological control agents (Pimentel *et al.*, 2010, Strobel and Daisy, 2003). Extract etil acetate *Cladosporium oxysporum* which was isolated from *Aglaia odorata* Lour shown antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*.

Bacterial and viral drug resistance and the spread of fungal diseases necessitate the search for additional antibiotic compounds with activity at low concentrations and with reasonably low toxicity to human. There appears to be a higher probability of discovering bioactive compounds from endophytic fungi *Cladosporium oxysporum*. First year, the aim of this research are to identify the active antimicrobial fractions and then for the second year are to isolate and elucidation of chemical constituents especially focused on the antimicrobial agent from the metabolites endophytic fungi *Cladosporium oxysporum*. The main goals of this research are discovering new antimicrobial drugs which activity at low concentrations, effective and safe then it can be patented.

Endophytic fungi *Cladosporium oxysporum* were cultivated, extracted and fractionated. The fractions then applied to antimicrobial activity assay. Active fractions were purified and isolation of active compounds should be performed. The structures of the compounds were determined by mass spectrometry in combination with several NMR spectroscopic techniques and MS.

The discovery of endophytic fungi which produces biologically active compounds derived of the host plant is significant because it apparently offers an environmentally sound, reproducible, relatively simple and inexpensive way to produce commercial quantities of the drug and it can be patented.

Keywords: Endophytic fungi, *Aglaia odorata* Lour, *Cladosporium oxysporum*, antimicrobial activity

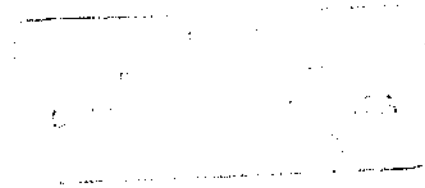
PRAKATA

Puji syukur Ahamdulillah saya panjatkan ke hadirat Allah swt karena atas perkenan dan rahmat yang dilimpahkan-Nya maka penyusunan laporan penelitian Riset Unggulan Perguruan Tinggi Universitas Airlangga, yang berjudul **Produksi Antibiotika Baru dari Jamur Endofit Tumbuhan *Aglaia odorata* dan *Lour Cladosporium oxysporum*** dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini saya menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Direktur Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (DP2M), Dirjen Dikti Depdiknas yang telah mendanai penelitian ini. Terima kasih kami sampaikan pula kepada Rektor Universitas Airlangga dan Dekan Fakultas Farmasi UNAIR yang telah memberikan fasilitas untuk menunjang keberhasilan penelitian ini. Demikian pula kepada berbagai pihak yang telah membantu dengan ketulusan hati selama pelaksanaan dan penyusunan laporan penelitian ini disampaikan terima kasih.

Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan serta dapat dilanjutkan bagi peningkatan daya saing menuju kemandirian nusa dan bangsa.

Tim Peneliti



DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR SINGKATAN	viii
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	12
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	21
DAFTAR PUSTAKA	22
 LAMPIRAN	
B. ARTIKEL ILMIAH	1
C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN	12

DAFTAR TABEL

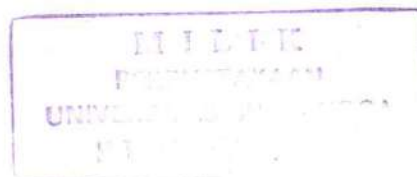
Tabel 1. Resume hasil uji antimikroba fraksi-fraksi ekstrak etil asetat <i>C. oxysporum</i>	13
Tabel 2. Hasil uji antimikroba fraksi-fraksi ekstrak etil asetat <i>C. oxysporum</i> terhadap <i>E. coli</i> ATCC 8739	14
Tabel 3. Aktivitas antimikroba fraksi-fraksi ekstrak etil asetat <i>C. oxysporum</i> terhadap <i>Staphylococcus. aureus</i> ATCC 6538	16
Tabel 4. Aktivitas antimikroba fraksi-fraksi ekstrak etilasetat <i>C. oxysporum</i> terhadap <i>C.albicans</i> ATCC 10231.	18

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Hasil analisis KLT fraksi-fraksi dari ekstrak etil asetat <i>Cladosporium oxysporum</i> .	12
Gambar 2. Hasil pengamatan aktivitas antimikroba fraksi-fraksi <i>Cladosporium oxysporum</i> terhadap <i>E.coli</i> ATCC 8739	15
Gambar 3. Hasil pengamatan aktivitas antimikroba fraksi-fraksi <i>Cladosporium oxysporum</i> terhadap <i>S.aureus</i> ATCC 6538.	17
Gambar 4. Hasil pengamatan aktivitas antimikroba fraksi-fraksi <i>Cladosporium oxysporum</i> terhadap <i>C. albicans</i> ATCC 10231	19

DAFTAR SINGKATAN

ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
CHCl ₃	: Kloroform
cm	: centimeter
dll	: dan lain-lain
DMSO	: Dimetil Sulfoksida
EtOAc	: Etil Asetat
KHM	: Konsentrasi Hambat Minimal
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
L	: Liter
LAFC	: <i>Laminair Air Flow Cabinet</i>
m	: meter
MeOH	: Metanol
mg	: miligram
MIC	: <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
mL	: milliliter
mm	: millimeter
nm	: nanometer
NS	: Normal Salin
p.a	: pro analisis
ppm	: <i>part per million</i>
Rf	: <i>Retardation factor</i>
RSD	: Relatif Standar Deviasi
SD	: Standar Deviasi
T	: Transmitan
UV	: Ultra Violet
μL	: mikroliter
μm	: mikrometer



BAB I

PENDAHULUAN

1. Latar Belakang Masalah

Antimikroba baru sangat diperlukan untuk terapi beragam penyakit infeksi pada manusia, hewan dan agroindustri, mengingat telah terjadi resistensi pada beragam mikroba penyebab penyakit misalnya tbc dan kuman resisten metisilin. Penggunaan bahan alam khususnya tanaman untuk obat telah dikenal sejak ribuan tahun lalu, hingga kini tanaman masih berperan penting pada penemuan obat baru selain mikroba dan organisme laut (Proksch *et al.*, 2003 a). Salah satu sumber utama metabolit berkhasiat obat adalah jamur. Penemuan penisilin streptomisin dan berbagai antibiotika lain membuka jalan untuk mengeksplorasi metabolit berkhasiat dari jamur (Proksch *et al.*, 2003 b).

Mikroba endofit dapat berupa bakteri, Actinomycetes dan jamur yang hidup *inter* dan *intra*-seluler di dalam jaringan tanaman sehat (Tan and Zou, 2001). Jamur endofit lebih sering diisolasi dari pada bakteri (Strobel & Daisy, 2003). Endofit meningkatkan daya adaptasi tanaman inang terhadap stres lingkungan, daya tahan terhadap bakteri dan jamur patogen, herbivora, hama nematoda, mamalia dan serangga (White *et al.*, 2000). Berbagai antibiotika baru dihasilkan fungi endofit, a.l. penisilin N, sporiofungin A, B, C, dari endofit *Pterophomopsis* sp. dan *Cryptosporiopsis* sp. dari tanaman *Cardamin heptahylla* juga sordaricin, mellisol dan echinomisin. Brefeldin A didapat dari *Cladosporium* sp. yang ada di *Quercus variabilis* (Pimentel *et al.*, 2010).

Sumber daya hayati Indonesia, khususnya mikroba belum banyak diteliti dan dimanfaatkan, padahal potensinya sebagai sumber bahan aktif dan senyawa berharga ("novel substances") sangatlah besar. Beberapa metabolit yang dihasilkan endofit menunjukkan aktifitas sebagai antibakteri, antifungi, hormon pertumbuhan tanaman, insektisida, immunosupresan, dan sebagainya (Pimentel *et al.*, 2010; Tan and Zou, 2001). Arti penting kemampuan endofit

dalam memproduksi bahan obat merupakan terobosan baru sebagai alternatif memenuhi kebutuhan yang meningkat seiring dengan meningkatnya populasi dengan tetap melestarikan ekosistem. Produksi melalui fermentasi mikroba endofit ini mempunyai keuntungan dapat dilakukan secara reproduibel, kemampuannya dapat ditingkatkan dan dapat diproduksi secara tidak terbatas dalam skala industri, dengan rekayasa genetika dan dengan kondisi kultivasi yang berbeda dapat dihasilkan produk yang berbeda (Stierle and Strobel, 1995).

Aglaia odorata digunakan sebagai obat tradisional di Indonesia untuk mengatasi perut kembung, sukar menelan, batuk, pusing, memar, bisul, mengurangi darah haid yang banyak, bau badan dan diare (Hariana, 2005). *Cladosporium oxysporum* yang diisolasi dari *Aglaia odorata* Lour (Sugijanto, 2005) pada penelitian awal ekstrak etil asetatnya menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. Mendesaknya kebutuhan memperoleh senyawa antimikroba baru untuk mengatasi resistensi kuman patogen dan di sisi lain adanya jamur endofit *Cladosporium* yang mampu menghasilkan metabolit berkhasiat antimikroba maka penelitian untuk mendapatkan senyawa anti mikroba baru dari endofit *Cladosporium oxysporum* perlu dilakukan.

Tujuan penelitian pada tahun pertama mendapatkan fraksi aktif dari ekstrak etil asetat *Cladosporium oxysporum* yang berkhasiat antimikroba dan untuk tahun ke-dua mendapatkan struktur kimia senyawa aktif tersebut melalui pemurnian dan elusidasi stuktur. Tujuan jangka panjangnya diharapkan diperoleh temuan antimikroba baru yang poten, berkhasiat dan aman yang dihasilkan jamur endofit *Cladosporium oxysporum* dari tumbuhan *Aglaia odorata* Lour. sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat dan dipatenkan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang jamur endofit dan metabolitnya

Mikroba endofit dapat berupa bakteri, termasuk Actinomycetes dan jamur yang hidup *inter* dan *intra*-seluler di dalam jaringan tanaman sehat. Hampir semua tanaman yang memiliki jaringan pengangkutan diketahui mengandung bakteri dan atau jamur endofit (Tan and Zou, 2001).

