



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**STUDI PERBANDINGAN MEDIA BIOPRODUKSI  
(+)-1,1'-BISLUNATIN DAN ANALISISNYA DENGAN  
MENGUNAKAN METODA HPLC**

**SKRIPSI**



**AZADLI DITO  
07132053**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2011**

**STUDI PERBANDINGAN MEDIA BIOPRODUKSI  
(+)-1,1'-BISLUNATIN DAN ANALISISNYA DENGAN MENGGUNAKAN  
METODA HPLC**

**Oleh:**

**AZADLI DITO**

**07 132 053**

**Skripsi ini diajukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan  
Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Andalas**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2011**

## LEMBARAN PENGESAHAN

**Studi Perbandingan Media Bioproduksi (+)-1,1'-Bislunatin Dan Analisisnya Dengan Menggunakan Metoda HPLC.** Skripsi oleh Azadli Dito (No. BP 07132053) sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (Strata 1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas.

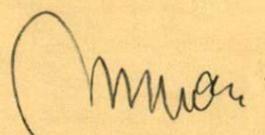
Disetujui oleh :

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Rahmiana Zein

NIP.195612251986032001



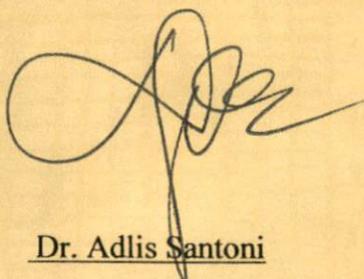
Dr. Andria Agusta

NIP. 196908161994031003

Mengetahui :

Ketua Jurusan Kimia

FMIPA Universitas Andalas



Dr. Adlis Santoni

NIP.196212031988111002

## Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah, segala puji bagi-Mu ya Allah berkat keagungan dan rahmat-Mu lah hamba dapat menyelesaikan studi S-1 Kimia ini. Dan atas kehendak-Mu lah semua mimpi ku terwujud. Terima kasih ya Allah aku dapat membahagiakan kedua orang tua ku tersayang.....

Ku hadiahkan karya kecil ini untuk:

1. Kedua orang tua ku, ibunda Yustidar dan ayahanda Zainuddin (Alm).
2. Para pembimbing ku [Ibu Prof. Dr. Rahmiana Zein; Bapak Dr. Andria Agusta; Bunda Marniati Salim, M.Si; dan Ibu Yuliasri Jamal, M.Sc], tanpa beliau mungkin saya tidak akan bisa menyelesaikan karya kecil ini. Terima kasih atas semua bimbingan dan limpahan ilmunya kepada saya. Semoga Allah SWT membalasnya dengan pahala dan keberkahan yang berlipat ganda kepada para pembimbing ku ini, Amien Ya Rabb...
3. Semua rekan kerja dan pegawai di laboratorium Biosains LPP PusLit Biologi Bogor, terima kasih atas semua semangat, pengorbanan, dan dukungannya dalam melakukan penelitian.
4. Untuk semua teman-teman yang tidak bisa disebutkan satu persatu namanya yang turut andil dalam kesuksesan saya dalam menyelesaikan studi S-1 ini.

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga dengan kerja keras penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul **“Studi Perbandingan Media Bioproduksi (+)-1,1'-Bislunatin Dan Analisisnya Dengan Menggunakan Metoda HPLC”**. Penyusunan skripsi ini merupakan suatu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (Strata 1) pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas. Dalam pelaksanaan penelitian maupun penyusunan skripsi ini penulis mendapatkan banyak masukan, bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak yang sangat bermanfaat baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada Ibu Prof. Dr. Rahmiana Zein sebagai pembimbing I dan Bapak Dr. Andria Augusta sebagai pembimbing II. Terima kasih yang setulusnya penulis ucapkan kepada Ibu Yuliasri Jamal, M.Sc, Bundo Marniati Salim, M.Si, Hj. Hertina, Dr. Praptiwi, Mas Arif Nurkanto, S.Si, Mas Ahmad Fahtoni, S.Si, Om Dr. Ary Keim, dan Kang Asep yang telah memberikan bantuan kepada penulis selama melakukan penelitian. Kemudian penulis juga memberikan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua yang telah memberikan dukungan yang tiada batasnya baik moril, maupun materil.
2. Kepala bidang bagian Botani LIPI Cibinong, Prof. Dr. Eko Baroto Walujo yang telah memberikan ijin dan kesempatan untuk melaksanakan penelitian.
3. Bapak Dr. Adlis Santoni sebagai Ketua Jurusan Kimia dan Bapak Dr. Mai Efdi sebagai Koordinator Pendidikan Jurusan Kimia FMIPA UNAND.
4. Bapak Prof. Dr. Hamzar Suyani sebagai Penasehat Akademik yang telah memberikan bimbingan, arahan serta dukungan selama penulis menempuh pendidikan di Jurusan Kimia FMIPA UNAND
5. Bapak-bapak dan ibu-ibu dosen Jurusan Kimia yang telah memberikan ilmu dan pengetahuan bagi penulis

6. Teman-teman seperjuanganku di Laboratorium Biosains dan Bioassay LIPI PusLit Biologi Bidang Botani (Shemy, Nila, Rahmi, Miftah, Ayu, Isma, Tiara, and *especially for* Anastiananda Rokhman ☺).
7. Keluarga besar So\_CH<sub>4</sub> (Kimia Angkatan 2007) yang telah memberikan dukungannya.

Demikian semoga skripsi ini dapat berguna dan memberikan kontribusi dalam perkembangan IPTEK, terutama dalam perkembangan penelitian mengenai eksplorasi, penemuan, dan bioproduksi senyawa bioaktif dari jamur endofit sebagai antibakteri, antijamur, dan antikanker.

Padang, Agustus 2011

Penulis

## ABSTRAK

### STUDI PERBANDINGAN MEDIA BIOPRODUKSI (+)-1,1'-BISLUNATIN DAN ANALISISNYA DENGAN MENGGUNAKAN METODA HPLC

Oleh:

Azadli Dito

**Sarjana Sains (S.Si) dalam bidang Kimia FMIPA Universitas Andalas  
Dibimbing oleh Prof. Dr. Rahmiana Zein dan Dr. Andria Agusta.**

(+)-1,1'-Bislunatin merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur endofit *Diaphorte* sp. yang berasosiasi dengan tumbuhan teh (*Camellia sinensis*). Senyawa ini telah diketahui sebelumnya memiliki aktivitas yang tinggi sebagai antikanker, antibakteri dan antijamur, sehingga potensial dijadikan sebagai kandidat obat baru. Tujuan penelitian ini adalah seleksi media produksi yang cocok untuk produksi senyawa (+)-1-1'-bislunatin, sehingga diperoleh kondisi produksi (+)-1-1'-bislunatin yang optimal. Penentuan kadar senyawa (+)-1-1'-bislunatin yang dihasilkan oleh jamur endofit *Diaporthe* sp. dari berbagai variasi media cair dilakukan dengan menggunakan metode *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC). Dari hasil penelitian, media yang menghasilkan produksi senyawa (+)-1-1'-bislunatin tertinggi terdapat pada media dengan komposisi tepung kentang+dekstrosa+H<sub>2</sub>O, yaitu sebesar 313,99 mg dalam setiap 1 L media cair tersebut.

## ABSTRACT

### THE COMPARATIVE STUDY OF THE BIOPRODUCTION MEDIA (+)-1,1'-BISLUNATIN AND ITS ANALYSIS USING HPLC METHOD

By

**Azadli Dito**

**Bachelor of Science in Chemistry Department, Faculty of Mathematic and  
Natural Science, Andalas University.**

**Advised by Prof. Dr. Rahmiana Zein and Dr. Andria Agusta**

(+)-1,1'-Bislunatin is one of secondary metabolite produced by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. associated with tea plant (*Camellia sinensis*). This compound has been previously known as anticancer, antibacterial, and antifungal agent with high activity, so that the compound has potentially as new drug candidate. The aim of this research is to screen suitable medium for optimum production of (+)-1,1'-bislunatin. Determination of quantity (+)-1,1'-bislunatin which is produced by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. in several liquid mediums were analyzed by *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) method. The results showed that cultivation in liquid medium with composition potatoes flour+dextrose+H<sub>2</sub>O gave the higher quantity of (+)-1,1'-bislunatin (313,99 mg for every 1 L).

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>i</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>ii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>x</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	2
1.4 Manfaat Penelitian .....	2
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Jamur Endofit .....	3
2.1.1 Jamur Endofit <i>Diaporthe</i> sp. ....	5
2.2 Media Produksi .....	5
2.3 (+)-1,1'-Bislunatin .....	6
2.4 Metode Analisis Kromatografi .....	7
2.5 Validasi Metode Analisis .....	10
2.5.1 Akurasi .....	11
2.5.2 Presisi .....	11
2.5.3 Linieritas dan Rentang .....	12
2.5.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantitas .....	13
2.5.5 Selektivitas .....	14
<b>BAB III. METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	15
3.2 Alat dan Bahan .....	15
3.2.1 Alat .....	15

3.2.2 Bahan .....	15
3.3 Prosedur Penelitian .....	16
3.3.1 Pembuatan Media Kultivasi Cair dan Kultivasi Jamur	
Endofit <i>Diaporthe</i> sp. ....	16
3.3.2 Ekstraksi Kultivasi Jamur .....	18
3.3.3 Pembuatan Larutan Induk (+)-1,1'-Bislunatin .....	18
3.3.4 Validasi Metoda Analisis (+)-1,1'-Bislunatin .....	18
3.3.4.1 Uji Linieritas dan Pembuatan Kurva Kalibrasi .....	18
3.3.4.2 Uji Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi .....	19
3.3.4.3 Uji Akurasi .....	19
3.3.4.4 Uji Presisi .....	19
3.3.4.5 Uji Selektivitas .....	20
3.3.5 Pembuatan dan Pengukuran Larutan Sampel Crude Ekstrak dari Kultivasi Jamur .....	20
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Produksi Ekstrak Kultur Jamur Endofit <i>Diaporthe</i> sp. ....	21
4.2 Validasi Metode Analisis .....	22
4.2.1 Uji Linieritas dan Pembuatan Kurva Kalibrasi .....	22
4.2.2 Uji Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi .....	23
4.2.3 Uji Akurasi .....	24
4.2.4 Uji Presisi .....	25
4.2.5 Uji Selektivitas .....	26
4.3 Pengukuran Kadar (+)-1,1'-Bislunatin Dalam Larutan Sampel <i>Crude</i> Ekstrak Dari Kultivasi Jamur .....	27
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan.....	31
5.2 Saran.....	32
<b>DAFTAR KEPUSTAKAAN .....</b>	<b>33</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>35</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Perbedaan sistem fasa terbalik dan normal .....	8
Tabel 2. Parameter untuk validasi metoda menurut USP dan ICH.....	11
Tabel 3. Kriteria penerimaan presisi .....	12
Tabel 4. Media produksi pada isolasi jamur endofit <i>Diaporthe</i> sp. ....	16
Tabel 5. Bobot ekstrak hasil produksi .....	21
Tabel 6. Hasil uji batas deteksi, batas kuantitasi, dan koefisien fungsi .....	23
Tabel 7. Hasil uji rata-rata akurasi .....	24
Tabel 8. Hasil uji rata-rata presisi .....	25
Tabel 9. Jumlah (+)-1,1'-Bislunatin dalam larutan sampel .....	30

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. (1) Antrakuinon, (2) Lunatin dan (3) (+)-1,1'-Bislunatin.....	7
Gambar 2. Jamur <i>Diaporthe</i> sp. ....	21
Gambar 3. Kurva Kalibrasi Linier (+)-1,1'-Bislunatin .....	23
Gambar 4. Kromatogram Standar (+)-1,1'-Bislunatin .....	26
Gambar 5. Kromatogram Campuran Standar (+)-1,1'-Bislunatin dan (+)-2,2'- Episitoskirin A.....	27
Gambar 6. Kromatogram Standar (+)-1,1'-Bislunatin .....	27
Gambar 7. Kromatogram <i>Crude</i> Ekstrak Kultur no. 3 .....	28
Gambar 8. Kromatogram <i>Crude</i> Ekstrak Kultur no. 2 .....	28
Gambar 9. Kromatogram <i>Crude</i> Ekstrak Kultur no. 5 .....	28
Gambar 10. Kromatogram <i>Crude</i> Ekstrak Kultur no. 6 .....	29
Gambar 11. Kromatogram <i>Crude</i> Ekstrak Kultur no. 1 .....	29

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Kultivasi Jamur Endofit <i>Diaporthe</i> sp. ....	35
Lampiran 2. Hasil Ekstraksi Jamur Dengan Etil Asetat-Aseton (7:1) .....	38
Lampiran 3. Uji Linieritas dan Pembuatan Kurva Kalibrasi .....	39
Lampiran 4. Uji Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi .....	40
Lampiran 5. Uji Akurasi .....	41
Lampiran 6. Uji Presisi .....	42
Lampiran 7. Uji Selektivitas .....	43
Lampiran 8. Cara Memperoleh Regresi Linier dari Persamaan Garis .....	44
Lampiran 9. Cara Perhitungan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi .....	45
Lampiran 10. Cara Perhitungan Simpangan Baku, % RSD, % <i>Recovery</i> , dan Kadar (+)-1,1'-Bislunatin dalam <i>Crude</i> Ekstrak .....	46
Lampiran 11. Profil Kromatogram Standar (+)-1,1'-Bislunatin dan Media Kultivasi.....	47

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Salah satu jenis jamur endofit yang diisolasi dari tumbuhan teh (*Camellia sinensis*) yaitu *Diaporthe* sp. telah diketahui memproduksi suatu metabolit sekunder dengan aktivitas yang luas dan kuat melawan bakteri patogen, jamur, dan sel kanker. Metabolit sekunder dari jamur endofit tersebut kemudian diidentifikasi sebagai (+)-1-1'-bislunatin. Jamur endofit berpotensi menghasilkan senyawa antimikroba, antikanker, antimalaria, antiHIV dan sebagainya<sup>1</sup>.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan tentang bioaktivitas senyawa (+)-1-1'-bislunatin, maka diperoleh hasil bahwa senyawa (+)-1-1'-bislunatin ini dapat menjadi kandidat antibakteri, antifungal, dan antikanker baru karena bioaktivitasnya yang kuat<sup>2,3,4</sup>.

