

## DAYA ANTIMIKROBA EKSTRAK *Lecythophora* sp., ENDOFIT YANG DIISOLASI DARI *Alyxia reinwardtii*

Noor Erma Sugijanto\*, H. Putra, F. Pritayuni, N. Albathaty, dan Noor Cholies Zaini.

Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Jl. Darmawangsa Dalam, Surabaya

\*E-mail: ermasugijanto@yahoo.co.id

### ABSTRACT

The antimicrobial potential of two endophytic fungi isolated from *Alyxia reinwardtii* BL, towards selected bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* FNCC 0059, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi*) and fungi (*Candida albicans*) was tested using ethyl acetate, n-hexane and n-butanol extracts of fungi cultivated under malt extract liquid fermentation. The extracts were evaluated for its antimicrobial activity by disc diffusion method followed its MIC by agar dilution. Bioautography assay for activity-directed fractionation were also conducted against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. *Streptomycin sulphate* and *myconazole* used as reference standards. *Lecythophora* sp. strain 30.1 and 30.5 have broad spectrum antimicrobial activity and a potential source of new classes of antibiotics that could be useful for medicines and biological control agents.

**Key words:** *Alyxia reinwardtii* BL, antimicrobial activity, endophytic fungi, *Lecythophora* sp.

### PENGANTAR

Sumber daya hayati Indonesia, khususnya mikroorganisme belum banyak diteliti dan dimanfaatkan padahal potensi sebagai sumber bahan aktif dan senyawa berharga yang terkandung di dalamnya sangatlah besar. Salah satu sumber utama metabolit sekunder berkhasiat obat adalah jamur endofit (Strobel dan Daisy, 2003). Saat ini, jamur endofit karena kekayaan biodiversitas, keragaman metabolit dan bioaktivitas yang dihasilkan sangat menarik untuk diteliti (Tan dan Zou, 2001).

Mikroba endofit ini dapat berupa bakteri, termasuk *Actinomycetes* dan jamur yang hidup intraseluler di dalam jaringan tanaman sehat (Tan dan Zou, 2001). Di bumi ini tumbuh ± 300.000 spesies tumbuhan (Achmad *et al.*, 2003) yang masing-masing menjadi inang satu atau lebih endofit, biodiversitas jamur endofit ini sangat kaya namun relatif sedikit yang telah diteliti. Hal ini menciptakan peluang mendapatkan mikroba endofit dan metabolitnya yang baru, berkhasiat dan berpotensi ekonomi tinggi sangat terbuka. Endofit yang paling sering diisolasi adalah jamur (Strobel dan Daisy, 2003).

Beberapa metabolit endofit menunjukkan aktivitas antibakteri, antifungi, hormon pertumbuhan tanaman, insektisida, immunosupresan dan lain-lain (Tan dan Zou, 2001). Aktivitas antimikroba metabolit endofit dihasilkan sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap serangan bakteri dan jamur patogen bagi inangnya (Rayner, 1991). Brunner dan Petrini (1992) menunjukkan 75% dari 80 jenis fungi endofit yang diuji menghasilkan antibiotika.

Beragam metabolit endofit dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antimikroba, contohnya *sitosporone* B, C (Huang, *et al.*, 2008); munumbisin A,B,C dan D (Strobel dan Daisy, 2003); dan kriptosin (Li *et al.*, 2000). Senyawa-senyawa tersebut berpotensi sebagai rujukan (*lead compounds*) untuk mengembangkan bahan kimia baru yang berguna di bidang kesehatan dan pertanian. Oleh karena itu, saat ini penelitian untuk mendapatkan antifungi dan antibakteri dari metabolit jamur endofit sangat diminati. Jamur endofit, mempunyai arti ekonomis penting di masa depan karena menyimpan potensi tidak terbatas yang saat ini belum banyak diaplikasikan dalam industri farmasi dan pertanian sebagai sumber bahan baku obat, enzim dan senyawa biologis berkhasiat lainnya (Strobel *et al.*, 2004).

Di antara kekayaan tumbuhan obat Indonesia, *Alyxia reinwardtii* BL (pulasari) mempunyai arti penting sebagai komponen jamu, namun tanaman ini terancam punah (Yuliani, 2001). *A. reinwardtii* digunakan untuk mengobati diare, keputihan dan sariawan (Anonim, 1977). *A. reinwardtii* mengandung kumarin, 5-hidroksikumarin, 8-hidroksikumarin, pinosresinol, 9  $\alpha$ -hidroksi-pinosresinol dan salisifoliol (Steffan, 2006) dan pulosariosida (Kitagawa, *et al.*, 1988). Hasil isolasi jamur endofit dari *A. reinwardtii*, salah satunya diidentifikasi sebagai *Lecythophora* sp., terdiri atas dua strain isolat dengan kode 30.1 dan 30.5 (Sugijanto *et al.*, 2009).