Indonesia sangat kaya sumber daya alam hayati, laut dan terrestrial, dengan keanekaragaman yang tinggi oleh karena variasi kondisi lingkungan di berbagai wilayah negeri ini. Indonesia memiliki lebih dari 30.000 spesies tumbuhan terrestrial tingkat tinggi, beberapa diantaranya merupakan tumbuhan penting yang digunakan sebagai bahan obat tradisional Indonesia (Achmad, 2003). Hal ini merupakan sumbangan yang sangat berarti bagi kemanusiaan dan ilmu pengetahuan, apabila sumber hayati tersebut dikembangkan dan ditingkatkan nilai tambahnya sebagai bahan obat yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah melalui penelitian. 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, stereroid, terpenoid dan terpen, quinon, flavon dan flavonoid, peptide, phenylpropanoid, phenol dan senyawa lain (Pimentel *et al.*, 2010). 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*. 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. Melalui fermentasi jamur endofit dapat dihasilkan metabolit seperti inangnya misalnya Taxol (obat kanker dari *T. brevifolia*) dan camptothecin (bahan baku anti kanker) dari jamur endofit tumbuhan *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, a.l phomopsikalasin suatu sitokalsin 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).

Brunner dan Petrini (1992) melaporkan 75% fungi endofit dari 80 jenis yang diteliti menghasilkan antibiotika. 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 menghasilkan antibiotika jenis baru dari kelompok sitokalsin (Dreyfuss, 1986). Jamur endofit dilaporkan juga dapat menghasilkan siklosporin A yang berpotensi sebagai antifungi dan bahan immunosupresif (Tan and Zou, 2001)..

Pada tanaman obat yang digunakan masyarakat tradisional secara turun temurun ditemukan endofit yang mampu menghasilkan antibiotika seperti *Kennedia nigricans*, tanaman obat suku Aborigin ditemukan endofit *Streptomyces munumbi* yang menghasilkan munumbicin A, B, C, D.yang aktif sebagai anti bakteri terhadap anthrax, tbc, anti jamur, anti malaria dan antikanker. (Strobel and Daisy, 2003). Wiyakrutta dari Thailand melaporkan dari 81 tanaman obat yang diisolasi jamur endofitnya beberapa menunjukkan hasil

positip saat diuji aktivitasnya terhadap bakteri tbc, *Plasmodium falciparum* dan antiviral terhadap virus *Herpes simplex* dan antikanker (Wiyakrutta, 2004).

2.2 Tinjauan tentang *Aglaiia odorata* Lour

Aglaiia odorata Lour, Meliaceae merupakan salah satu komponen dalam ramuan obat tradisional Indonesia. *Aglaiia odorata* Lour memiliki kandungan minyak atsiri, alkaloid, damar, mineral dan tanin. Pemanfaatannya, untuk mengobati perut kembung, sulit menelan, batuk, pusing dan mempercepat persalinan. Daunnya dapat digunakan mengobati memar, bisul, diare, bau badan dan perdarahan haid pada wanita (Hariana, 2005).

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). Pada metode difusi, sampel 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 sampel 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.

2.4. STUDI PENDAHULUAN YANG SUDAH DILAKSANAKAN

Aglaiia odorata Lour mengandung beragam jamur endofit (Sugijanto *et al.*, 2003). Hasil determinasi endofitnya antara lain diketahui sebagai *Cladosporium oxysporum* dan *Aspergillus penicilloides* (Sugijanto *et al.*, 2003).

Uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat dari enam jenis endofit dari *Aglaia odorata* Lour dilakukan terhadap lima mikroba uji, menunjukkan hasil positif (Hakim *et al.*, 2009). Senyawa brefeldin A, metabolit yang diisolasi dari *Cladosporium* sp. endofit yang hidup dalam *Quercus variabilis* diketahui aktif sebagai antibakteri (Pimentel *et al.*, 2010). Temuan dari berbagai penelitian tersebut membuka kemungkinan jamur endofit sebagai sumber alternatif metabolit yang berkhasiat antimikroba yang poten, berkhasiat dan aman.

Relatif masih minimnya penelitian tentang jamur endofit di Indonesia, khususnya dari tanaman obat asli Indonesia seperti *Aglaia odorata* maka hal ini penting untuk diteliti dan dikaji lebih lanjut metabolit yang dihasilkan dan aktivitas antimikrobanya.

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 TUJUAN PENELITIAN

1. Tahun pertama mendapatkan fraksi aktif dari ekstrak etil asetat *Cladosporium oxysporum* yang berkhasiat antimikroba.
2. Tahun ke-dua mendapatkan struktur kimia senyawa aktif berkhasiat antimikroba yang dihasilkan jamur endofit *Cladosporium oxysporum* dari tumbuhan *Aglaia odorata* Lour melalui pemurnian dan elusidasi stuktur.

3.2 MANFAAT PENELITIAN

Antimikroba baru sangat diperlukan untuk terapi beragam penyakit infeksi pada manusia, hewan dan agroindustri, mengingat telah terjadi resistensi pada beragam mikroba penyebab penyakit misalnya tbc. Jamur endofit berpotensi ekonomi penting sebagai sumber bahan baku obat khususnya antimikroba. Diharapkan dari penelitian yang dilakukan, dapat diisolasi berbagai senyawa berkhasiat antimikroba dari endofit *Cladosporium oxysporum* yang diisolasi dari tumbuhan *Aglaia odorata* Lour.

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

Bagian-bagian dari penelitian ini dapat dipublikasikan di Jurnal Nasional Terakreditasi dan atau Jurnal Internasional mengingat di dunia internasional penelitian tentang jamur endofit ini mendapat perhatian besar dari para peneliti.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan penelitian

Tumbuhan inang diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur pada bulan April 2003, dan telah diidentifikasi sebagai *Aglaia odorata* oleh LIPI-Kebun Raya Purwodadi. Jamur endofit *Cladosporium oxysporum* diisolasi dari *Aglaia odorata* menurut prosedur Sugijanto *et al.*, 2009 dan diidentifikasi oleh Dr. Arnulf Diesel dari Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Düsseldorf dengan kode jamur AGO A.

4.2 Bahan Media

Agar (food grade), Malt extract (E. Merck), Saboroud 2% dextrose broth (Oxoid, CMI), Potatoes Dextrose Agar (Difco), Nutrient broth (Oxoid, CMI).

4.3 Bahan Kimia

NaCl (p.a., E. Merck), etil asetat, heksan dan metanol (p.a., Mallinckrodt Baker Inc. Philipsburg, NJ), pelat KLT Silicagel 60 F₂₅₄, Silicagel 60 G for column chromatography (E. Merck). Streptomisin sulfat (pharmaceutical grade, PT Meiji Indonesia) dan ketokonazol (pharmaceutical grade, P.T.Bernofarm, Surabaya).

Mikroba uji: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram positif), *Escherichia coli* ATCC 8739 (Gram negative) dan jamur *Candida albicans* ATCC 10231 diperoleh dari P.T. Otsuka. Bakteri uji diidentifikasi dengan pewarnaan Gram dan Lactofenol Cotton Blue untuk *C. albicans* sebelum digunakan.

4.4 Alat

Autoclave (Huxley HL-340 Speedy), Laminair Air Flow Cabinet (Dalton), timbangan analitik (Mettler Toledo AB 204-s), pH-meter (Fischer Accumet-

230A), chamber kromatografi (Camag), Lampu UV, Spektrofotometer UV-Vis (Lambda EZ 201-Perkin Elmer) dan Hitachi F-4000.

4.5 Tahapan penelitian

Dalam penelitian ini dilakukan tahapan sebagai berikut:

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

4.5.1. Kultivasi jamur endofit *Cladosporium oxysporum*

Jamur endofit *Cladosporium oxysporum* dipelihara sebagai kultur induk dalam media Potatoes Dextrose Agar dan diinokulasikan sebagai inokulum pada umur tujuh hari di media cair. Jamur endofit *Cladosporium oxysporum* ditumbuhkan dalam Erlenmeyer 300 ml, yang mengandung 40 ml media cair Malt extract (15 gram/liter) pH 5,6, pada suhu kamar selama 4 minggu. Kultivasi massal dilakukan untuk mendapatkan sampel yang cukup bagi uji aktivitas antimikroba maupun isolasi, pemurnian dan elusidasi struktur kimianya.

4.5.2. Ekstraksi metabolit sekunder

Kultur dipanen, miselia dan cairan kultur diekstraksi dengan etil asetat setengah volumenya, diultrasonikasi lima belas menit dan dikocok dengan shaker selama satu jam. Ekstraksi ini diulang minimal 3 kali. Ekstrak etil asetat dipisahkan dengan *vacuum rotavapor* pada suhu 40-50 °C dikeringkan di lemari asam hingga didapatkan ekstrak kental dan disimpan di lemari es.

4.5.3. Fraksinasi metabolit sekunder

Ditimbang \pm 200 gram *Silica gel 60 for column chromatography* dengan ukuran 60 – 230 mesh, untuk pembuatan kolom. Tabung kromatografi kolom

dengan panjang 75 cm dan diameter 3,5 cm, diisi fase diam yang dibuat dari *Silica gel 60 for column chromatography* ditambah *n*-heksan 400 mL yang dicampur menjadi suspensi sambil diaduk (*slurry*). Fase diam yang digunakan setinggi $\pm 61,5$ cm. Ekstrak etil asetat (± 3 gram) diberi etil asetat sampai terbasahi, kemudian dikeringkan dengan *Silica gel 60 for column chromatography* dua kali berat ekstrak dan diaduk hingga homogen, kemudian dituang ke bagian atas kolom secara merata. Selanjutnya dilakukan eluasi dengan *n*-heksan 100%. Cairan yang menetes dari kolom kromatografi diatur kecepatannya dan ditampung sebanyak 25 ml dalam vial yang masing-masing telah diberi tanda. Eluasi dilanjutkan dengan pelarut pengembang *n*-heksan : etil asetat (1:1) (v/v); *n*-heksan : etil asetat (1:9) (v/v) hingga etil asetat 100%, kemudian dilanjutkan dengan etil asetat : metanol (9:1) (v/v) dengan gradien 10% hingga metanol 100%. Hasil pemisahan ditampung dalam vial. Setiap 5 vial dan kelipatannya dianalisis dengan KLT menggunakan pelat *Silica gel 60 F₂₅₄* dengan penampak noda UV dan anisaldehyd-asam sulfat. Hasil KLT yang menunjukkan warna noda dan Rf sama digabung menjadi satu fraksi kemudian diuapkan dan terhadap fraksi tersebut dilakukan uji aktivitas antimikroba.