Pada penelitian sebelumnya, medium kultivasi yang digunakan untuk jamur endofit *Diaporthe* sp. adalah medium PDA (*potatoes dextrose agar*) yang mampu menghasilkan 5,5 mg/L senyawa (+)-1,1'-bislunatin dalam jangka waktu satu bulan pada suhu ruang dengan kondisi inkubasi statis<sup>1</sup>. Namun medium PDA tersebut belum mampu memberikan produksi senyawa (+)-1,1'-bislunatin yang maksimal. Untuk itu sangat perlu dilakukannya optimalisasi bioproduksi terhadap senyawa (+)-1-1'-bislunatin, agar dapat meningkatkan ketersediaan dari senyawa (+)-1-1'-bislunatin ini.

Disamping optimalisasi bioproduksi senyawa (+)-1-1'-bislunatin, diperlukan juga suatu metode analisis kuantitatif terhadap senyawa (+)-1-1'-bislunatin, sehingga dapat digunakan untuk mengetahui kandungan senyawa (+)-1-1'-bislunatin oleh jamur endofit *Diaporthe* sp. dalam setiap produksinya. Salah satu metode analisis kuantitatif yang dapat digunakan dengan tingkat keakurasian, presisi, serta kesensitifan yang tinggi adalah metode RP-HPLC (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*).

## 1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada pendahuluan maka dapat dikembangkan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Apakah senyawa metabolit sekunder (+)-1,1'-bislunatin dapat ditingkatkan produksinya.
2. Apakah medium kultivasi cair yang dimodifikasi dapat digunakan sebagai medium produksi senyawa (+)-1,1'-bislunatin yang optimal, dimana hasil produksinya akan dibandingkan terhadap medium PDA.
3. Apakah analisis kuantitatif senyawa (+)-1,1'-bislunatin dapat dilakukan dengan menggunakan metode RP-HPLC (*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*).

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh media pertumbuhan yang baik bagi jamur endofit *Diaporthe* sp. untuk meningkatkan bioproduksi senyawa (+)-1-1'-bislunatin, dan penetapan kadar senyawa (+)-1-1'-bislunatin yang dihasilkan oleh jamur endofit *Diaporthe* sp. dengan menggunakan metode *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC).

## 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah dapat diperolehnya media pertumbuhan yang baik bagi jamur endofit *Diaporthe* sp. untuk meningkatkan bioproduksi senyawa (+)-1-1'-bislunatin, dan metode analisis secara kualitatif maupun kuantitatif untuk senyawa (+)-1-1'-bislunatin yang dihasilkan oleh jamur endofit *Diaporthe* sp.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Jamur Endofit

Endofit berasal dari bahasa Yunani, “endo” berarti di dalam dan “fit” (*phyte*) berarti tumbuhan. Jamur endofit merupakan jamur yang terdapat di dalam sistem jaringan tumbuhan, seperti daun, bunga, ranting ataupun akar tumbuhan<sup>5</sup>. Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit<sup>6</sup>.

Jamur endofit menginfeksi tanaman sehat pada jaringan tertentu selama periode tertentu dari siklus hidupnya yang dapat membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Golongan mikroba endofit ini terutama jamur endofit, merupakan sumber yang kaya akan metabolit sekunder. Jamur endofit mampu menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif, misalnya senyawa antibakteri, antifungi, antivirus, antikanker, antimalaria, dan sebagainya<sup>7</sup>.

Keuntungan dengan adanya jamur endofit pada tanaman inang adalah meningkatkan toleransi terhadap logam berat, meningkatkan ketahanan terhadap kekeringan, menekan serangan hama, resistensi sistemik terhadap patogen<sup>8</sup>.

Jamur endofit dapat diisolasi dari jaringan tanaman dan ditumbuhkan pada medium fermentasi tertentu. Di dalam medium fermentasi tersebut jamur endofit umumnya dapat menghasilkan senyawa sejenis yang terkandung pada tanaman inang dengan bantuan aktivitas suatu enzim. Endofit merupakan mikroba yang berkolonisasi dalam jaringan tumbuhan tanpa menyebabkan adanya gejala penyakit, kecuali jika inang atau tanaman berada dalam kondisi stres. Secara umum, ada tiga jalur infeksi mikroba endofit pada tanaman inangnya. Pertama adalah mikroba yang terdapat di udara yang akan masuk ke dalam jaringan tumbuhan melalui sistem respirasi pada organ yang berada di atas tanah. Yang kedua adalah mikroba yang berada di dalam tanah yang masuk melalui sistem penyerapan makanan pada akar yang berkontak langsung pada tanah. Dan yang ketiga adalah infeksi melalui luka yang terjadi pada organ tumbuhan<sup>9</sup>.

Hubungan yang terjadi antara jamur endofit dengan tumbuhan inangnya adalah simbiosis mutualisme yaitu hubungan yang saling menguntungkan antara keduanya. Jamur endofit dapat hidup karena mendapatkan nutrisi dan perlindungan dari tumbuhan inangnya, sedangkan tumbuhan inang akan mendapatkan sesuatu dari jamur endofit misalnya produksi hasil metabolit sekunder oleh endofit. Jamur endofit juga dapat meningkatkan element nutrisi bagi tumbuhan seperti nitrogen dan fosfor. Tanaman yang terinfeksi oleh mikroba endofit dapat meningkatkan ketahanannya terhadap hama dan alumunium yang bersifat toksik. Contohnya pada jamur endofit yang terinfeksi pada rumput dapat menghasilkan senyawa sekunder yang bermanfaat bagi makanan ternak<sup>10</sup>.

Asosiasi fungi endofit dengan tumbuhan inangnya digolongkan dalam dua kelompok, yaitu mutualisme konstitutif dan mutualisme induktif.

1. Mutualisme konstitutif

Merupakan asosiasi yang erat antara fungi dengan tumbuhan terutama rumput-rumputan. Pada kelompok ini fungi endofit menginfeksi ovula (benih) inang, dan penyebarannya melalui benih serta organ penyerbukan inang.

2. Mutualisme induktif

Asosiasi antara fungi dengan tumbuhan inang, yang penyebarannya terjadi secara bebas melalui air dan udara. Jenis ini hanya menginfeksi bagian vegetatif inang dan seringkali berada dalam keadaan metabolisme inaktif pada periode yang cukup lama<sup>11</sup>.

Kemampuan jamur endofit dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder dapat dilihat dari beberapa contoh penelitian di bawah ini :

1. Dua senyawa bisantrakuinon yaitu (+)-2,2'-episitoskirin dan (+)-1,1'-bislunatin dapat diproduksi dari jamur endofit *Diaporthe* sp. yang di isolasi dari tumbuhan teh (*Camellia sinensis*)<sup>12</sup>.
2. Jamur endofit *Penicillium* sp. yang berasosiasi dengan teh mampu memproduksi senyawa (-)-citrinin yang diekstrak etil asetat pada medium tumbuh *Potatoes Dextro Borth* (PDB)<sup>6</sup>.
3. Jamur endofit *Penicillium* sp. yang berasosiasi dengan tumbuhan *Melia azedarach* mampu menghasilkan empat senyawa meroterpen yaitu

austinoneol, 7- $\beta$ -asetoksi-dehidroaustin, neoaustin, degridoaustin yang diisolasi dari ekstrak metanol pada kultur nasi<sup>5</sup>.

### 2.1.1 Jamur Endofit *Diaporthe* sp.

Jamur *Diaporthe* sp. merupakan salah satu jamur endofit yang dapat diisolasi dari tanaman teh (*Camellia sinensis*) dan tanaman gambir (*Uncaria gambier*). Jamur endofit *Diaporthe* sp. memiliki miselia bewarna putih yang ditumbuhkan diatas medium *Potato Dextrose Agar* (PDA). Pada jamur ini diperoleh produksi metabolit sekunder dari golongan bis-antrakinon, yaitu (+)-2,2'-episitoskirin dan (+)-1,1'-bislunatin. Kedua senyawa tersebut mulai dibiosintesis selama satu minggu yang ditandai dengan perubahan warna koloni menjadi kuning<sup>1</sup>.

Selain menghasilkan senyawa metabolit bioaktif, jamur endofit *Diaporthe* sp. yang diisolasi dari tanaman teh, juga memiliki aktivitas biotransformasi terhadap senyawa (+)-katekin menjadi senyawa (+)-(2*R*,3*S*,4*S*)-3,4,5,7,3',4'-heksahidroksiflavan<sup>13</sup>.

## 2.2 Media Produksi

Media produksi adalah suatu bahan yang terdiri campuran zat-zat makanan (nutrisi) yang organisme untuk pertumbuhannya. Organisme memanfaatkan nutrisi media berupa molekul-molekul kecil yang dirakit untuk menyusun komponen selnya. Dengan media pertumbuhan dapat dilakukan isolat organisme menjadi kultur murni.

Bahan yang umum digunakan dalam pembuatan media produksi untuk pertumbuhan isolat suatu organisme adalah :

1. Agar, dapat diperoleh dalam bentuk batangan, granula atau bubuk dan terbuat dari beberapa jenis rumput laut. Kegunaannya sebagai pematat untuk pembuat media. Jika dicampur air dingin, agar tidak akan larut. Untuk melarutkan diperlukan pemanasan. Pencairan atau pematatan berkali-kali atau sterilisasi yang terlalu lama dapat menurunkan kekuatan agar, terutama pada pH yang asam.
2. Pepton adalah produk hidrolisis protein hewani atau nabati seperti otot, liver, darah, susu, kasein, laktalbumin, gelatin dan kedelai.

Komposisinya tergantung bahan asalnya dan bagaimana cara memperolehnya.

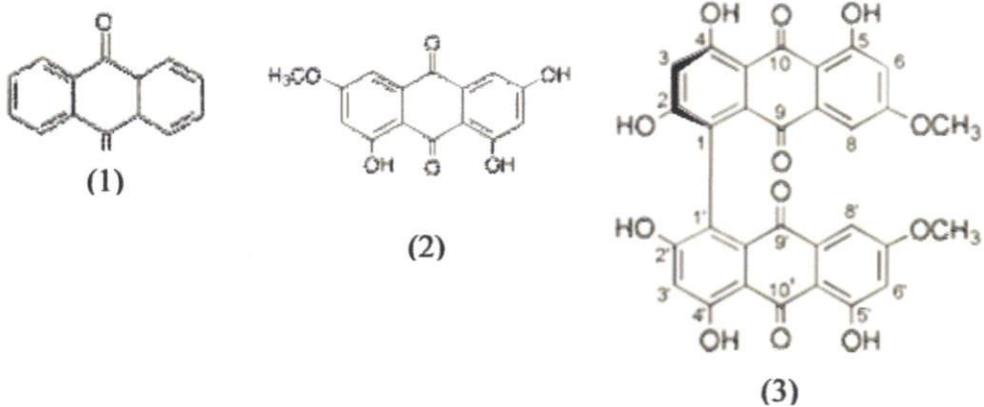
3. Ekstrak ragi (*Yeast Extract*), terbuat dari ragi pengembang atau pembuat alkohol. Ekstrak ragi mengandung asam amino yang lengkap dan vitamin (B-kompleks).
4. Karbohidrat, ditambahkan untuk memperkaya pembentukan asam amino dan gas dari karbohidrat. Jenis karbohidrat yang umum digunakan adalah amilum, glukosa, sukrosa.

Macam-macam media pertumbuhan berdasarkan sifat fisiknya terbagi menjadi tiga yaitu :

1. Media padat yaitu media yang mengandung agar 15% sehingga setelah dingin media menjadi padat.
2. Media setengah padat yaitu media yang mengandung agar 0,3-0,4% sehingga menjadi sedikit kenyal, tidak padat, tidak begitu cair. Media semi solid dibuat dengan tujuan supaya pertumbuhan mikroba dapat menyebar ke seluruh media tetapi tidak mengalami pencampuran sempurna jika tergoyang. Media setengah padat juga bertujuan untuk mencegah/menekan difusi oksigen, misalnya pada media *Nitrate Broth*, kondisi anaerob atau sedikit oksigen meningkatkan metabolisme nitrat tetapi bakteri ini juga diharuskan tumbuh merata diseluruh media.
3. Media cair yaitu media yang tidak mengandung agar, contohnya adalah NB (*Nutrient Broth*), LB (*Lactose Broth*), dan lain-lain<sup>14</sup>.

### 2.3 (+)-1,1'-Bislunatin

Senyawa metabolit sekunder (+)-1,1'-bislunatin merupakan golongan senyawa bisantrakuinon. Bisantrakuinon termasuk ke dalam golongan antrakuinon, dimana bentuk strukturnya adalah bentuk dimerik dari senyawa antrakuinon. Dalam hal ini, senyawa (+)-1,1'-bislunatin merupakan bentuk dimerik dari senyawa lunatin. Berikut ini adalah struktur senyawa-senyawa tersebut:



**Gambar 1.** (1) antrakuinon, (2) lunatin, dan (3) (+)-1,1'-bislunatin<sup>12</sup>.

Rumus molekul (+)-1,1'-bislunatin yaitu  $C_{30}H_{19}O_{12}$  dengan massa relatif  $m/z$  571 pada FAB-MS. Dalam bentuk bubuk, senyawa ini berwarna *orange* pekat. Senyawa ini telah diisolasi dari jamur endofit *Diaporthe* sp. yang telah berasosiasi dengan tanaman teh *Camellia sinensis*. Pada medium PDA, jamur endofit *Diaporthe* sp. menghasilkan 5,5 mg/L senyawa (+)-1,1'-bislunatin dalam jangka waktu satu bulan pada suhu ruang<sup>1</sup>.

#### 2.4 Metode Analisis Kromatografi

Kromatografi adalah suatu bagian teknik pemisahan komponen dalam suatu campuran pada fasa diam oleh fasa gerak. Dalam kromatografi terdapat tiga hal yang berperan penting yaitu fasa gerak, fasa diam dan analit dalam sampel yang akan dianalisis<sup>15</sup>.

Kromatografi terbagi atas dua jenis, yaitu kromatografi cair dan gas. Jenis kromatografi dapat digunakan tergantung pada jenis analit yang dianalisis. Pada analisis kadar senyawa (+)-1,1'-bislunatin yang digunakan adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau lebih dikenal dengan nama *high performance liquid chromatography* (HPLC). Sistem kromatografi ini sesuai untuk analisis senyawa yang tidak mudah menguap dan labil terhadap panas. Metode HPLC terbagi atas dua sistim, yaitu fasa terbalik dan sistim fasa normal, yang membedakan kedua sistim tersebut adalah kepolaran dari fasa gerak, fasa diam, dan analit yang dianalisis. Hal ini dapat dilihat dalam tabel 1.