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antimikroba dan konsentrasi hambat minimum ekstrak *Lecythophora* sp. strain 30.1 dan 30.5 dan aktivitas fraksi

ekstrak secara bioautografi. Diharapkan dari hasil penelitian ini dapat dirintis jalan menuju penemuan antibiotika baru yang selektif, berkhasiat namun aman digunakan.

## BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan penelitian, *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 *A. reinwardtii* BL menurut prosedur Sugijanto *et al.* (2009) dan telah diidentifikasi oleh Dr. R.A. Samson (CBS Utrecht, The Netherlands, Reg No. 208-2003).

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, *n*-butanol dan diklorometan p.a. (*Mallinckrodt Baker Inc.* Philipsburg, NJ), kloroform (p.a., E. Merck), lempeng KLT *Silicagel 60 F<sub>254</sub>*, dan *Silicagel 60 G for column* (E. Merck). Streptomisin sulfat (*PT. Meiji Indonesia* no. Batch SS03364-1) dan mikonazol (*pharmaceutical grade*, *PT Bernofarm*, Surabaya) sebagai pembandingan.

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

Alat yang digunakan adalah *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

Kultur induk hasil isolasi endofit *Lecythophora* sp. *strain* 30.1 dan 30.5 dipelihara dalam media *malt extract* agar, diremajakan tiap enam bulan dan disimpan pada lemari pendingin. Kultivasi jamur endofit dilakukan sebagai berikut, satu jamur endofit dari kultur persediaan ditumbuhkan dalam media *malt extract* agar selama 7 hari sebagai inokulum. Dalam labu Erlenmeyer 300 ml satu Öse inokulum ditumbuhkan dalam 40 ml media cair *malt*

*extract*, pH 6,5 diinkubasi secara kultur diam (*static culture*) pada suhu kamar dan dipanen pada umur 28 hari (Stierle dan Strobel, 1995; Ebel, 2003). Kultivasi masal dilakukan dalam ± 30 L (750 Erlenmeyer) untuk setiap *strain*.

## Preparasi Ekstrak Metabolit Endofit

Ekstraksi dan fraksinasi metabolit hasil kultivasi dilakukan dengan cara kultur endofit disaring, cairannya diekstraksi dengan etil asetat setengah volumenya, diulang tiga kali dan dipekatkan. Biomassa jamur setelah dikeringkan 2×24 jam pada suhu 50° C, diekstraksi dengan metanol 80%, selanjutnya dipartisikan dengan *n*-heksan-air dan dilanjutkan dengan *n*-butanol. Masing-masing ekstrak dipekatkan dengan *vacuum rotavapor* pada suhu 35° C (Ebel, 2003).

## Uji Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba dilakukan secara difusi cakram (*disc diffusion methode*) menurut Doughari (2006). Kemudian ditentukan konsentrasi hambat minimum/KHM (*Minimum Inhibitory Concentration/MIC*) menggunakan cara dilusi agar (Anonim, 2008; Choma, 2005) terhadap enam mikroba uji dilanjutkan fraksinasi berdasar aktivitas antimikroba secara bioautografi terhadap tiga jenis mikroba uji (Zheng, *et al.*, 2005; Choma 2005; Hostettmann, 1991). Medium pengujian digunakan *Saboroud 2% dextrose* agar untuk jamur dan nutrien agar untuk bakteri (Kareem *et al.*, 2008).

Streptomisin sulfat dan mikonazol, masing-masing digunakan sebagai senyawa pembandingan antibakteri (Horváth *et al.*, 2002) dan antifungi (Rahalison *et al.*, 1994). Streptomisin merupakan antibiotika aminoglikosida yang bersifat bakterisida pada sejumlah besar organisme Gram positif dan Gram negatif (Volk dan Wheeler, 1988). Streptomisin dapat menghambat mikroorganisme yang resisten terhadap sulfonamid dan penisilin (Pelczar *et al.*, 1993). Mikonazol, antijamur turunan imidazol, menghambat pertumbuhan atau menimbulkan kematian sel jamur diketahui memiliki selektivitas tinggi terhadap *C. albicans* ((Rahalison *et al.*, 1994).