4.5.4. Uji aktivitas antibakteri dan antifungi

Skrining aktivitas antimikroba dilakukan menggunakan metode difusi cakram (*disc diffusion methode*) menurut Doughari, 2006. Mikroba uji digunakan *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli*, dan *Candida albicans* yang mewakili bakteri Gram positif dan negatif serta jamur. Bakteri uji dibiakkan dengan cara, diambil 1 \bar{O} se dimasukkan media Nutrient Broth (28 gram dalam 1 liter dapar fosfat pH 7,0) sedangkan untuk jamur dalam media Sabouroud Glukosa agar (Neopepton 10 gram, glukosa 40 gram dan serbuk agar 15 gram dalam 1 liter air suling).

Bakteri uji yang berumur 24 – 48 jam disiapkan dengan menambahkan 10 mL larutan NaCl 0,9% steril ke dalam tabung mikroba uji, dihomogenkan dengan vortex sampai didapat suspensi homogen, diukur kekeruhannya dengan

spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm. NaCl 0,9% sebagai blanko, jika diperlukan diencerkan dengan NaCl steril sampai dicapai transmittan 25 % (Anonim, 1995). Jamur uji disiapkan dengan cara satu Ose jamur dimasukkan tabung berisi 10 mL air suling steril lalu disentrifuge selanjutnya diencerkan hingga diperoleh suspensi dengan transmittan 90 % dibandingkan terhadap blanko air suling steril pada panjang gelombang 540 nm.

Dibuat larutan uji dari setiap fraksi yang sudah diketahui beratnya, dilarutkan dalam etil asetat sejumlah tertentu, diultrasonik hingga larut dan diperoleh larutan uji dengan kadar 100.000 ppm. Larutan fraksi uji sebanyak 20 μL di teteskan ke cakram kertas (*disc*), yang setara dengan 2 mg/cakram (Doughari, 2006). Sebanyak 20 μL larutan streptomisin sulfat 100 ppm di teteskan ke cakram sebagai kontrol positif untuk antibakteri, 20 μL larutan ketokonazol 2000 ppm untuk antijamur dan 20 μL etil asetat sebagai kontrol negatif. Suspensi mikroba uji (10 μL untuk *C. albicans*, *S. aureus* dan *E. coli*) ditambahkan ke 15,0 ml media steril yang dicairkan (suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$), dihomogenkan dengan vortex, dituang segera ke cawan petri dan didiamkan hingga memadat. Cawan petri yang telah berisi media dan mikroba uji ditambahkan cakram kertas yang masing-masing sudah berisi larutan uji dan kontrol positif dan negatif. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C (bakteri) / 32°C (jamur) selama 24 – 48 jam. Setelah 24 – 48 jam. Zona jernih (diameter daya hambat) yang terbentuk diukur dengan jangka sorong. Replikasi dilakukan tiga kali untuk masing-masing fraksi dan mikroba uji. Fraksi yang aktif selanjutnya dimurnikan dengan kromatografi kolom dan KLT preparatif.



BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Kultivasi dan Ekstraksi

Cladosporium oxysporum dikultivasi dalam 13,2 L malt extract cair pH 5,6 pada suhu kamar sebagai kultur diam. (431 botol kultur masing-masing berisi 40 mL). Didapatkan ekstrak etil asetat kering 5,52 g, berwarna coklat kekuningan. Selanjutnya 2,8 g difraksinasi menggunakan kromatografi kolom. Umumnya waktu kultivasi dua hingga enam minggu namun berdasar penelitian awal dengan memperhatikan kurva pertumbuhan ditetapkan kultur dipanen pada minggu ke-empat dengan asumsi pembentukan metabolit sekunder umumnya terjadi pada fase stationer, dan dari penelitian sebelumnya fase stationer dicapai pada minggu ke-empat.

Diekstraksi dengan etil asetat, dengan asumsi beragam metabolit yang dihasilkan umumnya bersifat semi polar terekstraksi baik oleh pelarut penyari yang digunakan karena etil asetat memiliki kelarutan besar untuk senyawa-senyawa fitokimia (*phytoconstituents*) berkhasiat antimikroba (Doughari, 2006).

5.2 Fraksinasi metabolit sekunder

Fraksinasi dilakukan gradien karena pemisahannya baik (Cannell, 1998). Berdasar analisis KLT didapatkan 13 fraksi, hasilnya disajikan dalam Gambar 1.



Gambar 1
Hasil analisis KLT fraksi 3 – 8 dari ekstrak etil asetat *Cladosporium oxysporum*.
Fase diam *silica gel* 60F₂₅₄ fase gerak EtOAc: *n*-heksan (1:2) v/v dengan penampak noda UV 254

5.3 Uji aktivitas antibakteri dan antifungi

Hasil uji antimikroba fraksi-fraksi ekstrak *C. oxysporum* disajikan di Tabel 1 s/d 4.

Tabel 1. Resume hasil uji antimikroba fraksi-fraksi ekstrak etil asetat *C. oxysporum*

No Fraksi	Mikroba Uji		
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
1.	-	-	-
2.	-	-	-
3.	+	+	+
4.	+	+	+
5.	+	+	+
6.	+	+	+
7.	+	+	+
8.	-	-	-
9.	-	+	+
10.	+	+	+
11.	-	+	+
12.	-	-	+
13.	-	-	-

Keterangan:

(+) Mempunyai aktivitas antimikroba

(-) Tidak mempunyai aktivitas antimikroba

Didapatkan 6 dari 13 fraksi menghambat pertumbuhan ke-tiga mikroba uji *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Candida albicans* ATCC 10231 pada masa inkubasi 24 jam.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Kultivasi dan Ekstraksi

Cladosporium oxysporum dikultivasi dalam 13,2 L malt extract cair pH 5,6 pada suhu kamar sebagai kultur diam. (431 botol kultur masing-masing berisi 40 mL). Didapatkan ekstrak etil asetat kering 5,52 g, berwarna coklat kekuningan. Selanjutnya 2,8 g difraksinasi menggunakan kromatografi kolom. Umumnya waktu kultivasi dua hingga enam minggu namun berdasar penelitian awal dengan memperhatikan kurva pertumbuhan ditetapkan kultur dipanen pada minggu ke-empat dengan asumsi pembentukan metabolit sekunder umumnya terjadi pada fase stationer, dan dari penelitian sebelumnya fase stationer dicapai pada minggu ke-empat.

Diekstraksi dengan etil asetat, dengan asumsi beragam metabolit yang dihasilkan umumnya bersifat semi polar terekstraksi baik oleh pelarut penyari yang digunakan karena etil asetat memiliki kelarutan besar untuk senyawa-senyawa fitokimia (*phytoconstituents*) berkhasiat antimikroba (Doughari, 2006).

5.2 Fraksinasi metabolit sekunder

Fraksinasi dilakukan gradien karena pemisahannya baik (Cannell, 1998). Berdasar analisis KLT didapatkan 13 fraksi, hasilnya disajikan dalam Gambar 1.



Gambar 1
Hasil analisis KLT fraksi 3 – 8 dari ekstrak etil asetat *Cladosporium oxysporum*. Fase diam *silica gel* 60F₂₅₄ fase gerak EtOAc: *n*-heksan (1:2) v/v dengan penampak noda UV 254

5.3 Uji aktivitas antibakteri dan antifungi

Hasil uji antimikroba fraksi-fraksi ekstrak *C. oxysporum* disajikan di Tabel 1 s/d 4.

Tabel 1. Resume hasil uji antimikroba fraksi-fraksi ekstrak etil asetat *C. oxysporum*.

No Fraksi	Mikroba Uji		
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
1.	-	-	-
2.	-	-	-
3.	+	+	+
4.	+	+	+
5.	+	+	+
6.	+	+	+
7.	+	+	+
8.	-	-	-
9.	-	+	+
10.	+	+	+
11.	-	+	+
12.	-	-	+
13.	-	-	-

Keterangan:

(+) Mempunyai aktivitas antimikroba

(-) Tidak mempunyai aktivitas antimikroba

Didapatkan 6 dari 13 fraksi menghambat pertumbuhan ke-tiga mikroba uji *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Candida albicans* ATCC 10231 pada masa inkubasi 24 jam.

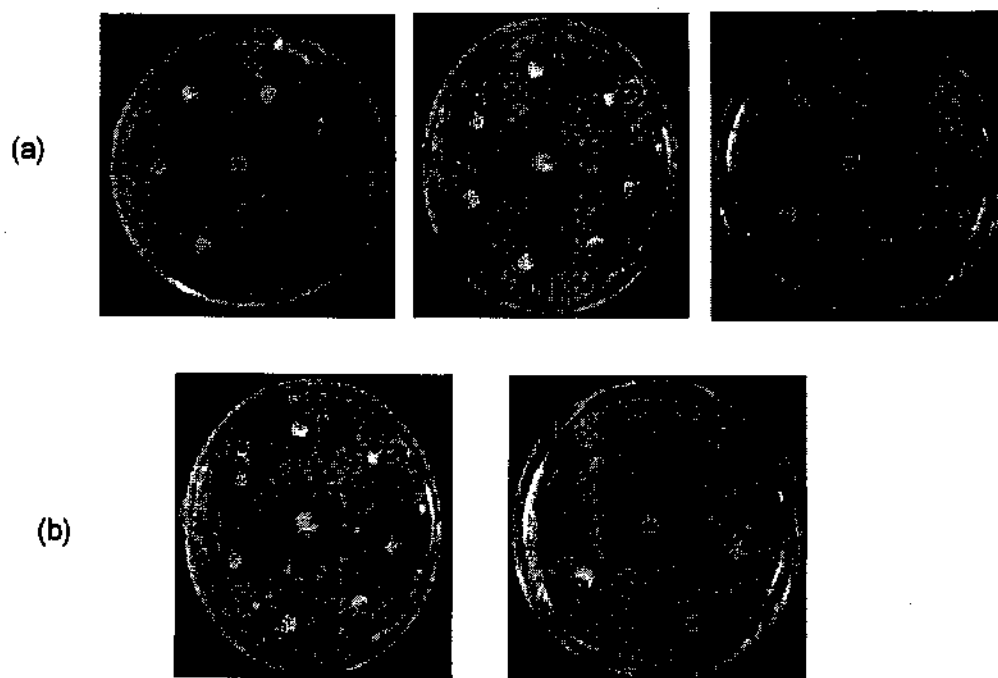
Tabel 2. Hasil uji antimikroba fraksi ekstrak *C. oxysporum* terhadap *E. coli* ATCC 8739