Tabel 1. Perbedaan Sistem Fasa Terbalik dan Normal<sup>16</sup>

Komponen	Fasa terbalik	Fasa normal
Fasa diam	Non polar	Polar
Fasa gerak	Polar	Non polar
Analit	Polar	Non polar

Pemanfaatan kromatografi sangat luas untuk pemisahan analitik dan preparatif. Hampir semua molekul dari berat molekul rendah sampai tinggi dapat dipisahkan menjadi komponen-komponennya dengan metode kromatografi<sup>16</sup>. Kromatografi dapat bermanfaat sebagai cara untuk menganalisis suatu campuran menjadi komponen – komponen yang terdistribusi dalam dua fasa, yaitu fasa diam dan fasa gerak<sup>17</sup>. Salah satu teknik pemisahan yang baik digunakan untuk ekstrak jamur endofit *Diaporthe* sp. adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau lebih dikenal dengan metoda *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Hal ini dikarenakan senyawa-senyawa metabolit bisantrakuinon yang terdapat pada ekstrak jamur endofit *Diaporthe* sp. umumnya rentan terhadap suhu tinggi. HPLC akan lebih sesuai untuk isolasi senyawa yang tidak mudah menguap, dan juga untuk senyawa yang tidak tahan terhadap panas<sup>17</sup>. HPLC adalah salah satu metoda analisis kualitatif dan kuantitatif yang memiliki selektivitas, sensitivitas dan ketepatan yang cukup tinggi. Walaupun begitu masih diperlukan optimasi sehingga diperoleh hasil analisis yang valid dan absah.

Untuk mengetahui kinerja metode analisis yang digunakan, maka harus dilakukan validasi. Validasi metoda adalah konfirmasi melalui pengujian dan pengadaan bukti yang objektif bahwa persyaratan tertentu suatu maksud dipenuhi. Pada umumnya parameter validasi metoda meliputi presisi, *Limit of Detection* (LoD) atau batas deteksi, linearitas dan akurasi yang salah satunya dapat ditunjukkan dengan % *recovery* (perolehan kembali)<sup>18</sup>.

Metoda validasi yang dilakukan pada penelitian ini meliputi uji linieritas dan rentang, batas kuantitasi dan batas deteksi, akurasi, dan presisi. Dari hasil penelitian ini diharapkan mendapatkan hasil dengan nilai validitas yang memenuhi persyaratan, sehingga dapat digunakan untuk penetapan kadar senyawa

(+)-1-1'-bislunatin yang terdapat dalam setiap ekstrak kultur jamur endofit *Diaporthe* sp. dari berbagai medium produksi.

Menurut Edward L. Johnson dan Robert S, fasa gerak yang baik harus mempunyai sifat yang murni tanpa cemaran, tidak bereaksi dengan kemasan, sesuai dengan detector, dapat melarutkan cuplikan, mempunyai viskositas yang rendah, dan memungkinkan perolehan kembali cuplikan dengan mudah. Apabila syarat-syarat dari fasa gerak tersebut telah terpenuhi, maka akan memberikan hasil analisis yang baik. Dan dapat memberikan beberapa keuntungan penggunaan HPLC dengan analisis dilakukan dalam waktu cepat, daya pisahnya baik, kepekaan terhadap detektor spesifik, kolom HPLC dapat dipakai kembali, cocok untuk analisis senyawa bermolekul besar dan kecil, dan mudahnya memperoleh kembali cuplikan<sup>19</sup>.

Oleh karena itu, HPLC cukup efektif dari segi waktu karena pengujiannya tidak butuh waktu lama, zat yang dipakai cukup sedikit sehingga lebih efisien. Sistem HPLC yang dipakai dalam penelitian ini adalah HPLC fasa terbalik dengan kolom Shiseido<sup>TM</sup> LC-18 5 $\mu$ m (250 mm x 4,6 mm) yang merupakan fasa diam yang bersifat non polar. Pada sistem HPLC, data yang dihasilkan berupa kromatogram yang meliputi waktu retensi dan luas puncak. Analisis kualitatif dan kuantitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi dari area standar senyawa murni. Sistem peralatan HPLC pada umumnya terdiri dari pompa, injektor, kolom, detektor, dan integrator yaitu alat pembaca sinyal yang dihasilkan oleh detektor. Analisis HPLC dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif dengan cara :

#### 1. Analisis kualitatif

Cara yang terbaik adalah dengan menggunakan metode waktu relatif :

$$R_{i\text{st}} = \frac{t_{Ri}}{t_{Rst}}$$

Keterangan :  $t_{Ri}$  = waktu retensi komponen zat

$t_{Rst}$  = waktu retensi standar

Data waktu retensi khas tetapi tidak spesifik, artinya terdapat lebih dari satu komponen zat yang mempunyai waktu retensi yang sama.

## 2. Analisis kuantitatif

Tahapan analisis kuantitatif adalah sebagai berikut :

- a. Membuat spektrum serapan komponen-komponen yang ada dalam sampel.
- b. Mencari panjang gelombang optimum untuk campuran komponen zat dalam sampel.
- c. Mencari fase gerak yang sesuai agar komponen-komponen tersebut memisah ( $R \geq 1,5$ ).

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen yang dianalisis adalah dengan mengukur luas area atau tinggi puncaknya<sup>20</sup>.

### 2.5 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah proses yang dilakukan dengan kajian dilaboratorium yang membuktikan bahwa karakteristik kinerja metoda analisis telah memenuhi syarat sesuai dengan tujuan penggunaannya. Validasi metode sangat perlu dilakukan karena merupakan jaminan mutu hasil pengujian, sehingga dapat diterima oleh semua pihak<sup>21</sup>.

Suatu laboratorium harus memvalidasi metoda, baik untuk metoda baku maupun metoda yang tidak baku. Hal ini bertujuan untuk menegaskan dan mengkonfirmasi metoda yang digunakan sesuai dengan penggunaan yang dimaksud. Ada berbagai macam parameter yang digunakan untuk melakukan validasi metoda seperti tercantum pada tabel 2.

Tabel 2. Parameter untuk validasi metoda menurut USP (United States Pharmacopeia) dan ICH (International Conference on Harmonization)<sup>21</sup>

No	USP	ICH
1	Batas deteksi	Batas deteksi
2	Batas kuantifikasi	Batas kuantifikasi
3	Linearitas	Linearitas
4	Rentang	Rentang
5	Presisi (keseksamaan)	Presisi
6	Akurasi (kecermatan)	Akurasi
7	Spesifitas (kekhasan)	<i>Robustness</i>
8		Kesesuaian sistim

### 2. 5 .1 Akurasi (Kecermatan)

Akurasi/kecermatan adalah kedekatan antara nilai hasil uji yang diperoleh lewat metode analitik dengan nilai yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan dalam persen perolehan kembali (*%recovery*). Akurasi dapat ditentukan dengan dua metode, yakni *spiked-placebo recovery* dan *standard addition method*. Pada *spiked-placebo recovery* atau metode simulasi, analit murni ditambahkan (*spiked*) ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi, lalu campuran tersebut dianalisis dan jumlah analit hasil analisis dibandingkan dengan jumlah analit teoritis yang diharapkan. Jika plasebo tidak memungkinkan untuk disiapkan, maka sejumlah analit yang telah diketahui konsentrasinya dapat ditambahkan langsung ke dalam sediaan farmasi otentik. Metode ini dinamakan *standard addition method* atau metode penambahan baku<sup>20</sup>.

### 2. 5. 2 Presisi (Keseksamaan)

Presisi adalah tingkat kesesuaian antara hasil analisis individual yang dilakukan secara berulang. Dengan memperhatikan beberapa variabel yang dapat mempengaruhi hasil uji, maka presisi dapat dinyatakan sebagai repeatabilitas dan reproduksibilitas<sup>19</sup>.

Presisi dapat dinyatakan sebagai standar deviasi relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV). Tingkat keterimaan presisi yang ditunjukkan dengan besarnya RSD sesuai dengan kandungan analit yang dianalisis tercantum pada tabel 3.

Tabel 3. Kriteria Keterimaan Presisi<sup>17</sup>

Pengujian	Repeatabilitas dan presisi antara	
	Level dan rentang konsentrasi	Kriteria
Penetapan kadar/ keseragaman kandungan	3 level dengan 3 kali 70, 100, 130 % atau 6 kali penetapan pada 100 %	RSD $\leq$ 2,0 %
Disolusi	12 sampel kadar rendah	RSD $\leq$ 20 %
Cemaran	6 replikat pada LOQ	RSD $\leq$ 20,0 %
Cleaning	6 replikat pada 10 LOQ	RSD $\leq$ 20,0 %

### 2. 5. 3 Linieritas dan Rentang

Linearitas adalah kemampuan untuk memperoleh hasil uji yang secara langsung atau melalui transformasi matematik yang jelas, dan proposional terhadap konsentrasi analit dalam sampel<sup>20</sup>. Linearitas biasanya dinyatakan dalam persamaan matematik dari data yang diperoleh dengan berbagai konsentrasi analit. Evaluasi linearitas dilakukan melalui persamaan garis lurus dengan metoda kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit. Hubungan linear ditunjukkan dengan koefisien korelasi (r) pada persamaan  $Y = a + bx$ . Linearitas dianggap baik jika r mendekati 1.

Rentang adalah konsentrasi terendah dan tertinggi yang mana suatu metode analitik menunjukkan akurasi, presisi dan linieritas yang cukup. Rentang harus mencakup sekurang-kurangnya rentang hasil analisis yang diperlukan atau diharapkan dalam penelitian atau konsentrasi target uji<sup>22</sup>. Rentang suatu prosedur dapat divalidasi lewat pembuktian bahwa prosedur analisis tersebut mampu

memberikan presisi, akurasi dan linieritas yang dapat diterima ketika digunakan untuk menganalisis sampel<sup>23, 24, 25</sup>.

#### 2. 5. 4 Batas Deteksi dan Batas Kuantitas

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi criteria cermat dan seksama. Pada analisis instrument, batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko dan formula dibawah ini dapat digunakan untuk perhitungan.

$$Q = \frac{k \cdot S_b}{S_1}$$

Keterangan :

Q = LOD (batas deteksi) atau LOQ (batas kuantitasi)

k = 3 untuk batas deteksi atau 10 untuk batas kuantitasi

S<sub>b</sub> = Simpangan baku respon analitik dari blanko

S<sub>1</sub> = Arah garis linier (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis y = a + bx)

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistic melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier y = a + bx, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (S<sub>y/x</sub>)<sup>23, 24, 25</sup>.

#### 2. 4. 5 Selektivitas

Selektivitas atau spesifisitas suatu metoda adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan. Penentuan spesifisitas metode dapat diperoleh dengan dua jalan. Pertama adalah dengan melakukan optimasi, sehingga diperoleh senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa-senyawa lain. Cara kedua untuk memperoleh spesifisitas adalah dengan menggunakan detektor selektif, terutama untuk senyawa yang terelusi secara bersama-sama<sup>23,24,25</sup>.

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan Mei 2011, bertempat di Laboratorium Bioproses Pusat Penelitian Biologi-LIPI Cibinong, Bogor, Jawa Barat.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas (erlenmeyer, gelas piala, tabung reaksi, corong, gelas ukur, labu evaporator, corong pisah, pipet takar, pipet tetes, labu ukur), *autoclave* HI-Clave HVE-50 Hirayama, shaker inkubator (shaker Innova), *rotary evaporator*, *laminar air flow* CVB 1300 M, lampu UV *cabinet*, neraca analitik (AND HR 202), vortex (test tube mixer TTM-1 Sibata), parafilm, hot plate, lemari asam, tabung corning, mikropipet 1000  $\mu$ l, 200  $\mu$ l dan 10  $\mu$ l, mikro tips, *chamber*, *freezer* (-30°C), *freeze drying*, HPLC Shimadzu LC-20AB, kolom HPLC Shiseido LC-18 (25cm x 4,6 mm ; 5  $\mu$ m), pompa LC-10AD, UV-vis detector SPD-10A, auto injector SIL-10A, *syringe*, *syringe filter* diameter pori 0,45  $\mu$ m, *culture flask*.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah jamur endofit *Diaporthe* sp., metanol (Merck), etil asetat (Merck), diklorometan (Merck), aseton (Merck), koleksi standar senyawa murni (+)-1,1'-bislunatin, etanol 70 % (Merck), tepung kentang, dekstrosa (pabrik A, pabrik B), ekstrak ragi (*Yeast extract* ; Bacto), ekstrak gandum (*Malt extract* ; pabrik B), PDB (*Potatoes Dextrose Broth* ; pabrik B), gula pasir, pepton (Bacto), kalium hidrogen posfat (pabrik A), magnesium sulfat (pabrik A), besi (II) sulfat (pabrik A), kalsium karbonat (pabrik A), air suling, plat KLT.

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Pembuatan Media Kultivasi Cair dan Kultivasi Jamur Endofit *Diaporthe* sp.

Variasi media dalam produksi (+)-1,1'-bislunatin ini menggunakan 12 macam variasi media yang berbeda, kemudian diinkubasi dengan pengocokan 120 rpm selama 14 hari serta diamati pertumbuhannya setiap hari.

Tabel 4. Media Produksi pada Isolasi Jamur Endofit *Diaporthe* sp.