Preparasi inokulum mikroba uji dilakukan dengan cara diambil satu Öse dari kultur persediaan setiap koloni, digoreskan di permukaan agar miring, selanjutnya diinkubasi 24 jam pada suhu 37–38° C untuk bakteri dan 32–33° C untuk jamur (Doughari, 2006). Biakan mikroba uji umur 24 jam ditambahkan 10 ml larutan natrium klorida 0,9% steril, dikocok dengan *vortex* sampai koloni mikroba tersuspensikan ke dalam larutan tersebut kemudian diukur transmisinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm dengan blanko larutan natrium klorida

0,9% steril sampai dicapai transmittansi 25% (Anonim, 1995). Jumlah mikroba yang terkandung dalam suspensi tersebut diperkirakan ekuivalen dengan  $3,0 \times 10^8$  CFU/ml (Rojas *et al.*, 2006).

Menurut Hernandez *et al.* (1999) untuk melarutkan senyawa/ekstrak yang sifatnya nonpolar, digunakan 20% larutan *tween* 20 dalam air. Preparasi larutan uji dilakukan sebagai berikut, setiap ekstrak ditimbang 100 mg dilarutkan dalam larutan *tween* 20 sebanyak 20% dalam air steril yang telah disiapkan dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml. Kemudian, diultrasonik secukupnya hingga larut, sehingga didapatkan larutan induk dengan kadar 20 mg/ml. Larutan diencerkan, hingga diperoleh konsentrasi 10 mg/ml dan 5 mg/ml. Ditetaskan  $10 \mu\text{l}$  larutan uji pada cakram kertas, diletakkan pada permukaan media yang telah diinokulasi dengan mikroba uji dan diamati daya hambatnya.

Penentuan KHM dilakukan secara dilusi agar, larutan ekstrak uji dituang ke media dalam cawan petri steril hingga didapatkan beragam konsentrasi ekstrak dalam media yaitu: 0,12 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,50 mg/ml; dan 1,0 mg/ml dan dengan cara yang sama 2,5 mg/ml hingga 7,5 mg/ml. Konsentrasi akhir *tween* 20 dalam media yang digunakan bervariasi 2–8%, diantisipasi sebagai kontrol pelarut (kontrol negatif). Replikasi dilakukan 3 kali. Kontrol positif digunakan streptomisin dan mikonazol dengan konsentrasi masing-masing 0,50 mg/ml dan 0,70 mg/ml dalam media, dilakukan juga kontrol inokulum (uji fertilitas) dan kontrol media (uji sterilitas media). *S. aureus* diinokulasikan pada area A, *E. coli* pada area B, *P. aeruginosa* pada area C, *S. typhimurium* pada daerah D, dan *B. subtilis* pada daerah E. *Candida albicans*, ditotolkan pada permukaan media Sabouraud Dextrose Agar. Diinkubasi pada  $37\text{--}38^\circ\text{C}$  dan untuk jamur *Candida albicans* pada suhu  $32\text{--}33^\circ\text{C}$  selama 24 jam (Doughari, 2006). Nilai KHM ditentukan bila terdapat hambatan pertumbuhan koloni mikroba atau tidak ada pertumbuhan mikroba pada konsentrasi terendah sampel.

### Uji Antimikroba dengan Bioautografi

Setiap ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan *n*-butanol dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT) terlebih dahulu pada lempeng KLT ( $10 \times 10$  cm) *Silicagel GF<sub>254</sub>*. Larutan uji dibuat dengan kadar 4000, 3000, 2000 dan 1000 ppm, masing-masing ditotolkan  $20 \mu\text{l}$  pada lempeng KLT, juga streptomisin sulfat sebagai kontrol positif ( $100 \mu\text{g}$ ). Ekstrak etil asetat dikembangkan dengan sistem pelarut kloroform:

metanol (9:1) v/v, ekstrak *n*-heksan dengan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (7:3)v/v, dan ekstrak *n*-butanol dengan kloroform : metanol : air (65 : 35 : 1)v/v. Selanjutnya lempeng hasil KLT dikeringkan dari pelarut pengembang dan diletakkan di atas media nutrient agar yang telah mengandung inokulum bakteri dengan transmittansi 25% pada panjang gelombang 580 nm dalam cawan petri. Bakteri uji digunakan tiga jenis yaitu: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis* FNCC 0059 ( $5 \mu\text{l}/15$  ml media). Selanjutnya cawan petri disimpan di lemari es selama sepuluh jam agar proses difusi senyawa dalam noda kromatogram ke dalam media uji sempurna. Lempeng KLT diangkat dari permukaan media agar dan diinkubasi 24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Diamati noda yang menunjukkan zona hambat pertumbuhan mikroba (Zheng *et al.*, 2005; Choma 2005).