No Fraksi	Zona hambat kontrol positif (Streptomisin)		Zona hambat fraksi uji		48 jam	120 jam
	Diameter rata2 ± SD (mm)	RSD (%)	Diameter rata2 ± SD (mm)	RSD (%)		
1.	18,2 ± 1,6	8,6	-	-	-	-
2.	18,2 ± 1,6	8,6	-	-	-	-
3.	18,2 ± 1,6	8,6	8,5 ± 0,5	6,3	--	--
4.	18,2 ± 1,6	8,6	12 ± 1,5	12,3	--	--
5.	18,2 ± 1,6	8,6	12,7 ± 1,1	8,7	--	--
6.	19,2 ± 1,0	5,4	14 ± 1,6	11,7	+	+
7.	18,2 ± 1,6	8,6	18,4 ± 1,6	8,5	+	+
8.	19,2 ± 1,0	5,4	-	-	-	-
9.	19,2 ± 1,0	5,4	-	-	-	-
10.	19,5 ± 0,6	3,0	19,5 ± 1,0	5,1	+	+
11.	19,5 ± 0,6	3,0	-	-	-	-
12.	19,2 ± 1,0	5,4	-	-	-	-
13.	19,5 ± 0,6	3,0	-	-	-	-

Keterangan : (--) Terjadi pertumbuhan disekitar zona hambat

(+) Zona hambat tetap jernih

Fraksi ke 3, 4, 5, 6, 7 dan 10 memberikan zona hambat terhadap *Escherichia coli* ATCC 8739, fraksi ke 10 memberikan diameter zona hambat paling besar. Fraksi ke 6, 7 dan 10 memberikan daya hambat yang bertahan hingga 120 jam.



Gambar 2
Hasil pengamatan aktivitas antimikroba fraksi 1 – 13 dari ekstrak etil asetat *Cladosporium oxysporum* terhadap *Escherichia coli* ATCC 8739. (a) 24 jam (b) 48 jam

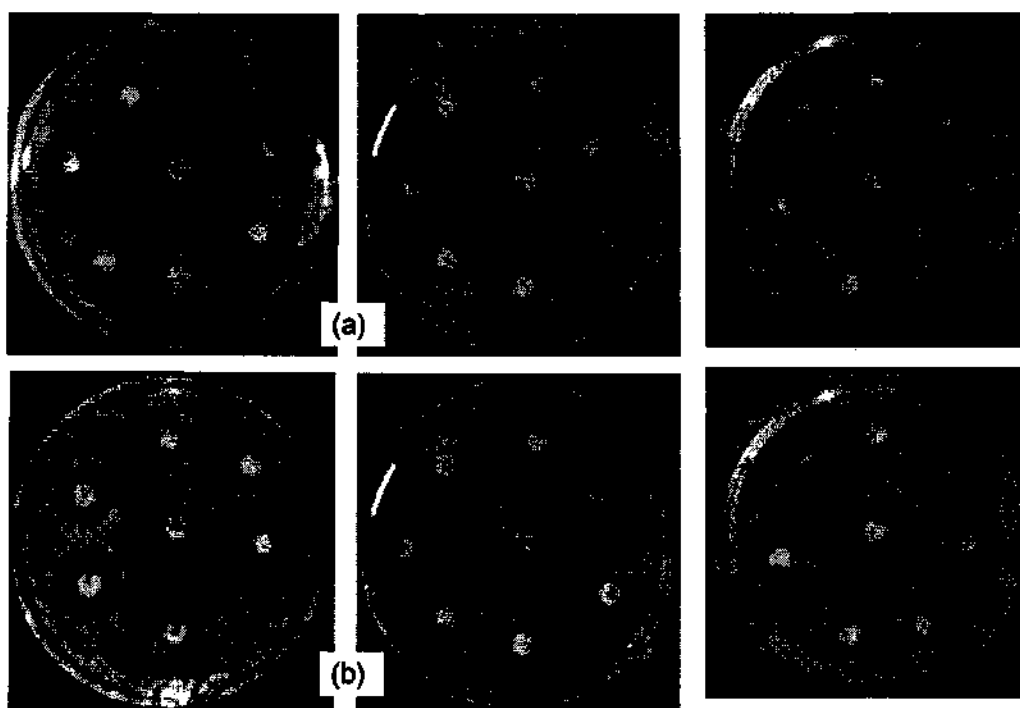
Tabel 3. Aktivitas antimikroba fraksi ekstrak etil asetat *C. oxysporum* terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

No Fraksi	Kontrol positif (Streptomisin)		Zona hambat fraksi uji		48 jam	120 jam
	Diameter rata2 ± SD (mm)	RSD (%)	Diameter rata-2 ± SD (mm)	RSD (%)		
1.	15 ± 1,4	9,1	-	-	-	-
2.	15 ± 1,4	9,1	-	-	-	-
3.	15 ± 1,4	9,1	8,3 ± 0,1	1,7	+	+
4.	15 ± 1,4	9,1	12,7 ± 2,1	16,7	+	+
5.	15 ± 1,4	9,1	16,5 ± 1,1	6,8	+	+
6.	18,4 ± 2,5	13,5	13,3 ± 0,9	6,4	+	+
7.	15 ± 1,4	9,1	18,5 ± 2,3	12,2	+	+
8.	18,4 ± 2,5	13,5	-	-	-	-
9.	15 ± 1,4	9,1	7,2 ± 0,1	1,9	--	--
10.	18,4 ± 2,5	13,5	13,2 ± 1,0	7,8	+	+
11.	18,4 ± 2,5	13,5	7,9 ± 0,6	7,2	+	+
12.	18,4 ± 2,5	13,5	-	-	-	-
13.	18,4 ± 2,5	13,5	-	-	-	-

Keterangan : (--) Terjadi pertumbuhan disekitar zona hambat

(+) Zona hambat tetap jernih

Fraksi ke 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 dan 11 menunjukkan zona hambat terhadap *S. aureus* ATCC 6538 dan tahan hingga 120 jam. Fraksi nomor 7 memberikan daya hambat terbesar terhadap *S. aureus* ATCC 6538.



Gambar 3
Hasil pengamatan aktivitas antimikroba fraksi 1 - 3 dan ekstrak dari asetat
Cladosporium oxysporum terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (a) 24
jam (b) 48 jam

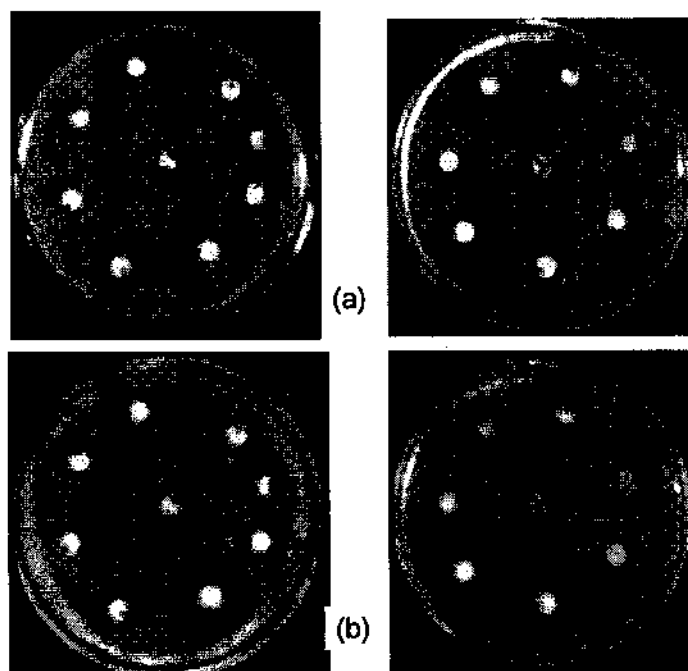
Tabel 4. Aktivitas antimikroba fraksi ekstrak etilasetat *C. oxysporum* terhadap *C. albicans* ATCC 10231.