No. Media	Komposisi	Jumlah
1	Tepung kentang Gula pasir Air suling	0,8 g 4,0 g 200 mL
2	Tepung kentang Dekstrosa (Pabrik A) Air suling	0,8 g 4,0 g 200 mL
3	Tepung kentang Dekstrosa (Pabrik B) Air suling	0,8 g 4,0 g 200 mL
4	Ekstrak ragi ( <i>Yeast extract</i> ) Ekstrak gandum ( <i>Malt extract</i> ) Dekstrosa (Pabrik A) Air suling	0,2 g 0,2 g 4,0 g 200 mL
5	PDB ( <i>Potatoes Dextrose Broth</i> ) Air suling	4,8 g 200 mL
6	½ PDB ( <i>Potatoes Dextrose Broth</i> ) Air suling	2,4 g 200 mL
7	Pepton Ekstrak ragi ( <i>Yeast extract</i> ) Ekstrak gandum ( <i>Malt extract</i> ) Dekstrosa (Pabrik A) Air suling	1,0 g 0,6 g 0,6 g 4,0 g 200 mL

8	Pepton Ekstrak ragi ( <i>Yeast extract</i> ) 0,4 g Ekstrak gandum ( <i>Malt extract</i> ) 0,4 g Dekstroza (Pabrik B) 4,0 g Air suling 200 mL	
9	PDB ( <i>Potatoes Dextrose Broth</i> ) 0,096 g Dekstroza (Pabrik B) 3,92 g Air suling 200 mL	
10	PDB ( <i>Potatoes Dextrose Broth</i> ) 0,096 g Dekstroza (Pabrik A) 4,0 g Air suling 200 mL	
11	Dekstroza (Pabrik A) 4,0 g Ekstrak ragi ( <i>Yeast extract</i> ) 0,2 g Pepton 1,0 g Kalium Hidrogen Posfat 0,1 g Magnesium Sulfat 0,1 g Besi (II) Sulfat 0,002 g Kalسيوم Karbonat 0,2 g Air suling 200 mL	
12	Dekstroza (Pabrik B) 4,0 g Ekstrak ragi ( <i>Yeast extract</i> ) 0,2 g Pepton 1,0 g Kalium Hidrogen Posfat 0,1 g Magnesium Sulfat 0,1 g Besi (II) Sulfat 0,002 g Kalسيوم Karbonat 0,2 g Air suling 200 mL	

### **3.3.2 Ekstraksi Kultivasi Jamur**

Setelah 14 hari, dilakukan ekstraksi dengan pelarut etil asetat. Prosedur ekstraksi yang dilakukan adalah :

1. Masing-masing media ditambahkan pelarut etil asetat, kemudian aduk selama 15 menit.
2. Saring jamur yang telah diaduk tersebut. Cairan hasil saringan ditampung dalam wadah. Ekstraksi diulang sebanyak 3 kali pada masing-masing media.
3. Cairan hasil saringan dimasukkan ke dalam corong pisah, kocok kuat hingga terbentuk lapisan etil asetat dan air. Kemudian pisahkan, tampung lapisan etil asetat dalam labu evaporator.
4. Evaporasi lapisan etil asetat hingga terbentuk ekstrak kering, dan timbang bobot ekstrak.

### **3.3.3 Pembuatan Larutan Induk (+)-1,1'-Bislunatin**

Dibuat larutan standar (+)-1,1'-bislunatin dengan konsentrasi 2000 µg/mL dengan cara : ditimbang standar (+)-1,1'-bislunatin sebanyak 10 mg, lalu dimasukkan kedalam labu ukur volume 5 mL. Kemudian dilarutkan dengan menambahkan asetonitril hingga tanda batas.

### **3.3.4 Validasi Metoda Analisis (+)-1,1'-Bislunatin**

#### **3.3.4.1 Uji Linieritas dan Pembuatan Kurva Kalibrasi**

Dibuat seri larutan standar (+)-1,1'-bislunatin dengan konsentrasi 400 µg/mL, 800 µg/mL, 1200 µg/mL, 1600 µg/mL, dan 2000 µg/mL. Masing-masing seri larutan standar tersebut diinjeksikan sebesar 1 µL kedalam instrument HPLC pada kondisi terpilih. Dari data pengukuran dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan persamaan garis regresi linier ( $y = a + bx$ ). Linieritas dari kurva kalibrasi dilihat dengan menghitung koefisien korelasi ( $r$ ) dari persamaan garis linier.

#### 3.3.4.2 Uji Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

LOD dihitung melalui persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi, dengan rumus :

$$\text{LOD} = \frac{3 (S y/x)}{b}$$

Sedangkan nilai batas deteksi (LOQ) diperoleh dengan rumus :

$$\text{LOQ} = \frac{10 (S y/x)}{b}$$

Dimana ( $S_{y/x}$ ) adalah simpangan baku residual,  $b$  adalah slope dari persamaan regresi.

#### 3.3.4.3 Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan membuat campuran larutan ekstrak kasar media no. 10 yang telah diketahui konsentrasi (+)-1,1'-bislunatinnya yang ditambahkan dengan tiga variasi konsentrasi larutan standar (+)-1,1'-bislunatin (600  $\mu\text{g/mL}$ ; 1000  $\mu\text{g/mL}$ ; dan 1400  $\mu\text{g/mL}$ ). Larutan campuran tersebut diinjeksikan sebanyak 1  $\mu\text{L}$  ke dalam instrumen HPLC dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Penginjeksian diulangi sebanyak 3 kali untuk setiap variasi konsentrasi standar (+)-1,1'-bislunatin yang ditambahkan ke larutan ekstrak kasar. Kemudian ditentukan % perolehan kembali (% *recovery*) dari penambahan analit dan dibandingkan dengan persyaratan nilai perolehan kembali standar USP, yaitu 98-102%.

#### 3.3.4.4 Uji Presisi

Masing-masing larutan standar (+)-1,1'-bislunatin dengan konsentrasi 600  $\mu\text{g/mL}$ , 1000  $\mu\text{g/mL}$ , dan 1400  $\mu\text{g/mL}$  disuntikkan sebanyak 1  $\mu\text{L}$  ke dalam instrumen HPLC dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulangi sebanyak 3 kali untuk masing-masing variasi konsentrasi. Lalu dilakukan pengukuran intra-hari dan inter-hari (selama 3 hari berturut-turut), kemudian dihitung nilai simpangan baku relatif (RSD) dari masing-masing konsentrasi dan dibandingkan dengan nilai persyaratan standar USP, yaitu  $\leq 2\%$ .

#### 3.3.4.5 Uji Selektivitas

Di dalam labu ukur volume 5 mL, dicampurkan sebanyak 2,5 mL larutan standar (+)-1,1'-bislunatin yang mempunyai konsentrasi 600 µg/mL dengan 2,5 mL larutan standar (+)-2,2'-epitoskirin A yang mempunyai konsentrasi 800 µg/mL, lalu larutan campuran itu dikocok hingga homogen. Kemudian larutan campuran tersebut disuntikkan sebanyak 1 µL ke dalam instrumen HPLC dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih, dan penginjeksian diulangi sebanyak 6 kali. Kemudian dihitung nilai simpangan baku relatifnya (RSD) dan dibandingkan dengan nilai persyaratan standar USP, yaitu nilai  $RSD \leq 2\%$ .

#### 3.3.5 Pembuatan dan Pengukuran Larutan Sampel *Crude* Ekstrak dari Kultivasi Jamur

Masing-masing sampel *crude* ekstrak ditimbang 1 mg, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur volume 5 mL, kemudian dilarutkan dengan menambahkan asetonitril hingga tanda batas, sehingga terbentuk larutan-larutan sampel dengan konsentrasi 200 µg/mL. Masing-masing larutan sampel tersebut diinjeksikan ke HPLC dengan volume injeksi 10 µL sebanyak 3 kali pengulangan.

## BAB IV

### HASIL DAN DISKUSI

#### 4.1 Produksi Ekstrak Kultur Jamur Endofit *Diaporthe* sp.

Variasi media dalam produksi (+)-1,1'-bislunatin menggunakan 12 macam variasi media yang berbeda. Masing-masing media diinokulasikan jamur endofit *Diaporthe* sp., kemudian diinkubasi dengan pengocokan 120 rpm selama 14 hari, serta diamati pertumbuhannya setiap hari.



Gambar 2. Koleksi koloni jamur *Diaporthe* sp. pada media PDA di laboratorium bioproses

Tujuan dilakukannya 12 variasi media yang berbeda dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui pada media manakah yang memiliki produksi tertinggi terhadap senyawa (+)-1,1'-bislunatin tersebut. Kultivasi jamur berlangsung selama 14 hari hingga diperoleh produksi senyawa (+)-1,1'-bislunatin yang maksimal. Dan setelah 14 hari, dilakukan ekstraksi dengan pelarut etil asetat. Ekstraksi dengan pelarut etil asetat yang dilakukan sebanyak tiga kali diharapkan mampu menarik seluruh senyawa hasil metabolit sekunder yang diproduksi oleh jamur endofit *Diaporthe* sp.

Dari proses ekstraksi, diperoleh hasil bahwa ekstrak kasar terbanyak terdapat pada jenis media no. 7, yaitu sebesar 159,4 mg. Sedangkan hasil ekstrak kasar terkecil diperoleh dari jenis medium no. 12, yaitu sebesar 31,7 mg. Ekstrak-ekstrak tersebut kemudian dianalisis kuantitas kandungan senyawa (+)-1,1'-bislunatin dengan menggunakan alat HPLC. Data lengkap mengenai jumlah bobot ekstrak yang dihasilkan oleh masing-masing media dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Bobot ekstrak hasil produksi

No. Media	Bobot ekstrak
1	47.300 µg
2	139.300 µg
3	113.900 µg
4	92.600 µg
5	106.700 µg
6	53.800 µg
7	159.400 µg
8	90.100 µg
9	28.200 µg
10	16.000 µg
11	53.400 µg
12	31.700 µg

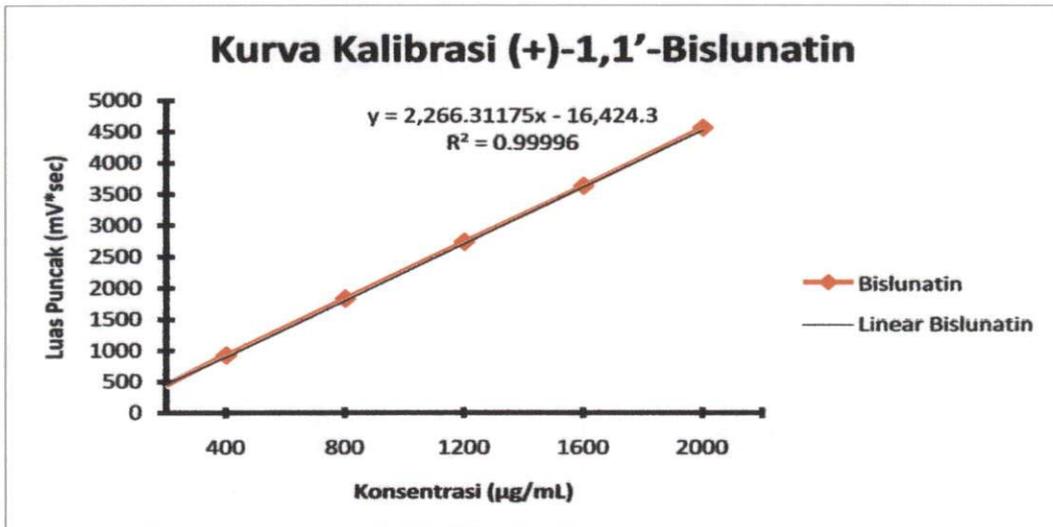
## 4.2 Validasi Metode Analisis

### 4.2.1 Uji Linieritas dan Pembuatan Kurva Kalibrasi

Uji dilakukan pada seri larutan standar (+)-1,1'-bislunatin dengan konsentrasi 400 µg/mL; 800 µg/mL; 1200 µg/mL; 1600 µg/mL; dan 2000 µg/mL. Dari uji ini akan didapatkan persamaan regresi linier dan koefisien korelasi (r). Kurva kalibrasi merupakan hubungan antara respon instrumen berupa luas area kurva dari analit terhadap konsentrasi dari analit. Suatu kurva kalibrasi yang baik akan menghasilkan nilai koefisien korelasi (r) mendekati 1, yang artinya peningkatan luas area kurva analit berbanding lurus dan signifikan dengan peningkatan konsentrasinya.

Pada penelitian ini, dilakukan pengukuran terhadap 5 seri larutan standar (+)-1,1'-bislunatin dengan rentang konsentrasi 400 µg/mL; 800 µg/mL; 1200 µg/mL; 1600 µg/mL; dan 2000 µg/mL, dan dihasilkan kurva kalibrasi dengan persamaan regresi  $Y = 2266,31175 (x) - 16424,3$  dan koefisien korelasi (r) 0,999982026 serta nilai koefisien variasi fungsi regresi ( $V_{Xo}$ ) sebesar 0,36%. Koefisien variasi fungsi regresi menunjukkan besarnya penyimpangan data yang dihasilkan dari data yang sebenarnya, semakin kecil nilai persen koefisien variasi

fungsi regresi maka artinya data yang diperoleh memiliki akurasi yang tinggi. Hasil ini memenuhi persyaratan untuk nilai koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar  $\geq 0,9990$  dan nilai koefisien variasi fungsi regresi ( $V_{xo}$ ) sebesar  $\leq 2\%$  (USP 23<sup>rd</sup> revision). Kurva kalibrasi dari persamaan garis tersebut terdapat dalam gambar 4. Data hasil percobaan selengkapnya tercantum pada lampiran 3.



Gambar 3. Kurva Kalibrasi Linier (+)-1,1'-Bislunatin

#### 4.4.2 Uji Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi adalah jumlah analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu terkuantitasi. Sedangkan batas kuantitasi menunjukkan batas jumlah analit terendah dalam sampel yang masih memberikan akurasi dan presisi yang baik jika dianalisis dengan metode tersebut.

Dari penelitian ini diperoleh batas deteksi sebesar 13,13 µg/mL dan batas kuantitasi sebesar 43,78 µg/mL. Data mengenai uji batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dilihat pada tabel 6 dan data hasil percobaan selengkapnya tercantum pada lampiran 4.

Tabel 6. Hasil uji batas deteksi, batas kuantitasi, dan koefisien fungsi regresi

Parameter	Nilai
Simpangan Baku Residual ( $S_{y/x}$ )	9923,25837
Standar Deviasi Fungsi ( $S_{xo}$ )	4,37859
Koefisien Fungsi Regresi ( $V_{xo}$ )	0,36%
Limit Deteksi (LOD)	0,01313577 µg
Limit Kuantitasi (LOQ)	0,04378593 µg

### 4.2.3 Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan pada 3 tingkatan konsentrasi larutan standar (+)-1,1'-bislunatin 600 µg/mL, 1000 µg/mL, dan 1400 µg/mL, yang masing-masingnya ditambahkan pada larutan ekstrak kasar media no. 10 (dengan konsentrasi larutan ekstrak kasar 200 µg/mL) yang sudah diketahui kadar (+)-1,1'-bislunatinnya (sebesar 22,937 µg/mL).