### Analisis Fitokimia

Terhadap ekstrak etil asetat yang menunjukkan daya antimikroba dengan metode bioautografi dilakukan analisis fitokimia secara kromatografi lapis tipis. Penampak noda digunakan sinar ultraviolet dengan panjang gelombang 254 nm, pereaksi anisaldehyd-asam sulfat, sitrat-borat, *dragendorff* dan seri-sulfat untuk mengidentifikasi kemungkinan adanya senyawa aromatis, fenol dan polifenol, steroid, terpen, alkaloid dan flavonoid (Harborne, 1999; Gibbons dan Gray, 1998).

### HASIL

Kultivasi *Lecytophora* sp. strain 30.5, dari 30 l dihasilkan 9,93 g ekstrak etil asetat, dan dari biomassa kering jamur 60,73 g diperoleh 2,65 g ekstrak *n*-heksan dan 2,94 g ekstrak *n*-butanol. Kultivasi *Lecytophora* sp. strain 30.1, dari 32 l didapat 10,36 g ekstrak etil asetat, dan dari 44,54 g biomassa kering jamur didapatkan 1,87 g ekstrak *n*-heksan dan 2,09 g ekstrak *n*-butanol.

Hasil uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi cakram kertas terhadap ekstrak *Lecytophora* sp. strain 30.1 dan 30.5 dinyatakan dalam diameter zona hambatan (mm), disajikan dalam Tabel 1 dan 2. Hasil penentuan KHM dengan metode dilusi agar, pada konsentrasi 0,12–1,0 mg/mL ekstrak *Lecytophora* sp. strain 30.1 dan 30.5 tidak menghambat pertumbuhan mikroba, sehingga ditingkatkan pada kadar 2,5–7,5 mg/ml, dan hasilnya disajikan pada Tabel 3, 4, dan 5.

**Tabel 1.** Aktivitas antimikroba ekstrak *Lecythophora* sp. strain 30.1

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	18,56 ± 1,7	21,56 ± 1,4	-	-	12,74 ± 1,1	14,70 ± 1,2	15,30 ± 1,4
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	17,42 ± 1,3	22,00 ± 0,7	8,04 ± 0,6	8,60 ± 1,1	12,70 ± 1,4	15,20 ± 1,3	12,90 ± 1,3
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	19,12 ± 0,57	23,14 ± 1,9	-	-	11,78 ± 1,2	13,40 ± 1,1	11,20 ± 1,2
<i>S. typhimurium</i>	13,10 ± 2,0	17,04 ± 1,1	-	-	-	-	*
<i>B. subtilis</i> FNCC 0059	17,38 ± 1,6	21,64 ± 1,6	6,58 ± 0,7	7,90 ± 1,2	11,62 ± 0,9	14,40 ± 0,9	12,04 ± 0,8
<i>C. albicans</i>	*	*	*	*	*	*	*

Keterangan: E= ekstrak etil asetat, H= ekstrak n-heksan, B= ekstrak butanol, K+ = kontrol positif, - = tidak ada hambatan pertumbuhan, \* = tidak dapat diukur/tidak dilakukan,

**Tabel 2.** Aktivitas antimikroba ekstrak *Lecythophora* sp. strain 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 ± 1,4	21,50 ± 1,7	-	-	12,75 ± 1,1	14,75 ± 1,3	15,30 ± 1,4
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	17,40 ± 1,3	22,10 ± 1,9	8,00 ± 0,8	8,75 ± 0,9	12,70 ± 0,9	15,20 ± 1,5	12,90 ± 1,2
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	19,05 ± 2,1	23,04 ± 2,2	-	-	11,70 ± 0,9	13,20 ± 1,2	11,20 ± 1,3
<i>S. typhimurium</i>	13,00 ± 0,8	17,09 ± 1,8	-	-	-	-	*
<i>B. subtilis</i> FNCC 0059	17,20 ± 1,2	21,44 ± 2,3	6,50 ± 0,5	7,70 ± 0,6	11,55 ± 1,2	14,70 ± 1,6	12,24 ± 1,4
<i>C. albicans</i>	*	*	*	*	*	*	*

Keterangan: E= ekstrak etil asetat, H= ekstrak n-heksan, B= ekstrak butanol, K+ = kontrol positif, - = tidak ada hambatan pertumbuhan, \* = tidak dapat diukur/tidak dilakukan

**Tabel 3.** Aktivitas antibakteri ekstrak *Lecythophora* sp. strain 30.1

Bakteri	Ekstrak n-butanol (mg/ml)					Ekstrak etil asetat (mg/ml)					Ekstrak n-heksan (mg/ml)				
	1,0	2,5	3,5	5,0	7,5	1,0	2,5	3,0	3,5	5,0	1,0	2,5	3,5	5,0	7,5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> FNCC 0059	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	-	-	-	-	-