No Fraksi	Kontrol positif (Ketokonazol)		Zona hambat fraksi uji		48 Jam	120 jam
	Diameter rata-2 ± SD (mm)	RSD (%)	Diameter rata2 ± SD (mm)	RSD (%)		
1.	11,8 ± 0,5	4,1	-	-	-	-
2.	11,8 ± 0,5	4,1	-	-	-	-
3.	11,8 ± 0,5	4,1	9,2 ± 1,2	12,6	+	+
4.	11,8 ± 0,5	4,1	7,4 ± 0,6	8,6	--	--
5.	11,8 ± 0,5	4,1	15,7 ± 1,2	7,7	+	+
6.	11,8 ± 0,5	4,1	14,0 ± 1,7	12,1	+	+
7.	11,8 ± 0,5	4,1	26,8 ± 0,7	2,7	+	+
8.	11,8 ± 0,5	4,1	-	-	-	-
9.	11,8 ± 0,5	4,1	8,2 ± 1,0	11,9	--	--
10.	11,8 ± 0,5	4,1	19,9 ± 0,6	3,2	+	+
11.	11,8 ± 0,5	4,1	8,9 ± 0,7	8,0	+	+
12.	11,8 ± 0,5	4,1	9,6 ± 1,6	16,3	+	+
13.	11,8 ± 0,5	4,1	-	-	-	-

Keterangan : (--) Terjadi pertumbuhan disekitar zona hambat

(+) Zona hambat tetap jernih

Fraksi ke 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 dan 12 memberikan daya hambat terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 dan bertahan hingga 120 jam kecuali fraksi ke-empat. Fraksi ke-7 memberikan diameter zona hambat terbesar terhadap *C. albicans* ATCC 10231



Gambar 4
 Hasil pengamatan aktivitas antimikroba fraksi 1 – 13 dari ekstrak etil asetat *Cladosporium oxysporum* terhadap *Candida albicans* ATCC 10231. (a) 24 jam
 (b) 48 jam

Hasil penelitian menunjukkan fraksi-fraksi dari ekstrak *Cladosporium oxysporum* efektif menghambat pertumbuhan baik bakteri Gram positif maupun negatif dan jamur seperti disajikan pada tabel 1. Fraksi ke-7 memberikan diameter zona hambat paling besar terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Candida albicans* ATCC 10231 sedangkan terhadap *Escherichia coli* ATCC 8739 fraksi ke-10 yang memberikan diameter zona hambat paling besar. Dalam hal menyimpulkan suatu ekstrak uji lebih aktif terhadap bakteri Gram negatif atau bakteri Gram positif dan jamur perlu kehati-hatian, jika hanya ditinjau dari perbedaan diameter zona hambat yang terbentuk. Hal ini disebabkan adanya faktor-faktor lain yang mempengaruhi hasil seperti jumlah inokulum dan homogen atau tidaknya larutan ekstrak (Raviraja *et al.*, 2005).

Hasil pengamatan dengan masa inkubasi 48 dan 120 jam menunjukkan terjadi perubahan terhadap zona hambat pada beberapa fraksi. Adanya

pertumbuhan disekitar zona hambat ditunjukkan oleh fraksi ke-3, 4 dan 5 pada *E. coli*; fraksi ke-9 pada *S. aureus*; serta fraksi ke-4 dan 9 pada *C. albicans*, berarti fraksi-fraksi tersebut bersifat bakteristatik dan fungistatik. Berbeda dengan fraksi ke- 6, 7 dan 10 pada *E. coli*; fraksi ke- 3, 4, 5, 6, 7, 10 dan 11 pada *S. aureus*; serta fraksi ke- 3, 5, 6, 7, 10, 11 dan 12 pada *C. albicans* zona hambat tetap jernih selama 48 dan 120 jam. Tidak adanya pertumbuhan mikroba di daerah zona hambat selama lebih dari 24 jam diasumsikan bahwa bahan uji bersifat bakteriosida dan fungisida (Doughari, 2006).

Adanya beberapa fraksi yang tidak menghambat pertumbuhan mikroba uji diduga karena pada kadar larutan uji 2 mg/disk senyawa-senyawa fitokimia (*phytoconstituents*) yang berkhasiat antimikroba terdapat dalam konsentrasi yang relatif kecil sehingga tidak mampu melawan mikroba uji. Faktor-faktor yang berpengaruh dan perlu dipertimbangkan dalam uji aktivitas antimikroba dengan metode disk secara Kirby Bauer ini antara lain konsentrasi bakteri yang ditambahkan pada media (jumlah inokulum), adanya kontaminasi patogen, efek difusi antibiotik yang digunakan, ketebalan media, suhu inkubasi, waktu inkubasi dan kandungan nutrisi media (Bauer *et al.*, 1966). Galur mikroba uji yang digunakan juga perlu diperhatikan mengingat pada galur berbeda, juga akan terjadi perbedaan tingkat kepekaan terhadap bahan uji.

Mikroba uji yang digunakan dalam penelitian ini mewakili bakteri Gram positif, Gram negatif dan jamur penyebab berbagai penyakit seperti infeksi kulit, jerawat, bisul, *cystitis*, *pyelitis* (*Staphylococcus aureus*), diare dan gangguan pencernaan (*Eschericia coli*) dan keputihan pada wanita atau candidiasis (*Candida albicans*) (Hostettmann, 1991). Adanya fraksi yang positif menghambat terhadap ke-tiga mikroba uji memberi harapan kemungkinan senyawa aktifnya dapat bersifat *broad spectrum antimicrobial substances*.

Perbedaan genus dan strain jamur endofit juga akan menghasilkan aktivitas antimikroba yang berbeda pula (Wang *et al.*, 2007). Beberapa senyawa yang diketahui berperan dalam aktivitas antimikroba antara lain golongan senyawa fenol dan polifenol, terpenoid dan minyak atsiri, alkaloid, lektin, polipeptida, steroid dan seskuiterpen (Cowan, 1992). Pada studi profil metabolit

Cladosporium oxysporum dari *Aglaia odorata* secara KLT-Densitometri menunjukkan adanya kandungan metabolit senyawa golongan steroid, seskuiterpen, dan terpenoid pada ekstrak etil asetatnya (Winarti, 2005). Senyawa golongan steroid, seskuiterpen dan terpenoid tersebut yang diduga berperan dalam aktivitas antimikroba dari fraksi-fraksi ekstrak *Cladosporium oxysporum*. Hal ini mengindikasikan metabolit sekunder steroid, seskuiterpen dan terpenoid tersebut yang kemungkinan memiliki aktivitas antimikroba dihasilkan sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap serangan bakteri dan jamur patogen bagi inangnya. Produksi senyawa bioaktif antara lain yang berkhasiat antimikroba oleh endofit, seperti telah diketahui diakibatkan kekhususan kondisi biologis tumbuhan untuk melindungi diri dari serangan hama bakteri dan jamur patogen (Strobel and Daisy, 2003).

Tujuan penelitian tahun pertama telah dicapai, didapatkan fraksi-fraksi yang mempunyai aktivitas antimikroba terhadap ketiga bakteri uji yaitu *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli* dan *Candida albicans*. Tahapan selanjutnya diharapkan dapat dilakukan pemurnian dan isolasi metabolit dari fraksi aktif (3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 dan 12) ekstrak etil asetat *Cladosporium oxysporum* dan dilakukan karakterisasi dan elusidasi struktur serta pengujian terhadap isolat murninya.

Bab VI

Kesimpulan

Berdasar penelitian yang telah dilakukan, disimpulkan:

Hasil fraksinasi ekstrak etilasetat *Cladosporium oxysporum* diperoleh 13 fraksi, 6 fraksi diantaranya memberikan zona hambat terhadap mikroba uji *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Candida albicans* ATCC 10231 pada inkubasi 24 jam. Dibuktikan bahwa 8 fraksi dari 13 fraksi memberikan daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; 6 fraksi menghambat *Escherichia coli* ATCC 8739 serta 9 fraksi memberikan hambatan terhadap *Candida albicans* ATCC 10231. Fraksi ke-3 hingga ke-7 dan fraksi ke-10 menunjukkan aktivitas dengan spektrum luas terhadap ke-tiga mikroba uji.

PUSTAKA ACUAN

- 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.
- Anonim, 1995. Farmakope Indonesia, Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 855, 896-897.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M.D., 1966. Antibiotic susceptibility Testing by A Standardized Single Disc Methode. *Journal of Clinical Pathology*, 45, 4, 493-496.
- Brunner, F. and Petrini, O., 1992. Taxonomy of some *Xylaria* sp. and Xylariceous Endophytes by Isozyme Electrophoresis. *Mycol. Res.* 96: 723 – 733.
- Cannell R.J.P, 1998. Natural Products Isolation, Humana Press, Totowa, New Jersey, 45 -52.
- Dreyfuss, M.E, Hoffman, H.H, Kobel, H, Pache, W, Tsecherter, H., 1986. Cyclosporin A and C: New Metabolites from *Trichoderma polysporum* *Appl. Environ. Microbiol.* 3, 125 – 133.
- Doughari JH, 2006. Research Article Antimicrobial Activity of *Tamarandus indica* Linn. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 597-603
- Hariana A, 2005. Tumbuhan Obat dan khasiatnya jilid 2, Depok, Penebar Swadaya, 154.
- Hakim, S. Bujiasih, Asri, 2009. Uji antimikroba metabolit sekunder fungi endofit yang diisolasi dari *Aglaia odorata* Lour. Sebagai sumber antibiotik baru. Laporan Kegiatan PKM
- Houghton, P.J., and Raman, A., 1998. Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts 1st ed. London, Thomson Science, 54 – 93.
- Hostettmann K., 1991. Methods in Plant Biochemistry. Institute of Pharmacognosy and Phytochemistry, Switzerland, 47-69.

- 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.
- Pimentel M.R., Molina G., Dionisio A.P., Junior MRM, Pastore G.M., 2010. The used of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process, *Biotechnology Research International*, 2011
- 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.
- 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
- Raviraja, N.S., 2005. Fungal endophytes in five medicinal plant species from Kudremukh Range, Western Ghats of India. *J. Basic Microbiol.* 45, 3, 230-235.
- 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.
- Solihah N.I. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Jamur Endofit *Cladosporium oxysporum* dari *Alyxia reinwardtii* BL. Skripsi, Surabaya. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Stierle, A., and Strobel, G., 1995. The search for a Taxol producing microorganism among the endophytic fungi of the Pasific Yew, *Taxus brevifolia*. *J. Nat. Prod.* 58, 9, 1315-1324.