Akurasi adalah kedekatan hasil penetapan yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Akurasi ditentukan dengan menghitung beda antara kadar yang terukur dengan kadar yang sebenarnya. Uji akurasi yang dilakukan dengan mengukur larutan (+)-1,1'-bislunatin pada 3 level konsentrasi yang berbeda. Persyaratan yang ditentukan adalah % perolehan kembali berkisar antara 98-102% sesuai dengan parameter standar USP (*United States Pharmacopeia*)<sup>19</sup>. Dari konsentrasi 600 µg/mL diperoleh % perolehan kembali sebesar 100,49 % dan pada konsentrasi 1000 µg/mL diperoleh % perolehan kembali sebesar 99,99 %, sedangkan pada konsentrasi 1400 µg/mL diperoleh % perolehan kembali sebesar 99,35 %. Sehingga didapatkan % rata-rata perolehan kembali sebesar 99,94%. Hasil-hasil tersebut telah memenuhi persyaratan uji akurasi sesuai dengan parameter untuk validasi metoda menurut USP (*United States Pharmacopeia*), sehingga dapat dikatakan bahwa metode analisis ini telah akurat. Hasil uji rata-rata akurasi dapat dilihat pada tabel 7, dan data hasil percobaan selengkapnya tercantum pada lampiran 5.

Tabel 7. Hasil uji rata-rata akurasi

<b>Konsentrasi (+)-1,1'-Bislunatin Yang Terdapat Dalam Ekstrak Kasar 200 µg/mL (µg/mL)</b>	<b>Konsentrasi Standar (+)-1,1'-Bislunatin Yang Ditambahkan (µg/mL)</b>	<b>Konsentrasi (+)-1,1'-Bislunatin Yang Terukur Pada Alat (µg/mL)</b>	<b>% Recovery</b>
22,937	600	625,907	100,49
22,937	1000	1022,850	99,99
22,937	1400	1413,992	99,35
<b>% Rata-Rata Perolehan Kembali</b>			<b>99,94</b>

#### 4.2.4 Uji Presisi

Uji presisi dilakukan pada 3 konsentrasi larutan (+)-1,1'-bislunatin, yaitu 600 µg/mL, 1000 µg/mL, dan 1400 µg/mL yang dilakukan masing-masing sebanyak 3 kali penyuntikkan ke dalam alat HPLC untuk masing-masing konsentrasi. Pengujian presisi ini dilakukan intra-hari (dalam 1 hari) dan inter-hari selama 3 hari berturut-turut.

Presisi adalah tingkat kesesuaian antara hasil analisis individual yang dilakukan secara berulang. Dengan memperhatikan beberapa variabel yang dapat mempengaruhi hasil uji, maka presisi dapat dinyatakan sebagai repebilitas dan reproduksibilitas. Presisi dapat dinyatakan sebagai simpangan baku relatif (RSD). Uji presisi dilakukan intra-hari dan inter-hari, pada pengujian inter-hari yang dilakukan selama 3 hari berturut-turut dengan konsentrasi 600 µg/mL didapat RSD sebesar 0,603 %, pada konsentrasi 1000 µg/mL diperoleh RSD 1,444 %, dan pada konsentrasi 1400 µg/mL didapat RSD 1,017 %. Sedangkan pengukuran intra-hari juga didapatkan hasil RSD ≤ 2%. Pada uji presisi disyaratkan RSD ≤ 2%, dan hasil tersebut telah memenuhi syarat untuk uji presisi sesuai dengan parameter untuk validasi metoda menurut USP (*United States Pharmacopoeia*)<sup>19</sup>. Hasil uji rata-rata presisi dapat dilihat pada tabel 8, dan data hasil percobaan selengkapnya tercantum pada lampiran 6.

Tabel 8. Hasil uji rata-rata presisi

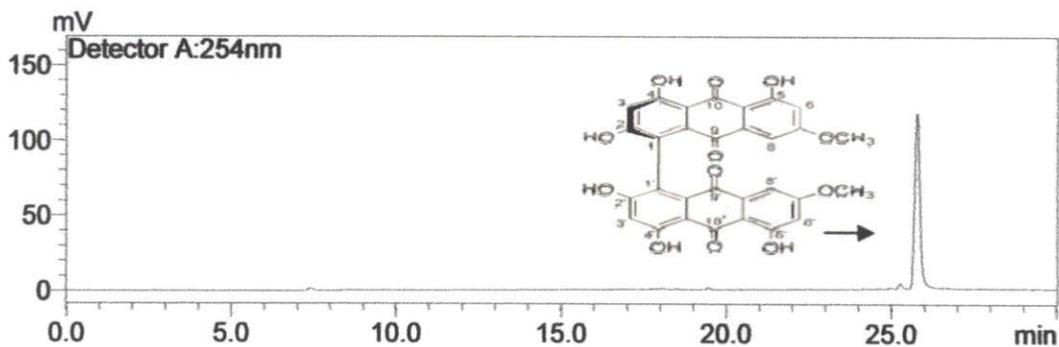
Konsentrasi (+)-1,1'-bislunatin (µg/mL)	Presisi Intra-hari (% RSD)	Presisi Inter-hari (% RSD)
600	0,768	0,603
1000	1,902	1,444
1400	0,545	1,017

#### 4.4.5 Uji Selektivitas

Uji selektivitas dilakukan terhadap senyawa (+)-1,1'-bislunatin dengan cara membuat larutan campuran standar (+)-1,1'-bislunatin yang mempunyai konsentrasi 600  $\mu\text{g/mL}$  (sebanyak 2,5 mL) dengan larutan standar (+)-2,2'-episitokirin A yang mempunyai konsentrasi 800  $\mu\text{g/mL}$  (sebanyak 2,5 mL) didalam labu ukur 5 mL. Kemudian sebanyak 1  $\mu\text{L}$  larutan campuran tersebut diinjeksi ke dalam instrumen HPLC.

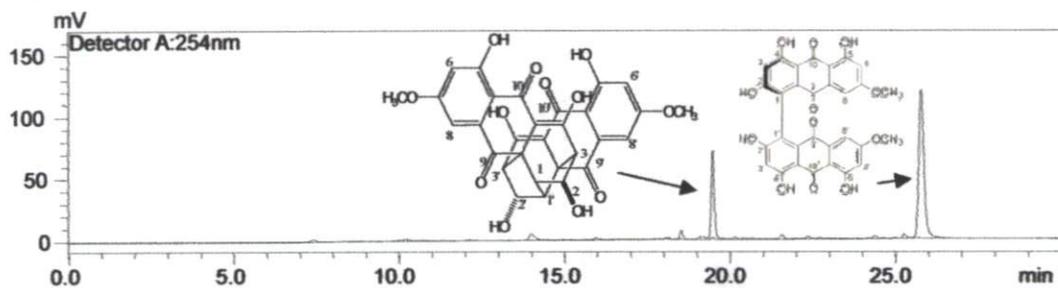
Selektivitas merupakan kemampuan untuk hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada di dalam matriks sampel. Melalui profil kromatogram larutan campuran tersebut akan dilihat apakah metode analisis ini sudah cukup selektif terhadap senyawa target (+)-1,1'-bislunatin, baik secara pemisahan terhadap komponen lain yang ada di dalam matriks sampel larutan campuran, maupun secara nilai RSD yang diperoleh dari hasil pengukuran instrumen.

Dari hasil percobaan, diperoleh nilai simpangan baku relative (% RSD) sebesar 0,79 % (persyaratan  $\leq 2\%$ ). Hasil ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan sudah cukup spesifik untuk menganalisa (+)-1,1'-bislunatin, karena telah memenuhi kriteria parameter persyaratan menurut USP (*United States Pharmacopeia*). Sedangkan dari profil kromatogram terlihat bahwa puncak senyawa target (+)-1,1'-bislunatin telah simetris dan terpisah dengan baik terhadap komponen lain di matrik sampel, sehingga dapat dikatakan bahwa metoda analisis ini telah selektif terhadap senyawa (+)-1,1'-bislunatin. Data hasil percobaan selengkapnya tercantum pada lampiran 7.



Gambar 4. Kromatogram standar (+)-1,1'-bislunatin dengan konsentrasi 600  $\mu\text{g/mL}$  pada waktu retensi 25,642 menit.



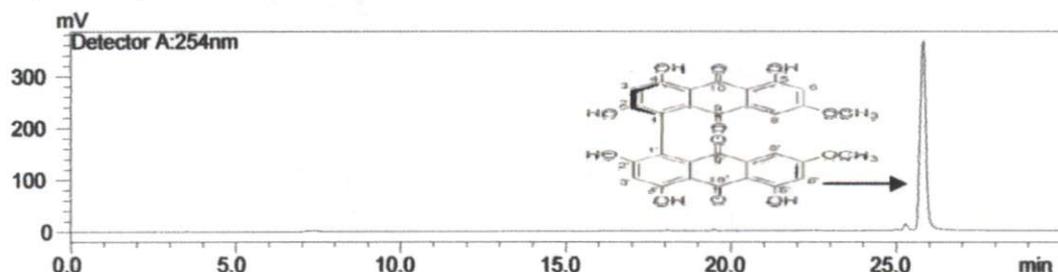


Gambar 5. Kromatogram larutan campuran standar (+)-1,1'-bislunatin 600 µg/mL (pada waktu retensi 25,642 menit) dengan standar (+)-2,2'-episitoskirin A 800 µg/mL (pada waktu retensi 19,561 menit).

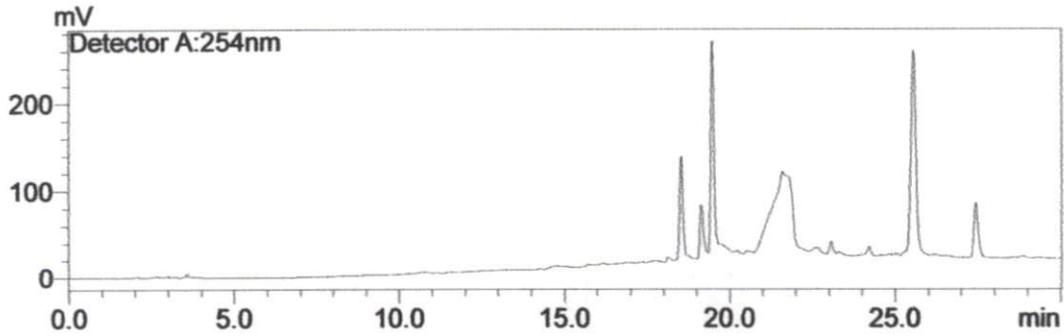
Hasil uji dari parameter validasi metode analisis yang telah dilakukan secara keseluruhan telah memenuhi persyaratan sesuai dengan parameter untuk validasi metoda menurut USP (*United States Pharmacopeia*). Hal ini menunjukkan bahwa metode analisis (+)-1,1'-bislunatin telah valid dan dapat digunakan untuk penetapan kadarnya dalam larutan sampel *crude* ekstrak dari kultur jamur endofit *Diaporthe* sp.

#### 4.3 Pengukuran Kadar (+)-1,1'-Bislunatin Dalam Larutan Sampel *Crude* Ekstrak dari Kultivasi Jamur

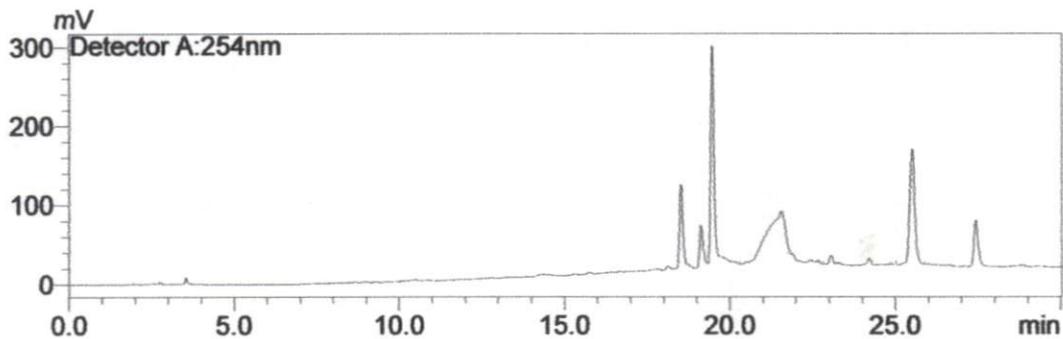
Dari percobaan yang telah dilakukan dengan menggunakan variasi 12 media cair yang komposisinya dimodifikasi, maka diperoleh hasil bahwa media yang memakai komposisi tepung kentang+dekstrosa (pabrik B) menghasilkan kadar (+)-1,1'-bislunatin tertinggi, yaitu sebesar 62,79 mg dalam setiap 200 mL media cair tepung kentang+dekstrosa (pabrik B). Sedangkan kadar (+)-1,1'-bislunatin pada medium tepung kentang+dekstrosa (pabrik A) hanya mencapai 46,01 mg dalam setiap 200 mL media cair tersebut. Hal ini disebabkan dekstrosa (pabrik B) lebih spesifik untuk kultur media pada mikrobiologi, sementara dekstrosa (pabrik A) lebih spesifik untuk biokimia.



Gambar 6. Kromatogram standar (+)-1,1'-bislunatin dengan waktu retensi 25,642 menit

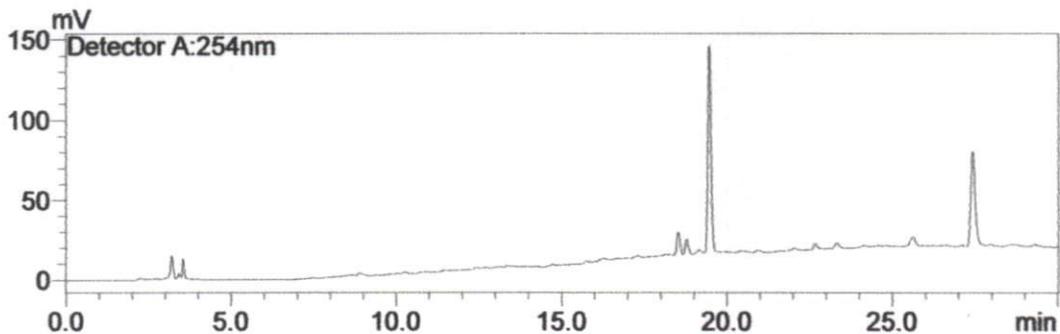


Gambar 7. Kromatogram *Crude Ekstrak Kultur no. 3* (tepung kentang+dektrosa pabrik B) Dengan kondisi operasional HPLC : kolom shiseido™ LC-18 (250 mm x 4,6 mm ; 5 μm), eluen asetonitril : H<sub>2</sub>O (1-70% asetonitril : H<sub>2</sub>O menggunakan sistem elusi gradien), suhu kolom 40°C, kecepatan alir 1 mL/menit, detektor UV dengan λ = 254 nm dan volume injeksi 10 μL.