**Tabel 4.** Aktivitas antibakteri ekstrak *Lecythophora* sp. strain 30.5

Bakteri	Ekstrak n-butanol (mg/ml)				Ekstrak etil asetat (mg/ml)					Ekstrak n-heksan (mg/ml)			
	1,0	2,5	3,5	5,0	1,0	2,5	3,0	3,5	5,0	1,0	2,5	3,5	5,0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	±	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	-	-	±	+	+	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	±	+	+	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> FNCC 0059	-	-	-	-	-	-	±	+	+	-	-	-	-

**Tabel 5.** Aktivitas antifungi ekstrak *Lecytophora* sp. (terhadap *C. albicans*)

<i>Lecytophora</i> sp.	Ekstrak n-butanol (mg/ml)					Ekstrak etil asetat (mg/ml)					Ekstrak n-heksan (mg/ml)				
	1,0	2,4	3,6	4,8	7,2	1,0	2,4	3,6	4,0	4,8	1,0	2,4	3,6	4,0	4,8
Strain 30.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Strain 30.5	-	-	-	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Keterangan untuk tabel 3, 4 dan 5:

- : tidak ada hambatan pertumbuhan
- + : terjadi hambatan total
- ± : terjadi hambatan parsial
- : percobaan tidak dilakukan

Hasil uji aktivitas antibakteri dengan bioautografi, ekstrak etil asetat *Lecytophora* sp. strain 30.1 dan 30.5 terhadap tiga macam bakteri uji ditampilkan pada Tabel 6, sedangkan untuk ekstrak *n*-heksan dan ekstrak *n*-butanol

*Lecytophora* sp. 30.1 dan 30.5 negatif, ditunjukkan pada Tabel 7, Hasil KLT analisis fitokimia ekstrak jamur yang memiliki aktivitas antibakteri, setelah direaksikan dengan berbagai penampak noda disajikan pada Tabel 8,

**Tabel 6.** Hasil uji antibakteri ekstrak etil asetat *Lecytophora* sp. strain 30.1 dan 30.5 dengan bioautografi

Mikroba	Ekstrak etil asetat 30.1					Ekstrak etil asetat 30.5					Strepto-misin sulfat (µg)
	Jumlah yang ditotolkan (µg)					Jumlah yang ditotolkan (µg)					
	100	80	60	40	20	100	80	60	40	20	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>B. subtilis</i> FNCC 0059	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Keterangan:

- + : mempunyai aktivitas antibakteri
- : tidak mempunyai aktivitas antibakteri

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

Mikroba	Ekstrak heksan		Ekstrak butanol	
	Jumlah yang ditotolkan (100 µg)		Jumlah yang ditotolkan (100 µg)	
	30,1	30,5	30,1	30,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> FNCC 0059	-	-	-	-

Keterangan:

- + : mempunyai aktivitas antibakteri
- : tidak mempunyai aktivitas antibakteri

**Tabel 8.** Data Rf dan warna noda metabolit ekstrak etil asetat *Lecytophora* sp. 30.1 dan 30.5 dengan beragam pereaksi penampak noda

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



## PEMBAHASAN

Ekstrak etil asetat, *n*-heksan dan *n*-butanol *Lecythophora* sp. *strain* 30.1 dan 30.5 menunjukkan aktivitas antibakteri (Tabel 1 dan 2), Ekstrak etil asetat *Lecythophora* sp. *strain* 30.1 dan 30.5 secara difusi cakram menunjukkan aktivitas antimikroba dengan spektrum luas (*broad spectrum*) terhadap lima jenis mikroba uji, yaitu *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*, dan *Bacillus subtilis* FNCC 0059, Ekstrak *n*-heksan hanya aktif pada *Bacillus subtilis* FNCC 0059 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, sedang ekstrak *n*-butanol hanya tidak aktif pada *Salmonella typhimurium*, Ketiga jenis ekstrak *Lecythophora* sp. *strain* 30.1 dan 30.5 ternyata aktif terhadap bakteri Gram positif dan negatif.

Mikroba uji mewakili bakteri gram positif, gram negatif, serta jamur penyebab berbagai penyakit seperti infeksi saluran kemih, infeksi mata dan telinga (*Pseudomonas aeruginosa*), infeksi kulit, jerawat, bisul, *cystitis*, *pyelitis* (*Staphylococcus aureus*), infeksi pada penderita *imunocompromise* (*Bacillus subtilis*), diare dan gangguan pencernaan (*Escherichia coli*), demam tifoid, infeksi usus (*Salmonella typhimurium*), dan keputihan pada wanita atau kandidiasis (*Candida albicans*) (Hostettmann, 1991). Kepekaan *Pseudomonas aeruginosa* terhadap aktivitas antimikroba ekstrak endofit ini merupakan potensi penting sebagai bahan obat untuk melawan infeksi yang ditimbulkannya yang sering sulit di atasi seperti *mastitis* (Aliero dan Afolayan, 2006).