- Strobel, G., and Daisy, B., 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 4, 491-502.
- Sugijanto, N.E., Indrayanto, G., Zaini, N.C., 2003. Isolasi dan determinasi jamur endofit dari *Aglaia eusideroxylon*, *Aglaia odorata* dan *Alyxia reindwartii*. (Laporan Penelitian DIKS- Universitas Airlangga 2003).
- Sugijanto, N.E., Indrayanto, G., Zaini, N.C., 2005. Paradigma baru produksi bahan obat sitotoksik menggunakan jamur endofit dari tanaman *Alyxia reindwartii*. (Laporan Penelitian Hibah Bersaing 2005 –2006).
- Sugijanto, N.E., Diesel, A., Ebel, R., Indrayanto, I., and Zaini, N.C., 2009. Chemical Constituents of the Endophytic fungus *Lecythophora* sp. Isolated from *Alyxia reinwardtii*, *Natural Product Communications*, 4, 11, 1485-1488, November 2009.
- Sugijanto, N.E., Diesel, A., Ebel, R., Indrayanto, I., and Zaini, N.C., 2011. Lecythomycin, a new macrolactone glycoside from Endophytic Fungus *Lecythophora* sp. *Natural Product Communications*, 6, 5, 677-678, Mei 2011
- Tan, R.X., and Zou, W.X., 2001, Endophytes a rich source of fungsional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18, 448 – 459.
- Winarni, C.D.B., 2005. Studi profil metabolit jamur endofit *Cladosporium oxysporum* dari *Aglaia odorata* Lour secara KLT-Densitometri, Skripsi, Fakultas Farmasi Unair.
- 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. ,

ARTIKEL ILMIAH

Produksi antibiotika baru dari jamur endofit tumbuhan *Aglaia odorata* Lour *Cladosporium oxysporum*

Noor Erma Sugijanto*, Bella Lexmita Dorra
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
Dharmawangsa Dalam Selatan, Surabaya (60286), Indonesia.
Telp.031-5033710, 085731212309, Fax.031-5020514,
* ermasugijanto@yahoo.co.id

ABSTRAK

Jamur endofit berpotensi ekonomi penting sebagai sumber bahan baku obat, antibiotika, enzim dan agrokimiawi. *Cladosporium oxysporum* yang diisolasi dari *Aglaia odorata* Lour ekstrak etil asetatnya menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. Mendesaknya kebutuhan untuk mengatasi resistensi kuman berbagai penyakit infeksi di daerah tropis maka penelitian mendapatkan senyawa antimikroba baru dari endofit *Cladosporium oxysporum* perlu dilakukan.

Tujuan penelitian tahun pertama mendapatkan fraksi aktif dari ekstrak etil asetat *Cladosporium oxysporum* yang berkhasiat antimikroba dan untuk tahun ke-dua mendapatkan struktur kimia senyawa aktif tersebut melalui pemurnian dan elusidasi stuktur. Tujuan jangka panjangnya memperoleh temuan antimikroba baru yang poten berkhasiat dan aman sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat dan dipatenkan.

Endofit dikultivasi *in-vitro*, metabolitnya diekstraksi dan difraksinasi dan diuji aktivitas antimikrobanya. Simpulan, hasil fraksinasi ekstrak etilasetat *Cladosporium oxysporum* diperoleh 13 fraksi, 6 diantaranya menghambat pertumbuhan mikroba uji *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Candida albicans* ATCC 10231 pada inkubasi 24 jam, beberapa fraksi diantaranya bertahan hingga 120 jam.

Kata kunci: Antimikroba, endofit, *Cladosporium oxysporum*, *Aglaia odorata*

PENDAHULUAN

Jamur endofit berpotensi ekonomi penting di masa depan sebagai sumber bahan baku obat, antibiotika, enzim, insektisida dan agrokimiawi (Pimentel *et al.*, 2010; Strobel and Daisy, 2003). Saat ini kebutuhan memperoleh senyawa antimikroba baru untuk mengatasi resistensi mikroba patogen khususnya yang berkembang didaerah tropis misalnya tbc dan malaria sudah sangat mendesak. Pada sisi lain jamur endofit diketahui mampu menghasilkan metabolit bioaktif, berkhasiat antimikroba, maka perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan senyawa anti mikroba baru dari jamur endofit yang di Indonesia sangat kaya biodiversitasnya.

Mikroba endofit dapat berupa bakteri, Actinomycetes dan jamur yang hidup *inter* dan *intra*-seluler di dalam jaringan tanaman sehat. Jamur endofit menyimpan potensi tak terbatas sebagai sumber bahan alami berharga untuk bahan baku obat (Nalini *et al.*, 2005), sebagian besar merupakan antibiotik (Strobel 2002).

Sumber daya hayati Indonesia, khususnya mikroba endofit belum banyak diteliti dan dimanfaatkan, padahal potensinya sebagai sumber bahan aktif dan senyawa berharga (*novel substances*) sangatlah besar. Sembilan macam senyawa yang telah diisolasi dari *Lecythophora* sp. jamur endofit yang berasal dari *Alyxia reinwardtii* BL (pulasari) terbukti memiliki aktivitas antimikroba dan beragam aktivitas yang lain (Sugijanto *et al.*, 2009; 2011).

Beragam jamur endofit telah diisolasi dari *Aglaiia odorata* (pacar cina) salah satunya *Cladosporium oxysporum* yang pada pengujian awal ekstrak etil asetatnya menunjukkan aktivitas antimikroba (Sugijanto *et al.*, 2005). Kemungkinan terdapat beragam senyawa bioaktif dalam ekstrak tersebut, untuk itu perlu dilakukan pemisahan (fraksinasi dan isolasi) senyawa aktif tersebut yang lebih efektif bila dituntun dengan uji aktivitas (*isolation guidance by activity*).

Tujuan penelitian pada tahun pertama ini mendapatkan fraksi aktif dari ekstrak etil asetat *Cladosporium oxysporum* yang berkhasiat antimikroba. Tujuan jangka panjangnya memperoleh temuan antimikroba baru yang poten berkhasiat dan aman sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat.

MATERI DAN METODE

Bahan penelitian

Tumbuhan inang diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur dan telah diidentifikasi sebagai *Aglaia odorata* oleh LIPI- Kebun Raya Purwodadi. Jamur endofit *Cladosporium oxysporum* diisolasi dari *Aglaia odorata* menurut prosedur Sugijanto *et al.*, 2009 dan diidentifikasi oleh Dr. Arnulf Diesel, Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Düsseldorf dengan kode jamur AGO A.

Mikroba uji: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram positif), *Escherichia coli* ATCC 8739 (Gram negatif) dan *Candida albicans* ATCC 10231 dari P.T. Otsuka, Indonesia. Bakteri uji diidentifikasi dengan pewarnaan Gram dan Lactofenol Cotton Blue untuk *C. albicans* sebelum digunakan

Bahan media digunakan agar (food grade), malt extract (E. Merck), Saboroud 2% dextrose broth (Oxoid, CMI), potatoes dextrose agar (Difco), dan nutrient broth (Oxoid, CMI). Bahan kimia, digunakan NaCl (p.a., E. Merck), etil asetat, metanol, *n*-heksan dan diklorometan p.a. (Mallinckrodt Baker Inc. Philipsburg, NJ), kloroform (p.a., E. Merck), lempeng KLT *Silicagel* 60 F₂₅₄, dan *Silicagel* 60 G for column (E. Merck). Streptomisin sulfat (PT. Meiji Indonesia) sebagai kontrol positif untuk antibakteri dan ketokonazol (pharmaceutical grade, P.T. Bernofarm, Surabaya) sebagai pembanding untuk anti jamur.

Alat digunakan *autoclave* (Huxley HL-340 Speedy), *laminair air flow cabinet* (Dalton), timbangan analitik (Mettler Toledo AB 204-s), pH-meter (Fischer Accumet-230A), *chamber chromatography* (Camag), lampu UV, spektrofotometer UV-Vis (Lambda EZ 201-Perkin Elmer) dan Hitachi F-4000.

Kultivasi jamur endofit

Cladosporium oxysporum hasil isolasi dipelihara dalam malt extract agar, diremajakan setiap enam bulan, disimpan pada suhu 5-10°C. Penyiapan inokulum untuk kultivasi dalam media cair, dilakukan peremajaan dengan cara satu Öse jamur endofit dari kultur induk ditumbuhkan dalam media malt extract agar dan diinkubasikan 7 hari. Satu Öse inokulum berumur 7 hari tersebut, ditumbuhkan dalam 40 ml media cair malt extract dengan pH 5,6 dalam labu

Erlenmeyer 300 ml. Kultur diinkubasi secara diam (*static culture*) pada suhu kamar dan dipanen pada umur 28 hari (Sugijanto *et al.*, 2009). Kultivasi massal dilakukan dalam \pm 13,2 L media cair (431 botol kultur).

Preparasi Ekstrak

Ekstraksi metabolit *Cladosporium oxysporum* dilakukan dengan cara biomassa dan cairan kultur (*broth*) diblender, diekstraksi dengan etil asetat setengah volumenya, diultrasonikasi lima belas menit dan dikocok dengan *rotary-shaker* selama satu jam dan dipisahkan dengan corong pisah. Ekstraksi diulang tiga kali, ekstrak etil asetatnya dipekatkan dengan *vacuum rotavapor* pada suhu 35°C .

Fraksinasi metabolit sekunder

Ekstrak etil asetat (\pm 2,8 gram) difraksinasi dengan kromatografi kolom (KK) (Cannell, 1998). Fase diam *Silica gel 60 for column chromatography* (\pm 200 g, ukuran 70 – 230 mesh), dieluasi awal dengan *n*-heksan. Eluasi dilanjutkan dengan *n*-heksan : etil asetat (1:1) (v/v); *n*-heksan : etil asetat (1:9) (v/v) hingga etil asetat 100%, kemudian etil asetat : metanol (9:1) (v/v) dengan gradien 10% hingga metanol 100%. Hasil pemisahan setiap 25 mL ditampung dalam vial-vial. Setiap 5 vial dan kelipatannya dianalisis secara kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan pelat *Silica gel 60 F₂₅₄* dengan penampak noda UV pada λ 254 dan pereaksi penampak noda anisaldehyd-asam sulfat. Hasil KLT yang warna noda dan Rf sama digabung dalam satu fraksi, dan terhadap fraksi-fraksi tersebut dilakukan uji aktivitas antimikroba.

Uji aktivitas antimikroba

Uji aktivitas antimikroba dilakukan secara difusi cakram (*disc diffusion methode*) (Doughari, 2006). Medium pengujian digunakan Saboroud 2% dextrose agar untuk jamur dan nutrient agar untuk bakteri. Preparasi inokulum mikroba uji dilakukan menurut prosedur Farmakope Indonesia (1995).

Dibuat larutan uji dari setiap fraksi yang sudah diketahui beratnya, dilarutkan dan diambil 20 μ L ditetaskan ke cakram kertas (*disc*), yang setara dengan 2 mg/cakram. Sebagai kontrol positif di tetaskan 20 μ L streptomisin sulfat 100 ppm,

untuk antijamur 20 μ L larutan ketokonazol 2000 ppm dan 20 μ L etil asetat sebagai kontrol negatif.