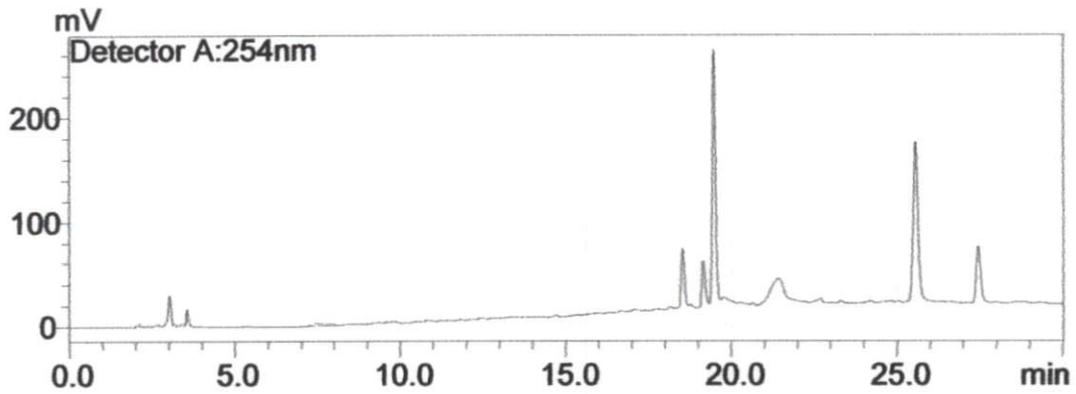


Gambar 8. Kromatogram *Crude Ekstrak Kultur no. 2* (tepung kentang+dektrosa pabrik A) Dengan kondisi operasional HPLC sama dengan gambar 7.

Pada media dengan PDB dan ½ PDB sama-sama menggunakan PDB yang diproduksi oleh pabrik B sebagai komposisi dari media, namun konsentrasi senyawa (+)-1,1'-bislunatin lebih banyak terdapat pada media nomor ½ PDB (18,48 mg) dibandingkan dengan media PDB (1,34 mg). Hal ini disebabkan produksi senyawa (+)-1,1'-bislunatin ini kurang cocok pada media yang mengandung PDB dengan komposisi lebih tinggi.



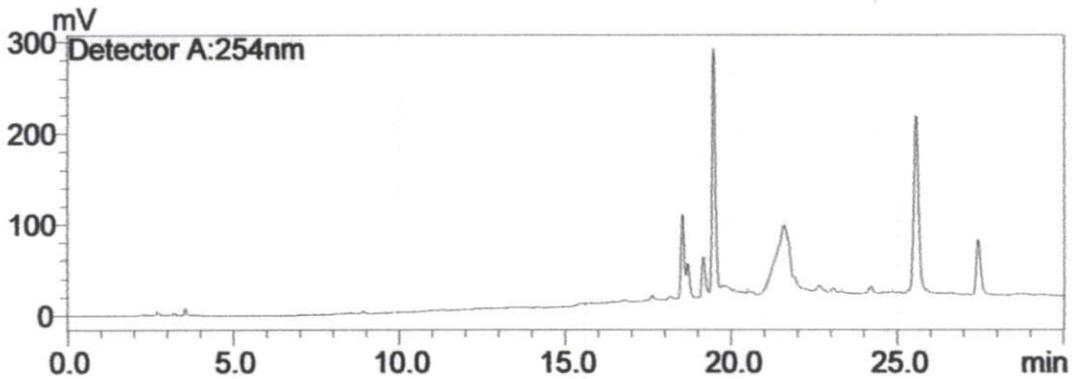
Gambar 9. Kromatogram *Crude Ekstrak Kultur no. 5* (PDB) Dengan kondisi operasional HPLC sama dengan gambar 7.



Gambar 10. Kromatogram *Crude Ekstrak Kultur no. 6 (1/2 PDB)*

Dengan kondisi operasional HPLC sama dengan gambar 7.

Sementara itu, media yang memakai komposisi tepung kentang+gula pasir memberikan kadar produksi senyawa (+)-1,1'-bislunatin yang cukup tinggi, yaitu sebesar 20,13 mg dalam setiap 200 mL media cair tersebut. Hasil tersebut dapat menjadikan media tepung kentang+gula pasir sebagai salah satu alternatif media produksi senyawa (+)-1,1'-bislunatin yang murah dan berlimpah.



Gambar 11. Kromatogram *Crude Ekstrak Kultur no. 1 (tepung kentang + gula pasir)*

Dengan kondisi operasional HPLC sama dengan gambar 7.

Tabel 9. Jumlah (+)-1,1'-bislunatin dalam larutan sampel

No. Medium	Bobot Ekstrak Dalam 200 mL Media Cair ( $\mu\text{g}$ )	Konsentrasi Bislunatin Dalam Larutan Sampel 200 $\mu\text{g/mL}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Jumlah Bislunatin Dalam 200 mL Kultur (mg)	Jumlah Bislunatin Dalam 1 Liter Kultur (mg)
1	47.300	85,15	20,13	100,69
2	139.300	66,07	46,01	230,08
3	113.900	110,27	62,79	313,99
4	92.600	3,06	1,41	7,08
5	106.700	2,51	1,34	6,70
6	53.800	68,71	18,48	92,41
7	159.400	0,40	0,318	1,59
8	90.100	2,99	1,34	6,73
9	28.200	45,63	6,43	32,17
10	16.000	22,93	1,83	9,17
11	53.400	2,09	0,55	2,79
12	31.700	3,01	0,47	2,38

Dari data tabel 9 di atas, maka media terpilih yang memiliki konsentrasi (+)-1,1'-bislunatin tertinggi terdapat pada media nomor 3, dengan komposisi tepung kentang+dekstrosa(pabrik B)+air suling dengan nilai konsentrasi (+)-1,1'-bislunatin 110,27  $\mu\text{g/mL}$  dalam setiap 200  $\mu\text{g/mL}$  larutan sampel ekstrak kasar media nomor 3 tersebut. Data penelitian dari tabel diatas juga menunjukkan bahwa media cair yang dimodifikasi dapat meningkatkan produksi senyawa metabolit sekunder (+)-1,1'-bislunatin dengan hasil yang signifikan dibandingkan dengan media PDA, terutama media cair nomor 3, yaitu media cair dengan komposisi tepung kentang+dekstrosa(pabrik B)+air suling.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 KESIMPULAN

1. Senyawa metabolit sekunder (+)-1,1'-bislunatin dapat ditingkatkan produksinya dengan menggunakan medium cair yang dimodifikasi.
2. Medium cair yang memiliki produksi senyawa (+)-1,1'-bislunatin tertinggi adalah medium nomor 3 (tepung kentang+dektrosa pabrik B+air suling) dengan produksi 313,99 mg dalam setiap 1 liter kultur medium tersebut.
3. Jenis gula yang memberikan produksi tertinggi adalah dektrosa dari pabrik B.
4. Kuantitas senyawa (+)-1,1'-bislunatin dalam setiap *crude* ekstrak medium cair dapat dianalisis secara kuantitatif dengan menggunakan metode RP-HPLC yang mempunyai tingkat akurasi, presisi dan kesensitifan yang tinggi, dengan kondisi analisis sebagai berikut :
  - Fase gerak : asetonitril : H<sub>2</sub>O (1-70% asetonitril : H<sub>2</sub>O dengan sistem elusi gradien)
  - Kolom : shiseido<sup>TM</sup> LC-18 (25 cm x 4,6 mm ; 5 µm)
  - Temperatur kolom : 40<sup>0</sup>C
  - Laju alir : 1 mL/menit
  - Detektor : UV
  - Panjang gelombang : 254 nm
  - Waktu retensi : 25,642 menit
5. Hasil validasi metode analisis (+)-1,1'-bislunatin memberikan hasil linieritas pada rentang konsentrasi 400-2000 µg/mL dengan koefisien korelasi (r) 0,99998, batas deteksi 13,13577 µg/mL, batas kuantitasi 43,78593 µg/mL, akurasi (% *recovery*) berkisar pada 99,35% hingga 100,49%, % RSD selektivitas sebesar 0,79%, dan % RSD presisi berkisar antara 0,610 – 1,903%.

## 5.2 SARAN

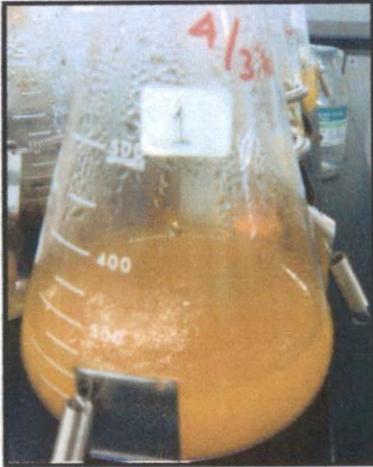
Disarankan untuk melanjutkan penelitian optimasi produksi (+)-1,1'-bislunatin pada medium cair tepung kentang + dekstrosa pabrik B dengan menggunakan alat *full automatic fermentor* terhadap variasi kondisi tumbuh untuk melihat kaitannya terhadap produksi (+)-1,1'-bislunatin.

## DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Agusta, Andria. *Biologi dan Kimia Jamur Endofit*. ITB Press. Bandung. 2009. Hal 58.
2. Putri, Frisna, D. *Studi Interaksi Senyawa (+)-2,2'-Episitoskirin A dan (+)-1,1'-Bislunatin dengan DNA*. Skripsi sarjana kimia. Universitas Andalas (2010).
3. Pardi, Kurnia, N. *Evaluasi Aktivitas Antimikroba Senyawa (+)-1,1'-Bislunatin dan Mekanisme Kerjanya*. Skripsi sarjana kimia. Universitas Andalas (2011).
4. Difia, Wimona, N. *Uji Antiproliferasi (+)-1,1'-Bislunatin Terhadap Berbagai Jenis Sel Kanker*. Skripsi sarjana kimia. Universitas Andalas (2010).
5. Regina, M. Geris dos Santos, dan Filho, E.R. *Structures of Meroterpenes Produced by Penicillium sp. an Endophytic Fungus Found Associated with Melia azedarach*. J. Braz. Chem. Soc. 2003. Hal. 722-727.
6. Agusta, A. dan Jamal, Y. *Produksi Metabolit Utama (-)-Citrinin Pada Kultur Jamur Endofit Penicillium sp. dari Tanaman Teh*. Biota. 2000. Hal. 164-168.
7. Strobel, G., dan B. Daisy. *Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 67. 2003. Hal. 491-502.
8. Clay, K. *Fungal Endophytes of Grasses : A Devesive Mutualism Between Plant and Fungi*. Ecology 69 (1) : 10-16. (1988).
9. Agusta, A. dan Jamal, Y. *Biodiversitas Jamur Endofit pada Tumbuhan Pandanus*, Laporan Teknik, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi LIPI. 2006. Hal 14-18.
10. Agusta, A. Oshashi, K. dan Shibuya, H. *Composition of The Endophytic Filamentous Fungi Isolated From Tea Plant Camelia sinensis*. J. Nat. Med, 2006. Hal. 268-272.
11. Carrol, G., *Fungal Endophytes in Stems and Leaves From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont*. Ecological Society of America. 1998. Hal. 69.

12. Agusta, A. Oshashi, K. dan Shibuya, H. *Bisanthraquinone Metabolites Produced by the Endophytic Fungus Diaporthe sp.* Chem Pharm Bull. 2006. Hal. 579-582.
13. Agusta, A. Maehara, S. Ahashi, K. Simanjuntak, P. dan Shibuya, H. *Stereoselective Oxidation at C-4 of Flavans by The Endophytic Fungus Diaporthe sp. Isolated from a Tea Plant.* Chem. Pharm. Bull. 2005. Hal. 1565-1569.
14. Scharlau. *Handbook of Microbiological Culture Media, 10<sup>th</sup> edition.* Scharlau Lab. Spain.
15. Braun, D. Robert. *Intoduction to Instrumental Analysis.* Mc graw Hill International Edition. University of Southwestern. Lousiana. 1983.
16. Gitter, J.R., Bobbit, M.J., dan Schwarting, E.A. *Kromatografi.* ITB Press. Bandung. 1991.
17. Khopkar, S.M. *Konsep Dasar Kimia Analitik.* Hal 168. UI Press. 1990.
18. Kantasubrata, J. Julia. *Validasi Metoda.* Pusat Penelitian LIPI Kimia. Bandung. 2005.
19. Jhonson, L. Edward, Robert Stevenson. *Dasar Kromatografi Cair.* ITB Press. Bandung. 1991.
20. Harmita. *Analisis Fisikokimia.* Departemen Farmasi FMIPA UI. 2006.
21. Ibrahim, Slamet. *Implementasi Validasi Pengujian Mutu Sediaan Farmasi Untuk Penjaminan Khasiat, Keamanan dan Mutunya.* Modul Penataran Sertifikasi Kompetensi Apoteker ISFI Jawa Barat. Jakarta. 2009.
22. Ermer, J. *Analytical Validation within the Pharmaceutical Environment.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Hal. 3-5. 2005.
23. United States Pharmacopeia. *The National Formulary. 30<sup>th</sup> Edition.* The United States Pharmacopeia Convention. 2007. Hal. 1407.
24. United States Pharmacopeia Convention. *The United States Pharmacopeia (USP), 30<sup>th</sup> Edition.* United States. 2006. Hal. 680.
25. United States Pharmacopeia 23<sup>rd</sup> revision. *Validation of Compendial Methods.* United States Pharmacopeia Convention, Rockville, MD, 1995. Hal. 1982.