Awalnya uji aktivitas dilakukan dengan metode difusi cetak lubang, tetapi ternyata ekstrak *n*-heksan sulit berdifusi ke media agar meski telah digunakan pelarut pembantu *tween* 20 sebanyak 20%, sehingga akhirnya digunakan metode difusi cakram kertas dilanjutkan dengan dilusi padat untuk penentuan KHM, Hasil penentuan KHM (Tabel 3, 4 dan 5) ekstrak etil asetat *Lecythophora* sp. *strain* 30.1 dan 30.5 pada rentang konsentrasi 0,12–1,0 mg/mL belum memberi daya hambat, Dalam hal ini belum tentu ekstrak tersebut tidak aktif karena aktivitas dipengaruhi galur mikroba uji, pemilihan metode uji dan konsentrasi senyawa aktif di dalam ekstrak (Hostettmann, 1991; Kareem *et al.*, 2008), Ekstrak etil asetat *Lecythophora* sp. *strain* 30.1 pada konsentrasi 1,0 mg/ml mulai menghambat pertumbuhan *E. coli* secara parsial, karena itu dilakukan peningkatan konsentrasi hingga  $5,0 \times 10^3$  ppm dengan asumsi kadar bahan aktif dalam ekstrak relatif kecil dan juga terdapat publikasi yang mendukung hal ini (Aliero dan Afolayan, 2006).

Aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat *Lecythophora* sp. *strain* 30.1 menunjukkan lebih berpotensi terutama terhadap

*E. coli* yang tergolong gram negatif, juga dinyatakan oleh hasil KHM masing-masing pada mikroba uji, KHM ekstrak etil asetat *strain* 30.1 terhadap *E. coli* ATCC 25922 1,0 mg/ml sedangkan terhadap *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. typhimurium*, *S. aureus* ATCC 25923 dan *B. subtilis* FNCC 0059 adalah 2,5 mg/ml. KHM ekstrak etil asetat *strain* 30.5 terhadap *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. typhimurium*, *S. aureus* ATCC 25923 dan *B. subtilis* FNCC 0059 adalah 3,0 mg/ml. Ekstrak *n*-heksana dan *n*-butanol *strain* 30.1 maupun 30.5 hingga konsentrasi  $5,0 \times 10^3$  ppm tidak memberikan hambatan terhadap kelima bakteri uji.

Uji antifungi ekstrak etil asetat dan ekstrak *n*-heksan *Lecythophora* sp. 30.1 dengan *C. albicans* menunjukkan KHM 4,8 mg/ml, sedang ekstrak *n*-butanol dan ekstrak *n*-heksan 30.5 mempunyai KHM 4,8 mg/ml terhadap *C. albicans*. Ekstrak yang memiliki aktivitas antimikroba pada konsentrasi 1000 ppm potensial untuk dikembangkan sebagai antimikroba (Hoffman *et al.*, 1993), mengingat KHM ekstrak etil asetat 30.1 terhadap *E. coli* ATCC 25922 1,0 mg/ml maka ekstrak etil asetat *Lecythophora* sp. *strain* 30.1 berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai antimikroba baru.

Bioautografi, metode uji yang melokalisir aktivitas biologis pada kromatogram ideal untuk mendeteksi fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri yang masih berada dalam matriks ekstraknya (Rahalison *et al.*, 1994), Hasil KLT ekstrak etil asetat yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* ATCC 25922 dengan berbagai penampak noda menunjukkan Rf 0,33 (*strain* 30.1) dan 0,35 (*strain* 30.5) bisa jadi berasal dari senyawa yang sama atau kumpulan senyawa yang mirip karena pada penampak noda sinar uv  $\lambda$  254 nm, pereaksi anisaldehyd-asam sulfat, sitrat-borat dan seri-sulfat menunjukkan kesamaan warna noda, Senyawa kimia yang terkandung di dalamnya kemungkinan memiliki struktur aromatis, polifenol atau mirip flavonoid karena bereaksi positif dengan sinar uv  $\lambda$  254 nm, sitrat-borat dan dengan seri-sulfat berwarna kuning, Diperlukan isolasi senyawa yang aktif tersebut dan dilakukan elusidasi untuk menentukan strukturnya.