Suspensi mikroba uji (masing-masing 10 μ L untuk *C. albicans*, *S. aureus* dan *E. coli*) ditambahkan ke 15,0 ml media steril yang dicairkan, dihomogenkan, dituang ke cawan petri dan didiamkan hingga memadat. Cawan petri yang telah berisi media dan mikroba uji ditambahkan cakram kertas yang sudah berisi larutan uji dan kontrol positif dan negatif, diinkubasi suhu 37°C, sedang untuk jamur 32°C selama 24–48 jam. Setelah 24–48 jam, zona jernih yang terbentuk (diameter daya hambat) diukur dengan jangka sorong. Replikasi dilakukan tiga kali untuk masing-masing fraksi dan mikroba uji.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil kultivasi didapatkan ekstrak etil asetat 5,52 g, selanjutnya 2,8 g difraksinasi dengan kromatografi kolom. Hasilnya setelah dianalisis secara KLT didapatkan 13 fraksi, hasil uji antimikrobanya disajikan di Tabel 1 s/d 3.

Fraksi ke 3, 4, 5, 6, 7 dan 10 memberikan daya hambat terhadap *Escherichia coli* ATCC 8739, fraksi ke-10 memberikan diameter zona hambat terbesar. Fraksi ke 6, 7 dan 10 memberikan daya hambat yang bertahan hingga 120 jam.

Fraksi ke 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 dan 11 juga positif terhadap *S. aureus* ATCC 6538 dan daya hambat tersebut bertahan hingga 120 jam, fraksi ke-7 memberikan daya hambat terbesar.

Fraksi ke 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 dan 12 menghambat pertumbuhan *C. albicans* ATCC 10231 dan bertahan hingga 120 jam kecuali fraksi ke-4. Fraksi ke-7 memberikan diameter zona hambat paling besar terhadap *C. albicans* ATCC 10231.

Hasil fraksinasi dan uji antimikroba menunjukkan 6 dari 13 fraksi menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif, negatif dan jamur yaitu *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8739 dan *C. albicans* ATCC 10231 pada inkubasi 24 jam (Tabel 1-3).

Fraksi ke-3 hingga ke-7 dan fraksi ke-10 menunjukkan aktivitas dengan spektrum luas terhadap ke-tiga mikroba uji sedang fraksi-fraksi ke-9 dan 11 tampaknya lebih sensitif untuk bakteri Gram positif (*S. aureus* ATCC 6538) dan jamur (*C. albicans* ATCC 10231). Sementara fraksi ke-12 hanya aktif sebagai antifungi terhadap *C. albicans* ATCC 10231. Fraksi ke-7 memberikan diameter zona hambat paling besar

terhadap *S. aureus* ATCC 6538 dan *C. albicans* ATCC 10231 sedangkan terhadap *E. coli* ATCC 8739 fraksi ke-10 yang memberikan diameter zona hambat paling besar. Dalam hal menyimpulkan suatu ekstrak uji lebih aktif terhadap bakteri Gram negatif atau bakteri Gram positif dan jamur perlu kehati-hatian jika hanya ditinjau dari perbedaan diameter zona hambat yang terbentuk, padahal ada faktor-faktor lain yang mempengaruhi seperti jumlah inokulum dan homogen atau tidaknya larutan ekstrak (Raviraja *et al.*, 2005).

Hasil pengamatan setelah inkubasi 48 dan 120 jam menunjukkan perubahan terhadap zona hambat pada beberapa fraksi, seperti fraksi ke-3, 4 dan 5 pada *E. coli*; fraksi ke-9 pada *S. aureus*; serta fraksi ke-4 dan 9 pada *C. Albicans*. Hal ini berarti fraksi-fraksi tersebut bersifat bakteristatik dan fungistatik. Berbeda dengan fraksi ke- 6, 7 dan 10 pada *E. coli*; fraksi ke- 3, 4, 5, 6, 7, 10 dan 11 pada *S. aureus*; serta fraksi ke- 3, 5, 6, 7, 10, 11 dan 12 pada *C. albicans* menunjukkan zona hambat yang tetap jernih selama 48 dan 120 jam. Tidak adanya pertumbuhan mikroba di daerah zona hambat selama lebih dari 24 jam diasumsikan bahwa bahan uji bersifat bakteriosida dan fungisida (Doughari, 2006), meskipun untuk memastikannya masih diperlukan uji lanjutan.

Adanya beberapa fraksi dari ekstrak *C. oxysporum* yang tidak menghambat pertumbuhan mikroba uji, dapat terjadi karena pada bahan uji dengan kadar 2 mg/disk senyawa-senyawa fitokimia (*phytoconstituents*) yang berkhasiat antimikroba terdapat dalam konsentrasi yang relatif kecil sehingga tidak mampu melawan mikroba uji. Faktor-faktor yang berpengaruh dan harus dipertimbangkan dalam uji aktivitas antimikroba dengan metode ini antara lain konsentrasi inokulum yang ditambahkan, adanya kontaminasi patogen, efek difusi antibiotik yang digunakan, ketebalan media, suhu dan waktu inkubasi, serta kandungan nutrisi media. Galur mikroba uji yang digunakan juga harus diperhatikan karena pada galur yang berbeda, terdapat perbedaan tingkat kepekaan terhadap senyawa uji (Hostettmann, 1991). Mikroba uji yang digunakan dalam penelitian ini mewakili bakteri dan jamur penyebab berbagai penyakit seperti infeksi kulit, jerawat, bisul, *cystitis*, *pyelitis* (*Staphylococcus*

aureus), diare dan gangguan pencernaan (*Escherichia coli*) dan keputihan pada wanita atau candidiasis (*Candida albicans*) (Hostettmann, 1991).

Perbedaan genus dan strain jamur endofit juga akan menghasilkan aktivitas antimikroba yang berbeda pula (Wang *et al.*, 2007). Penelitian ini selaras dengan Wang (2007) yang melaporkan fraksi dan isolat senyawa brefeldin A dari *Cladosporium* sp. pada tumbuhan *Quercus variabilis* memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Senyawa-senyawa fenolik dan polifenol termasuk flavonoid dan alkaloid umumnya memiliki khasiat farmakologis sebagai antimikroba (Pena *et al.*, 2011) juga golongan terpenoid, seskuiterpen, steroid, minyak atsiri, lektin dan polipeptida diketahui berperan dalam aktivitas antimikroba (Cowan, 1992). Pada studi profil metabolit secara KLT-Densitometri jamur *C. oxysporum* yang diisolasi dari *Aglaia odorata* didapatkan kandungan senyawa golongan steroid, seskuiterpen dan terpenoid pada ekstrak etil asetatnya (Winarti, 2005). Senyawa-senyawa tersebut yang diduga berperan pada aktivitas antimikroba dari fraksi-fraksi yang ada. Hal ini mengindikasikan metabolit yang memiliki aktivitas antimikroba, dihasilkan sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap serangan bakteri dan jamur patogen bagi inangnya (Strobel and Daisy, 2003).

Kesimpulan: Hasil fraksinasi ekstrak etilasetat *Cladosporium oxysporum* diperoleh 13 fraksi, 6 fraksi diantaranya memberikan zona hambat terhadap mikroba uji *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Candida albicans* ATCC 10231 pada inkubasi 24 jam. 8 fraksi dari 13 fraksi memberikan daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; 6 fraksi menghambat *Escherichia coli* ATCC 8739 serta 9 fraksi memberikan hambatan terhadap *Candida albicans* ATCC 10231. Fraksi ke-3 hingga ke-7 dan fraksi ke-10 menunjukkan aktivitas dengan spektrum luas terhadap ke-tiga mikroba uji.

Tahapan selanjutnya perlu dilakukan pemurnian dan isolasi senyawa metabolit dari fraksi-fraksi ekstrak yang aktif sebagai antimikroba dari *Cladosporium oxysporum* dan dilakukan karakterisasi dan elucidasi struktur serta pengujian terhadap isolat murninya dengan mikroba uji yang resisten terhadap antimikroba

yang sudah ada. Penemuan jamur endofit *C.oxysporum* yang dapat memproduksi beragam metabolit bioaktif membuka peluang baru untuk dapat melakukan produksi obat pada skala komersial dari mikroba yang tersembunyi di dalam tumbuhan inangnya tersebut.

Ucapan terima kasih

Disampaikan terima kasih kepada Direktur Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan R.I. atas bantuan finansial untuk penelitian ini, melalui Hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Universitas Airlangga, Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun Anggaran 2012 Nomor 2613/H3/KR/2012.

Kepada Dr. Arnulf Diesel, Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Düsseldorf disampaikan terima kasih atas bantuan identifikasi jamur endofit dan P.T. Otsuka, Indonesia untuk bantuan mikroba uji.

Daftar pustaka

- Anonim (1995). Farmakope Indonesia Edisi ke-IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta: 855, 896-897.
- Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agent. *Clinical Microbiology Review*, 12(4): 564-582
- Doughari JH (2006). Antimicrobial Activity of *Tamarandus indica* Linn. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, (5): 597-603.
- Hostettmann K (1991) *Methods in plant biochemistry*. Institute of Pharmacognosy and Phytochemistry, Switzerland, 47-69.
- Nalini MS, Mahesh B, Tejesvi MV, Prakash HS, Subbaiah V, Kini KR, Shetty HS (2005). Fungal endophytes from the three-leaved caper *Crataeva magna* (Lour.) DC (Capparidaceae). *Mycopathologia* 159: 245-249.
- Sugijanto NE, Indrayanto G, Zaini NC (2005). Paradigma baru produksi bahan obat sitotoksik menggunakan jamur endofit dari tanaman *Alyxia reindwartii*. (Laporan Penelitian Hibah Bersaing 2005 –2006).