**Lampiran 1. Hasil Kultivasi Jamur Endofit *Diaporthe* sp.**



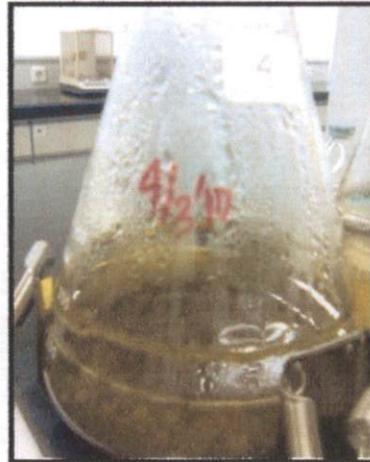
Tepung kentang+gula pasir  
+air suling



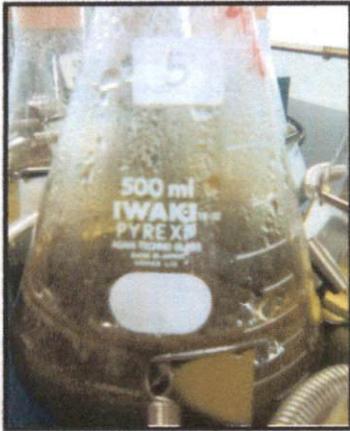
Tepung kentang+dekstrosa(Pabrik A)  
+air suling



Tepung kentang+dekstrosa(Pabrik B)  
+air suling



Ekstrak ragi+ekst. gandum+  
dekstrosa(Pabrik A)+air suling



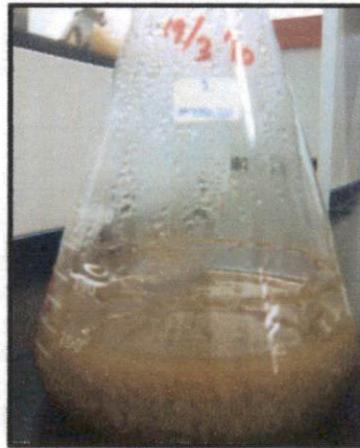
PDB (*Potatoes Dextrose Broth*)



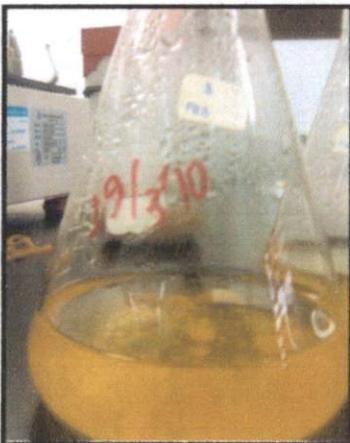
$\frac{1}{2}$  PDB (*Potatoes Dextrose Broth*)



Pepton+ekst.ragi+ekst.gandum+  
dekstrosa (Pabrik A)+air suling



Pepton+ekst.ragi+ekst.gandum+  
dekstrosa (Pabrik B)+air suling



PDB (*Potatoes Dextrose Broth*)+  
dekstrosa (Pabrik B)+air suling



PDB (*Potatoes Dextrose Broth*)+  
dekstrosa (Pabrik A)+air suling



Dextrosa (Pabrik A)+ekst.ragi+  
Pepton+Kalium Hidrogen Posfat+  
Magnesium Sulfat+Besi(II)Sulfat+  
Kalsium Karbonat+Air suling



Dextrosa (Pabrik B)+ekst.ragi+  
Pepton+Kalium Hidrogen Posfat+  
Magnesium Sulfat+Besi(II)Sulfat+  
Kalsium Karbonat+Air suling

**Lampiran 2. Hasil Ekstraksi Jamur Dengan Etil Asetat-Aseton (7:1)**



### Lampiran 3. Uji Linieritas dan Pembuatan Kurva Kalibrasi

Tabel 10. Data hasil uji linieritas

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas Puncak ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )
400	890447
800	1800842
1200	2703025
1600	3595887
2000	4525548

Keterangan :

- Persamaan garis :  $Y = 2266,31175 (x) - 16424,3$
- Koefisien korelasi (r) : 0,999982026
- Kondisi analisis ;
  - Fase gerak : asetonitril- $\text{H}_2\text{O}$  (1-70% asetonitril elusi gradient)
  - Kolom : shiseido<sup>TM</sup> LC-18 (25 cm x 4,6 mm ; 5  $\mu\text{M}$ )
  - Temperatur kolom : 40<sup>0</sup>C
  - Laju alir : 1 mL/menit
  - Detektor : UV
  - Panjang gelombang: 254 nm
  - Waktu retensi : 25,642 menit

#### Lampiran 4. Uji Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Tabel 11. Data hasil uji batas deteksi dan batas kuantitasi

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas Puncak ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ ) [Y]	Luas Puncak Berdasarkan Persamaan Regresi [Y <sub>1</sub> ]	[Y-Y <sub>1</sub> ]	[Y-Y <sub>1</sub> ] <sup>2</sup>
400	890447	890100,4	346,6	120131,56
800	1800842	1796625,1	4216,9	17782245,61
1200	2703025	2703149,8	-124,8	15575,04
1600	3595887	3609674,5	-13787,5	190095156,3
2000	4525548	4516199,2	9348,8	87400061,44
			<b>Jumlah</b>	<b>295413170</b>

$$S_{(y/x)} = \sqrt{\frac{\sum [Y-Y_1]^2}{N-2}} = \sqrt{\frac{295413170}{5-2}} = 9923,25837$$

$$S_{x_0} = \frac{(S_{y/x})}{b} = \frac{9923,25837}{2266,31175} = 4,378593$$

$$V_{x_0} = \frac{(S_{x_0})}{\bar{x}} \times 100\% = \frac{4,37859}{1200} \times 100\% = 0,36\%$$

$$\text{LOD} = \frac{3(S_{y/x})}{b} = \frac{3 \times (9923,25837)}{2266,31175} = 13,13577 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10(S_{y/x})}{b} = \frac{10 \times (9923,25837)}{2266,31175} = 43,78593 \mu\text{g/mL}$$

## Lampiran 5. Uji Akurasi

Tabel 12. Data hasil uji akurasi

Konsentrasi Baku/Standar yang Ditambahkan ( $\mu\text{g/mL}$ )	Konsentrasi Analit Sebelum Penambahan Baku ( $\mu\text{g/mL}$ )	Konsentrasi Analit yang Diperoleh Setelah Penambahan Baku ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas Puncak yang Terukur ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )	% Uji Recovery (%)	Rata-Rata % Uji Recovery (%)
600	22,937	631,187	1371673	101,33	100,44
		622,508	1352102	99,83	
		624,033	1355541	100,16	
1000	22,937	1013,448	2233715	99,05	99,99
		1010,371	2226776	98,74	
		1044,744	2304292	102,18	
1400	22,937	1406,764	3120689	98,84	99,35
		1413,310	3135451	99,31	
		1421,902	3154826	99,92	

**Lampiran 6. Uji Presisi**

Tabel 13. Data hasil uji presisi

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )		Luas Puncak ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )	Simpangan Baku (SD)		Simpangan Baku Relatif (% RSD)	
600	Hari ke 1	1371673	10449,02	8202,91	0,768	0,603
		1352102				
		1355541				
	Hari ke 2	1355917	9028,04			
		1350358				
		1368015				
Hari ke 3	1371787	7529,61				
	1361042					
	1357277					
1000	Hari ke 1	2233715	42891,32	32233,10	1,902	1,444
		2226776				
		2304292				
	Hari ke 2	2236312	24735,25			
		2197809				
		2190160				
Hari ke 3	2228476	7702,01				
	2240354					
	2225921					
1400	Hari ke 1	3120689	17120,36	31948,17	0,545	1,017
		3135451				
		3154826				
	Hari ke 2	3120925	56528,48			
		3218717				
		3120689				
Hari ke 3	3123976	1306,34				
	3126187					
	3126287					

## Lampiran 7. Uji Selektivitas

Tabel 14. Data hasil uji selektivitas

<b>Konsentrasi (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Luas Puncak (<math>\mu\text{V}\cdot\text{sec}</math>)</b>	<b>Simpangan Baku (SD)</b>	<b>Simpangan Baku Relatif (% RSD)</b>
600	1362543 1392187 1371293 1363083 1371179 1367950	10878,20	0,79

## Lampiran 8. Cara Memperoleh Regresi Linear dari Persamaan Garis

$$Y = a + bx$$

a dan b adalah bilangan normal, dihitung dengan metode kuadrat terkecil (*least square*).

$$a = \frac{(\sum yi) (\sum xi)^2 - (\sum xi)(\sum yi)}{N (\sum xi^2) - (\sum yi)^2}$$

$$b = \frac{N (\sum xi \cdot yi) - (\sum xi) (\sum yi)}{N (\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linieritas ditentukan berdasarkan nilai koefisien (r)

$$r = \frac{N (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)}{[(N (\sum x^2) - (\sum x)^2) (N (\sum y) - (\sum y)^2)]^{1/2}}$$

## Lampiran 9. Cara Perhitungan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

$$S_{(y/x)} = \sqrt{\frac{\Sigma [Y - Y_1]^2}{N - 2}}$$

dimana  $\hat{y}_1 = a + bx$

$$S_{x_0} = \frac{(S_{y/x})}{b}$$

dimana  $S_{x_0}$  = standar deviasi dari fungsi

$$V_{x_0} = \frac{(S_{x_0})}{\bar{x}} \times 100 \%$$

dimana  $V_{x_0}$  = koefisien variasi dari fungsi

$$\text{LOD} = \frac{3 (S_{y/x})}{b}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 (S_{y/x})}{b}$$

**Lampiran 10. Cara Perhitungan Simpangan Baku, Simpangan Baku Relatif (% RSD), % Recovery, dan Kadar (+)-1,1'-Bislunatin dalam Crude Ekstrak dari 200 mL Media Cair.**

a. Simpangan Baku (SD) :

Hasil analisis adalah  $x_1, x_2, x_3, x_4, \dots, x_n$ , maka simpangan bakunya adalah :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

b. Simpangan Baku Relatif (% RSD) :

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

$$c. \% Recovery = \frac{A - B}{\text{kadar baku yang ditambahkan}} \times 100\%$$

Keterangan : A = kadar analit yang diperoleh setelah penambahan baku

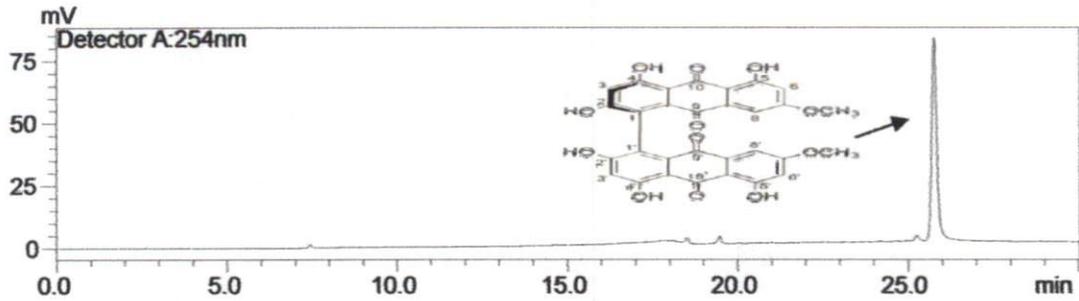
B = kadar analit sebelum penambahan baku

d. Kadar (+)-1,1'-Bislunatin dalam Crude Ekstrak dari 200 mL Media Cair :

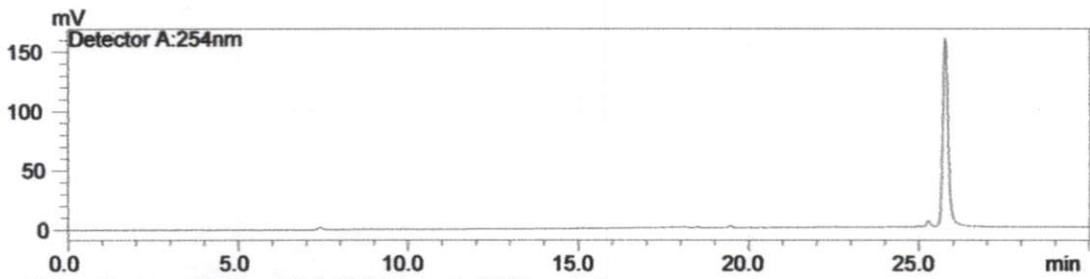
$$x \text{ mg analit} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{200 \mu\text{g/mL}} \times \text{kadar analit dalam lar. sampel} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}}$$

## Lampiran 11. Profil Kromatogram Standar (+)-1,1'-Bislunatin dan Media Kultivasi

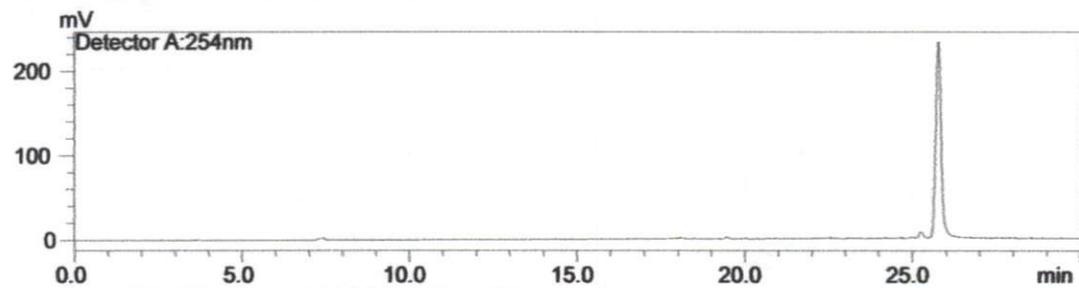
-Kromatogram standar (+)-1,1'-bislunatin 400 µg/mL :



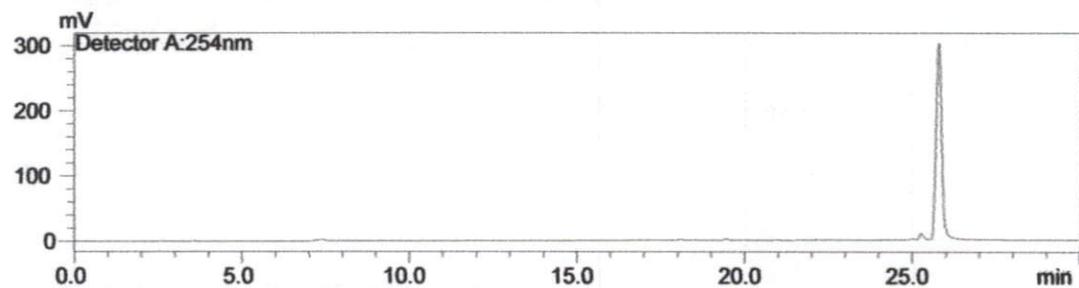
-Kromatogram standar (+)-1,1'-bislunatin 800 µg/mL :