Bioautografi ekstrak etil asetat *Lecythophora* sp. *strain* 30.1 dan 30.5, menunjukkan daya antibakteri terhadap *E. coli* ATCC 25922 pada kadar terkecil 40  $\mu$ g/perspot, Menurut Rahalison *et al.*, (1994), pada uji bioautografi respon dapat diperhitungkan sebagai hasil yang bersifat semi kuantitatif. Batas deteksi (kadar terkecil yang diperlukan untuk menunjukkan adanya daerah hambatan pada *TLC-bioassay*) dapat menyatakan KHM atau *MIC* yang pada penelitian ini untuk ekstrak etil asetat *Lecythophora* sp.

*strain* 30.1 dan 30.5, diperoleh 40 µg/per *spot*. Ekstrak *n*-butanol maupun ekstrak *n*-heksan tidak menunjukkan daya antibakteri terhadap ketiga bakteri uji pada kadar 100 µg/per *spot* sehingga tidak perlu dilanjutkan pada kadar yang lebih kecil.

Metabolit yang berkhasiat antimikroba dari kedua jenis jamur endofit ini berpeluang untuk diisolasi, diuji, dan digunakan sebagai bahan obat dan biokontrol terhadap bakteri dan jamur patogen pada manusia, tumbuhan dan hewan. Apabila jamur endofit ini mampu memproduksi antibakteri atau antifungi walaupun kadarnya relatif kecil dapat diupayakan peningkatan kemampuan kapasitas pasokannya melalui beberapa cara yaitu, sintesis kimia total, semi sintesis, inovasi kultivasi biomasnya atau fermentasi, dan rekayasa genetika. Melalui rekayasa genetika, saat ini dapat dilakukan transfer kluster gen yang bertanggung jawab pada biosintesis metabolit tertentu ke vektor yang sesuai untuk difermentasikan dalam skala produksi (Proksch *et al.*, 2003; Proksch *et al.*, 2002; Moore dan Hertweck, 2002).

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan sebagai berikut. Ekstrak etil asetat *Lecythophora* sp. *strain* 30.1 dan 30.5 memiliki aktivitas antibakteri sedangkan ekstrak etil asetat dan *n*-heksan *strain* 30.1, ekstrak *n*-butanol dan *n*-heksan *strain* 30.5 aktif sebagai antijamur. KHM ekstrak etil asetat *strain* 30.1 terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 1,0 mg/ml sedangkan terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis* FNCC 0059 adalah 2,5 mg/ml. KHM ekstrak etil asetat *strain* 30.5 terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis* FNCC 0059 adalah 3,0 mg/ml. KHM ekstrak etil-asetat dan ekstrak *n*-heksan *Lecythophora* sp. *strain* 30.1 terhadap *Candida albicans* 4,8 mg/ml, sedang KHM ekstrak *n*-butanol dan ekstrak *n*-heksan 30.5 adalah 5,0 mg/ml.

Kerjasama berbagai disiplin ilmu dengan industri dibutuhkan untuk pengembangan lebih lanjut untuk dapat diproduksinya senyawa antimikroba dari jamur endofit ini.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Disampaikan terima kasih pada DP2M Dikti-Depdiknas Republik Indonesia yang mendukung dana penelitian ini melalui Program Penelitian Strategis Nasional tahun 2009.

## KEPUSTAKAAN

- Achmad SA, Hakim EH, Makmur L, Yuliawati LD, Syah YM, 2003. Ilmu Kimia dari Keanekaragaman Hayati Indonesia, *Simposium Nasional. Kimia Bahan Alam XIII*, Bandung.
- Anonim, 1977. *Materia Medika Indonesia*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. 1: 7–9.
- Anonim, 1995. *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. 855: 896–897.
- Anonim, 2008. *Antimicrobial Formulations*, World Intellectual Property Organization, <http://www.wipo.int/portal/index.html.en>.
- Aliero AA dan Afolayan AJ, 2006. Antimicrobial Activity of *Solanum tomentosum*, *African Journal of Biotechnology* 4: 369–72.
- Brunner F dan Petrini O, 1992. Taxonomy of some *Xylaria* sp. and Xylariceous Endophytes by Isozyme Electrophoresis. *Mycol. Res* 96: 723–33.
- Choma I, 2005. *The Use of Thin-Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis*. [www.lcgceurope.com/lcgceurope/artikel](http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/artikel).
- Doughari JH, 2006. Research Article Antimicrobial Activity of *Tamarandus indica* Linn, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 5: 597–603.
- Ebel R, 2003. *Heinrich Heine Institute of Pharmaceutical Biology*, University of Düesseldorf Germany, Personal communications.
- Gibbons S dan Gray AI, 1998. Isolation by planar chromatography dalam Channel, RJP, (ed.). *Natural Products Isolation*, Humana Press, New Jersey, 219–22.
- Harborne JB, 1999. *Phytochemical dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, 2<sup>nd</sup> Ed., Taylor and Francis Inc., Philadelphia: 222–490.
- Hernández MM, Heraso C, Villarreal ML, Vargas-Arispuro I, Aranda E, 1999. Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L., (Verbenaceae), *Journal of Ethnopharmacology* 67: 37–44.
- Hoffmann JJ, Timmermann BN, McLaughlin SP, Punnapayak H, 1993. Potential Antimicrobial Activity of Plants from the Southwestern United States, *International Journal of Pharmacognosy* 31: 101–15.
- Horváth G, Kocsis B, Botz L, Németh J, Szabó LG, 2002. Antibacterial activity of *Thymus* phenols by direct bioautography. *Acta Biologica Szegediensis* 46: 145–6.
- Hostettmann K, 1991. *Methods in Plant Biochemistry*. Institute of Pharmacognosy and Phytochemistry, Switzerland: 47–69.
- Huang Z, Cai X, Shao C, She Z, Xia X, Chen Y, Yang Y, Zhou S, Lin Y, 2008. Chemistry and weak antimicrobial activities of *phomopsins* produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. *Phytochemistry* 69: 1604–8.