- Sugijanto NE, Diesel A, Ebel R, Indrayanto G, Zaini NC (2009). Chemical constituents of the endophytic fungus *Lecythophora* sp. isolated from *Alyxia reinwardtii*, *Natural Product Communications*, 4, (11): 1485-1488
- Sugijanto NE, Diesel A, Ebel R, Indrayanto G, Zaini NC (2011). Lecythomycin, a new macrolactone glycoside from endophytic fungus *Lecythophora* sp. *Natural Product Communications*, 6, (5): 677-678.
- Pena CJ, Reverte A, Hernandez LB, Meraz S, Jimenez M, Garcia AM, Avilla G, Hernandez T, (2011). Antimicrobial, antioxidant and toxic effects of *Senna skinneri* Bentham, Irwin and Barneby (Leguminosae), *Journal of medicinal plants research*, 5, (14): 3224-3228.
- Pimentel MR, Molina G, Dionisio AP, Junior MRM, Pastore GM (2010). The used of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnology Research International*, 2011
- Raviraja NS (2005). Fungal endophytes in five medicinal plant species from Kudremukh Range, Western Ghats of India. *J. Basic Microbiol.*45 (3): 230-235.
- Strobel GA, (2002). Microbial gifts from rain forests. *Can. J. Plant Pathol.* 24:14 – 20.
- Strobel G, Daisy B (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*67, (4): 491-502.
- Tan RX, and Zou WX (2001). Endophytes a rich source of fungsional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18: 448 – 459.
- Wang FW, Jiao RH, Cheng AB (2007). Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World J. Microbiol Biotechnol*, 23:79-83
- Winarni CDB (2005). Studi profil metabolit jamur endofit *Cladosporium oxysporum* dari *Aglaia odorata* Lour secara KLT-Densitometri, Skripsi, Fakultas Farmasi Unair.

Tabel 1. Hasil uji antimikroba fraksi ekstrak *C. oxysporum* terhadap *E. coli* ATCC 8739

No Fraksi	Zona hambat kontrol positif (Streptomisin)		Zona hambat fraksi uji		48 jam	120 jam
	Diameter rata2 ± SD (mm)	RSD (%)	Diameter rata2 ± SD (mm)	RSD (%)		
1.	18,2 ± 1,6	8,6	-	-	-	-
2.	18,2 ± 1,6	8,6	-	-	-	-
3.	18,2 ± 1,6	8,6	8,5 ± 0,5	6,3	--	--
4.	18,2 ± 1,6	8,6	11,9 ± 1,5	12,3	--	--
5.	18,2 ± 1,6	8,6	12,7 ± 1,1	8,7	--	--
6.	18,2 ± 1,6	5,4	14,0 ± 1,6	11,7	+	+
7.	18,2 ± 1,6	8,6	18,4 ± 1,6	8,5	+	+
8.	19,2 ± 1,0	5,4	-	-	-	-
9.	19,2 ± 1,0	5,4	-	-	-	-
10.	19,5 ± 0,6	3,0	19,5 ± 1,0	5,1	+	+
11.	19,5 ± 0,6	3,0	-	-	-	-
12.	19,2 ± 1,0	5,4	-	-	-	-
13.	19,5 ± 0,6	3,0	-	-	-	-

Tabel 2. Aktivitas antimikroba fraksi ekstrak etil asetat *C. oxysporum* terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

No Fraksi	Kontrol positif (Streptomisin)		Zona hambat fraksi uji		48 jam	120 jam
	Diameter rata2 ± SD (mm)	RSD (%)	Diameter rata-2 ± SD (mm)	RSD (%)		
1.	15,0 ± 1,4	9,1	-	-	-	-
2.	15,0 ± 1,4	9,1	-	-	-	-
3.	15,0 ± 1,4	9,1	8,3 ± 0,1	1,74	+	+
4.	15,0 ± 1,4	9,1	12,7 ± 2,1	16,7	+	+
5.	15,0 ± 1,4	9,1	16,5 ± 1,1	6,8	+	+
6.	18,4 ± 2,5	13,5	13,3 ± 0,9	6,4	+	+
7.	15,0 ± 1,4	9,1	18,5 ± 2,3	12,2	+	+
8.	18,4 ± 2,5	13,5	-	-	-	-
9.	15,0 ± 1,4	9,1	7,2 ± 0,1	1,9	--	--
10.	18,4 ± 2,5	13,5	13,2 ± 1,0	7,7	+	+
11.	18,4 ± 2,5	13,5	7,9 ± 0,6	7,2	+	+
12.	18,4 ± 2,5	13,5	-	-	-	-
13.	18,4 ± 2,5	13,5	-	-	-	-

Tabel 3. Aktivitas antimikroba fraksi ekstrak etilasetat *C. oxysporum* terhadap mikroba uji *C. albicans* ATCC 10231.

No Fraksi	Kontrol positif (Ketokonazol)		Zona hambat fraksi uji		48 Jam	120 jam
	Diameter rata-2 ± SD (mm)	RSD (%)	Diameter rata2 ± SD (mm)	RSD (%)		
1.	11,8 ± 0,5	4,1	-	-	-	-
2.	11,8 ± 0,5	4,1	-	-	-	-
3.	11,8 ± 0,5	4,1	9,2 ± 1,2	12,6	+	+
4.	11,8 ± 0,5	4,1	7,42 ± 0,64	8,6	--	--
5.	11,8 ± 0,5	4,1	15,7 ± 1,2	7,7	+	+
6.	11,0 ± 0,5	4,5	14,0 ± 1,7	12,1	+	+
7.	11,8 ± 0,5	4,1	26,8 ± 0,7	2,7	+	+
8.	11,0 ± 0,5	4,5	-	-	-	-
9.	11,8 ± 0,5	4,1	8,2 ± 1,0	11,9	--	--
10.	11,0 ± 0,5	4,5	19,9 ± 0,6	3,2	+	+
11.	11,0 ± 0,5	4,5	8,9 ± 0,7	8,0	+	+
12.	11,0 ± 0,5	4,5	9,6 ± 1,6	16,3	+	+
13.	11,0 ± 0,5	4,5	-	-	-	-

Keterangan : (--) Terjadi pertumbuhan disekitar zona hambat,
(+) Zona hambat tetap jernih

C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN

Jamur endofit berpotensi ekonomi penting sebagai sumber bahan baku obat, antibiotika, enzim, insektisida dan agrokimiawi di masa depan. Beragam antibiotika dapat diproduksi jamur endofit a.l.: siklosporin A, sefalosporin, munumbicin, sitokalsin, penicillin N, sporiofungin dan sebagainya. Endofit memproduksi metabolit sekunder untuk melindungi diri dan hostnya dari nematoda, mamalia, serangga maupun bakteri dan fungi patogen (Tan and Zou, 2001). Diasumsikan endofit dapat menghasilkan metabolit yang berkhasiat antibakteri dan atau antifungi karena endofit mampu menekan kolonisasi hostnya dari serangan spesies patogen. Brunner dan Petrini (1992) melaporkan 75% fungi endofit dari 80 jenis yang diteliti menghasilkan antibiotika.

Adanya fenomena jamur endofit yang mampu menghasilkan metabolit sekunder yang aktif sebagai antimikroba serta mendesaknya kebutuhan akan antimikroba baru untuk mengatasi resistensi kuman patogen, khususnya pada berbagai penyakit infeksi yang berkembang di daerah tropis seperti di Indonesia, perlu diteliti aspek produksi anti mikroba dari jamur endofit ini. *Cladosporium oxysporum* yang diisolasi dari *Aglaia odorata* Lour pada penelitian awal ekstrak etil asetatnya menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans* untuk itu perludilakukan penelitian ini

Tujuan penelitian pada tahun pertama mendapatkan fraksi aktif dari ekstrak etil asetat *Cladosporium oxysporum* yang berkhasiat antimikroba dan untuk tahun ke-dua mendapatkan struktur kimia senyawa aktif tersebut melalui pemurnian dan elusidasi stuktur. Tujuan jangka panjangnya memperoleh temuan antimikroba baru yang poten berkhasiat dan aman sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat dan dipatenkan.

Tahapan penelitian dilakukan sebagai berikut: endofit dikultivasi *in vitro*, miselia dan cairan diekstraksi, difraksinasi dan diuji aktivitas antimikrobanya.

Fraksi aktif dimurnikan, isolat metabolit yang aktif dilakukan karakterisasi dan elusidasi struktur menggunakan spektroskopi $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H}^1\text{HCOSEY}$, $^1\text{H}^{13}\text{C COSY}$, Mass spectrometri.

Berdasar penelitian yang telah dilakukan dari hasil tahun pertama, disimpulkan: Hasil fraksinasi ekstrak etilasetat *Cladosporium oxysporum* diperoleh 13 fraksi, 6 fraksi diantaranya memberikan zona hambat terhadap mikroba uji *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Candida albicans* ATCC 10231 pada inkubasi 24 jam. 8 fraksi dari 13 fraksi memberikan daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; 6 fraksi menghambat *Escherichia coli* ATCC 8739 serta 9 fraksi memberikan hambatan terhadap *Candida albicans* ATCC 10231. Fraksi ke-3 hingga ke-7 dan fraksi ke-10 menunjukkan aktivitas dengan spektrum luas terhadap ke-tiga mikroba uji.

Tahapan penelitian selanjutnya perlu dilakukan pemurnian dan isolasi senyawa metabolit dari fraksi-fraksi ekstrak yang aktif sebagai antimikroba baru dari *Cladosporium oxysporum* dan dilakukan karakterisasi dan elusidasi struktur serta pengujian terhadap isolat murninya dengan mikroba uji yang resisten terhadap antimikroba yang ada.

Penemuan jamur endofit *C. oxysporum* yang dapat memproduksi beragam metabolit bioaktif membuka peluang baru untuk dapat melakukan produksi obat pada skala komersial dari mikroba yang tersembunyi di dalam tumbuhan inangnya tersebut.

Prospek ekonomi penelitian ini diharapkan dapat dipatenkan metabolit sekunder yang berkhasiat antimikroba (antibiotika baru) dan metode produksi antibiotika dari jamur endofit. Produksi melalui fermentasi mikroba/jamur ini tidak terbatas sehingga lebih menguntungkan karena reproduibel, tidak dibatasi oleh jumlah tanaman dan tidak merusak tanaman inang yang termasuk langka, tidak tergantung lokasi, cuaca ataupun musim.