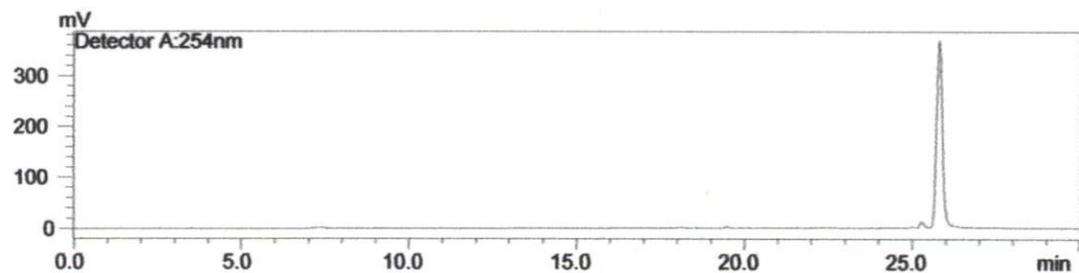
-Kromatogram standar (+)-1,1'-bislunatin 1200 µg/mL:



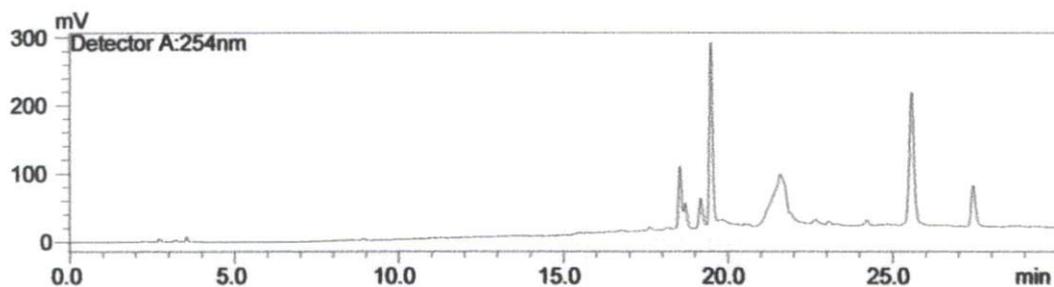
-Kromatogram standar (+)-1,1'-bislunatin 1600 µg/mL :



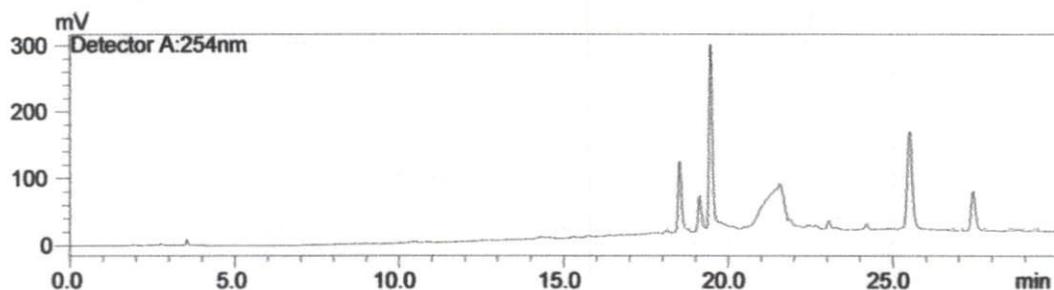
-Kromatogram standar (+)-1,1'-bislunatin 2000 µg/mL :



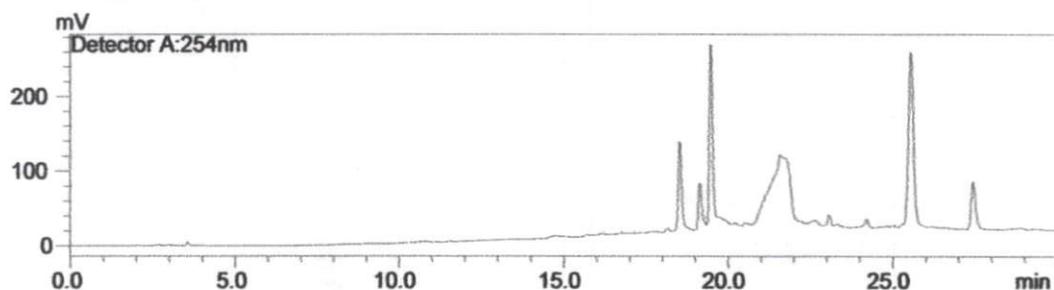
-Kromatogram media 1 :



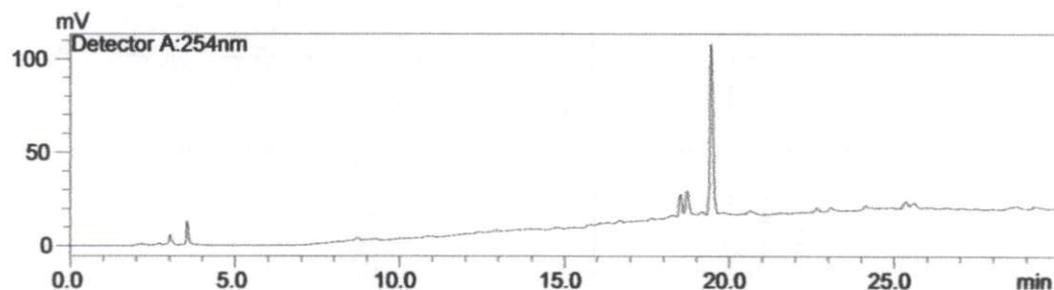
-Kromatogram media 2 :



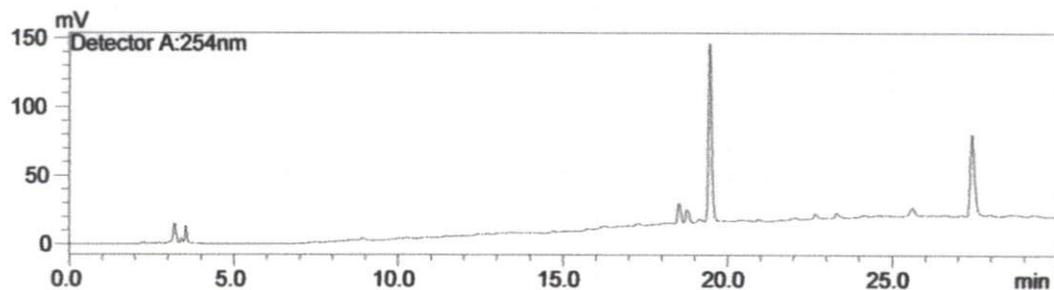
-Kromatogram media 3 :



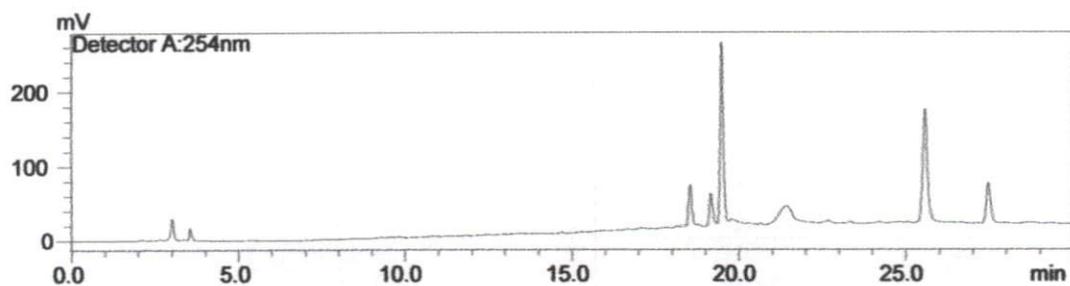
-Kromatogram media 4 :



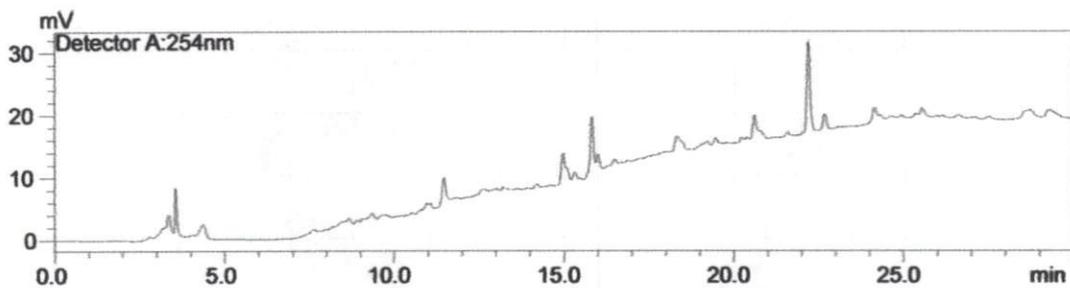
-Kromatogram media 5 :



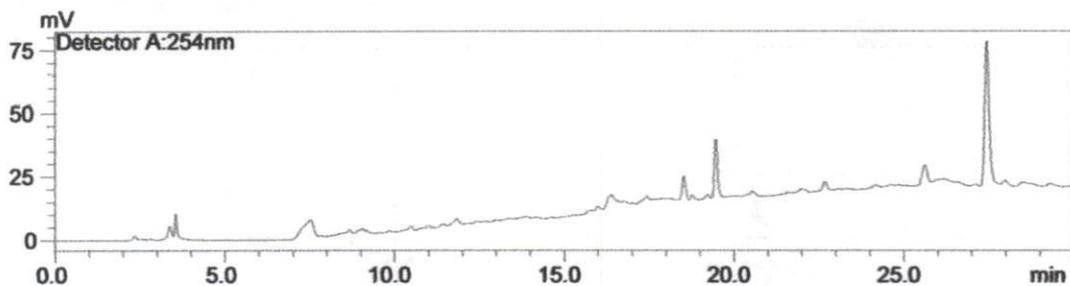
-Kromatogram media 6 :



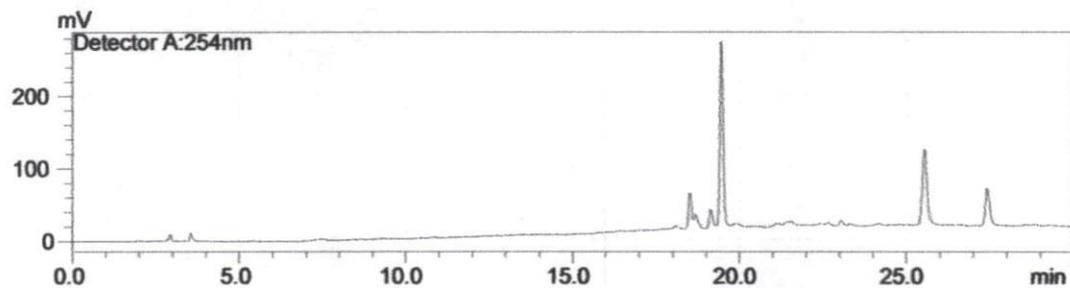
-Kromatogram media 7 :



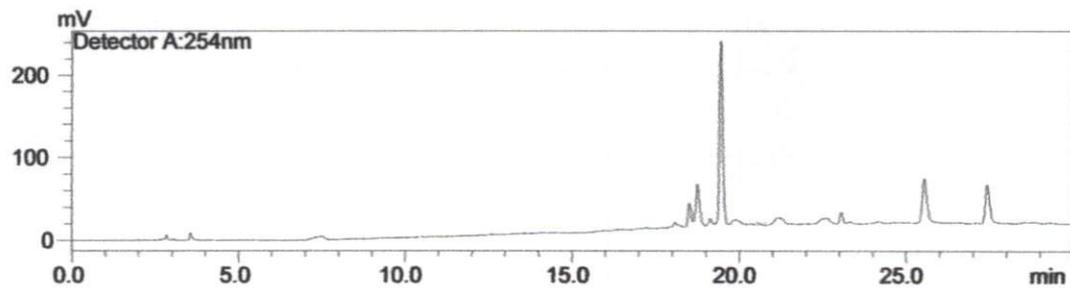
-Kromatogram media 8:



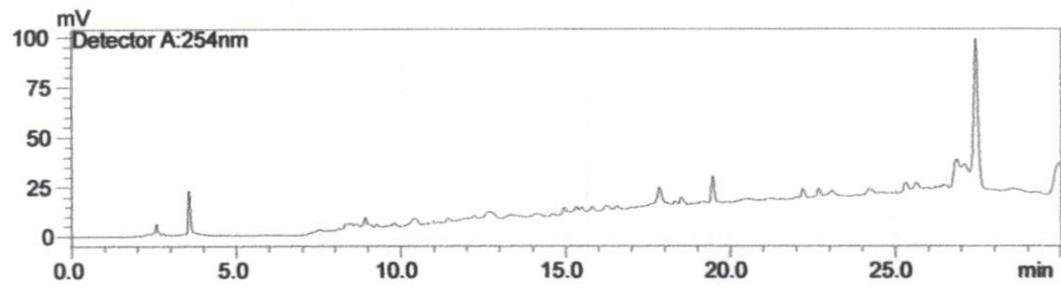
-Kromatogram media 9 :



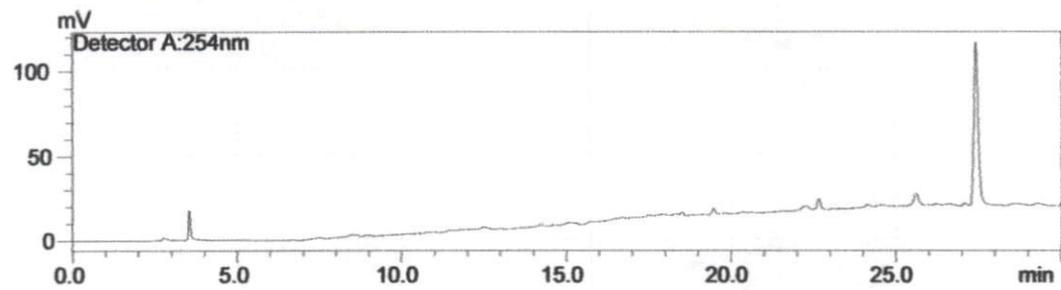
-Kromatogram media 10 :



-Kromatogram media 11 :



-Kromatogram media 12 :





**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**  
**( Indonesian Institute of Sciences )**  
**PUSAT PENELITIAN BIOLOGI**  
**( Research Center for Biology )**

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong  
Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

**SURAT KETERANGAN**

Saya selaku pembimbing menerangkan bahwa Mahasiswa (S1), Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Andalas:

Nama : Azadli Dito  
No. BP : 07 132 053

Telah melakukan penelitian selama 4 bulan terhitung mulai bulan Februari – Mei 2011 dengan judul: **Optimasi Produksi (+)-1,1'-Bislunatin Dalam Skala Laboratorium di Laboratorium Fitokimia, Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.**

Demikianlah surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Cibinong, 25 Mei 2011  
Laboratorium Fitokimia

Dr. Andria Agusta  
NIP. 196908161994031003