- Kareem SO, Akpan I, dan Ojo OP, 2008. Antimicrobial activities of *Calotropis procera* on selected pathogenic microorganisms. *African Journal of Biomedical Research* 11: 105–10.
- Kitagawa I, Shibuya H, Beak NI, Yokokawa Y, Nitta A, Wiriadinata H, dan 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: 4232–5.
- Li JV, Strobel GA, Harper JK, Lobkovsky E, dan Clardy J, 2000. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*, *Organic Letters* 2: 767–70.
- Moore BS dan Hertweck C, 2002. Biosintesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units, *Natural Product Reports* 19: 70–99.
- Pelczar MJ, Chan ECS, dan Krieg NR, 1993. *Microbiology Concepts and Applications*. McGraw-Hill, Inc., New York 231, 566, 577–8.
- Proksch P, Edrada RA, dan Ebel R, 2002. Drugs from the Seas – Current Status and Microbiological Implications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 125–34.
- Proksch P, Ebel R, Edrada RA, Schupp P, Lin WH, Sudarsono, Wray V, dan Steube K, 2003. Detection of Pharmacologically Active Natural Products Using Ecology; Selected Examples from Indopacific Marine Invertebrates and Sponge-derived Fungi. *Pure Applied Chemistry* 75: 343–52.
- Rahalison L, Hamburger M, Monod M, Frenk E, dan Hostettmann K, 1994. Antifungal tests in phytochemical investigations; Comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. *Planta Med.* 60: 41–4,
- Rayner ADM, 1991. The Challenge of The Individualistic Mycelium. *Mycologia* 83: 48–71.
- Rojas JJ, Ochoa VJ, Ocampo SA, dan Munoz JF, 2006. Screening for Antimicrobial Activity of Ten Medicinal Plants Used in Colombian Folkloric Medicine: A Possible Alternative in The Treatment of Non-Nosocomial Infections, *Licensee BioMed Central* 67: 53–108.
- 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*. *Journal of Natural Product* 58: 1315–24.
- Strobel G, and Daisy B, 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products, *Microbiology and Molecular Biology Review* 67: 491–502.
- Strobel G, and Daisy B, Castillo U, Harper J, 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal Natural Product* 67: 257–68.
- Sugijanto NE, Diesel A, Ebel R, Indrayanto G, Cholies N, 2009. Chemical constituents of the endophytic fungus *Lecythophora* sp, isolated from *Alyxia reinwardtii*. *Natural Product Communications*, accepted for publication.
- Tan RX dan Zou WX, 2001. Endophytes a Rich Source of Fungsional Metabolites, *Natural Product Reports* 18: 448–59.
- Volk WA dan Wheeler MF, 1988. *Mikrobiologi Dasar* Jilid I. Edisi 5. Penerbit Erlangga, Jakarta: 185, 259.
- Yuliani S, 2001. Prospek Pengembangan Obat Tradisional Menjadi Obat Fitofarmaka. *Journal Litbang Pertanian* 20: 100–5.
- Zheng L, Chen H, Han X, Lin W, Yan X, 2005. Antimicrobial Screening and Active Compound Isolation from Marine Bacterium NJ6-3-1 Associated with The Sponge *Hymeniacidon perleve*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21: 201–6.

Reviewer: **Dr. Ni'matuzahroh**