



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.

**ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA
METABOLIT SEKUNDER JAMUR ENDOFIT TCBP 4 DARI
TUMBUHAN BRATAWALI (*Tinospora crispa*)**

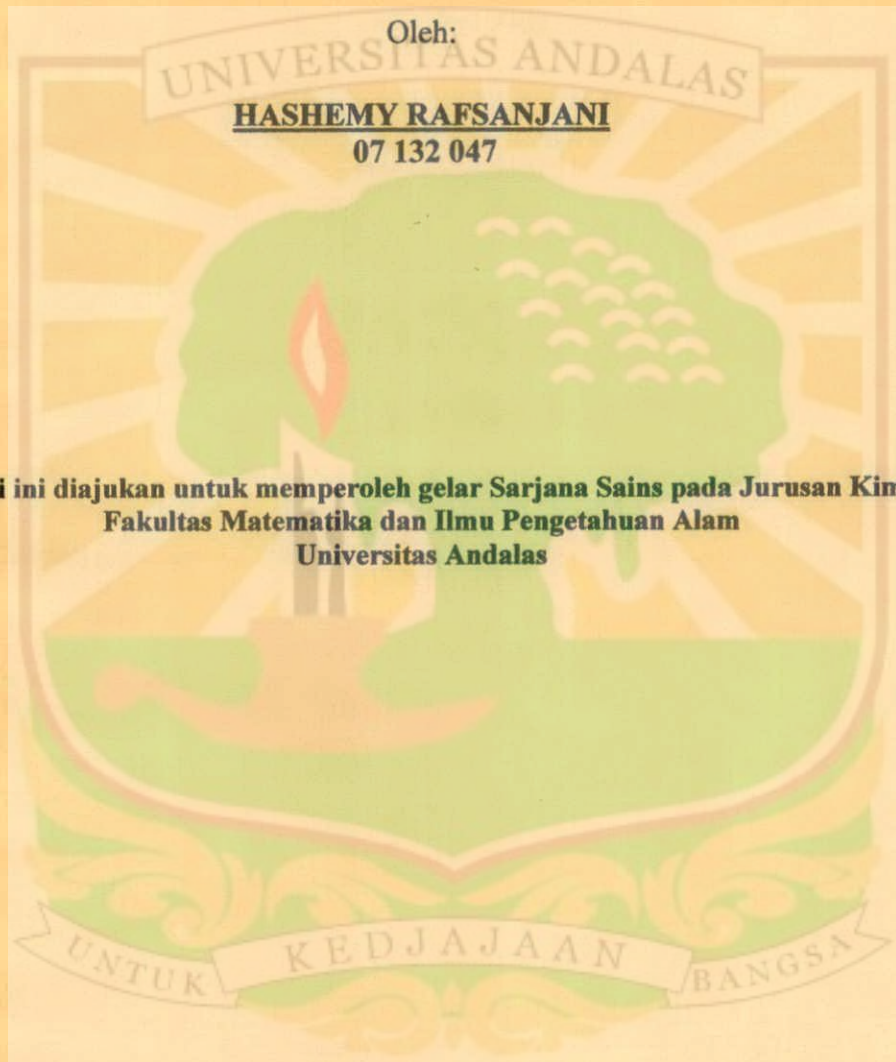
SKRIPSI



**HASHEMY RAFSANJANI
07 132 047**

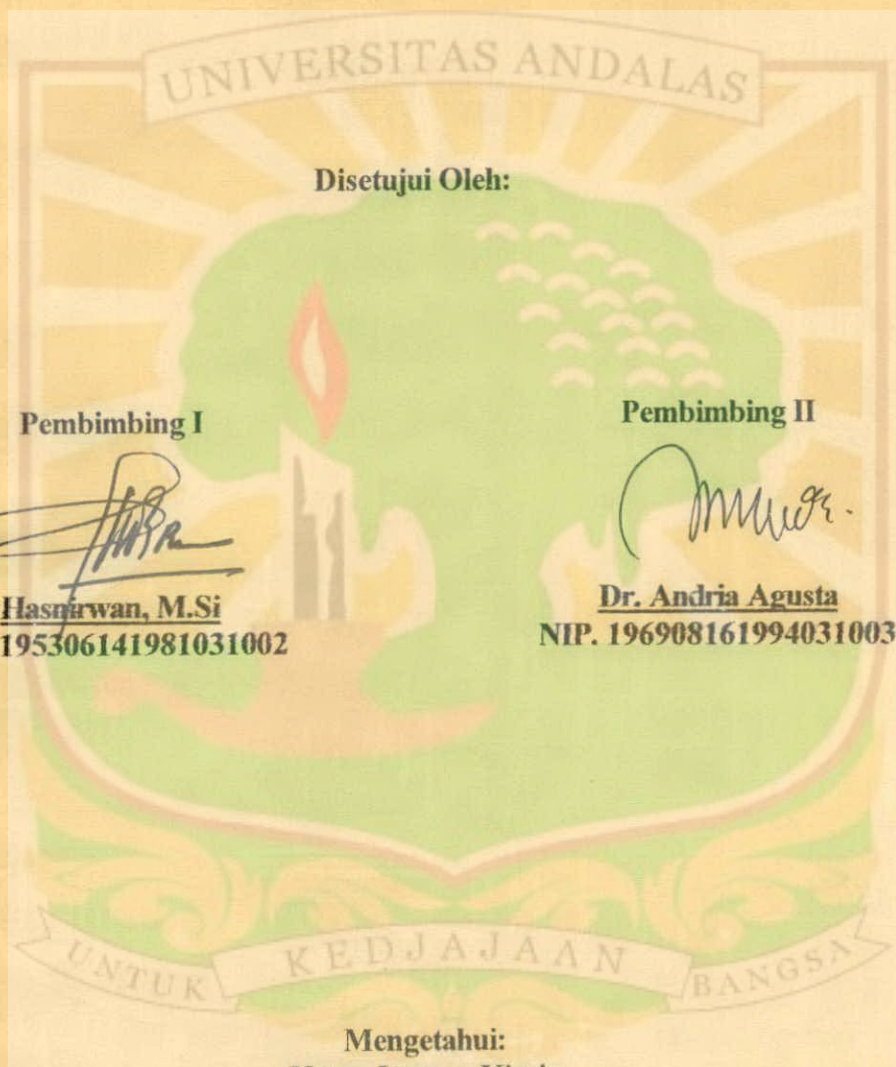
**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2011**

**ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA
METABOLIT SEKUNDER JAMUR ENDOFIT TCBP 4 DARI
TUMBUHAN BRATAWALI (*Tinospora crispa*)**



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

Isolasi, Identifikasi, dan Uji Aktivitas Antimikroba Metabolit Sekunder Jamur Endofit TCBP 4 dari Tunabuan Bratawali (*Tinospora crista*) skripsi oleh Hashemy Rafsanjani (07132047) sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (Strata 1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang telah diuji dan lulus pada tanggal 29 Juli 2011.



Disetujui Oleh:

Pembimbing I

Hasnirwan, M.Si
NIP. 195306141981031002

Pembimbing II

Dr. Andria Agusta
NIP. 196908161994031003

Mengetahui:

**Ketua Jurusan Kimia
FMIPA Universitas Andalas**

Dr. Adlis Santoni, M.S
NIP. 196212031988111002

ABSTRAK

ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA METABOLIT SEKUNDER JAMUR ENDOFIT TCBP 4 DARI TUMBUHAN BRATAWALI (*Tinospora crispa*)

Oleh
Hashemy Rafsanjani

Sarjana Sains (S.Si) dalam Bidang Kimia FMIPA Universitas Andalas
Dibimbing oleh Hasnirwan, M.Si dan Dr. Andria Agusta

Isolasi, identifikasi dan uji aktivitas antimikroba metabolit sekunder kultur jamur endofit TCBP 4 dari tumbuhan bratawali (*Tinospora crispa*) telah dilakukan. Jamur endofit TCBP 4 dikultivasi dalam medium *Potato Dextrose Broth* (PDB) selama 1 bulan yang dilanjutkan dengan mengekstraksi metabolit sekundernya dengan pelarut etil asetat. Ekstrak etil asetat tersebut dipisahkan dan dimurnikan dengan beberapa teknik kromatografi sehingga diperoleh 6 fraksi (fraksi 3e₁ – fraksi 3e₆). Fraksi 3e₃ – fraksi 3e₆ dari jamur TCBP 4 diuji aktivitas antimikrobanya dengan metode mikrodilusi melawan *Staphylococcus aureus*, *Bacillus Subtilis*, *Eschericia coli*, dan *Candida albicans*. Fraksi 3e₃ – fraksi 3e₅ menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan antibiotik komersial terhadap bakteri *S. aureus* dan aktivitasnya sama dibandingkan antibiotik komersial terhadap bakteri *B. subtilis*. Berbeda dengan fraksi lainnya, fraksi 3e₃ mempunyai aktivitas antijamur yang lebih tinggi dibandingkan antibiotik komersial terhadap jamur *C. albicans*. Hasil analisis GC-MS untuk komponen kimia pada fraksi 3e₃ belum didapatkan sedangkan pada fraksi 3e₅ diidentifikasi sebagai senyawa 1,4-naftalendion-3-asetil-2,5,7-trihidroksi.

ABSTRACT

ISOLATION, IDENTIFICATION, AND ANTIMICROBIAL ASSAY SECONDARY METABOLITE OF ENDOPHYTIC FUNGI TCBP 4 FROM BRATAWALI (*Tinospora crispa*)

By

Hashemy Rafsanjani

Bachelor of Science in Chemistry

Faculty of Mathematic and Natural Science Andalas University

Advised by Hasnirwan, M.Si and Dr. Andria Agusta

Isolation, identification and antimicrobial assay of secondary metabolite of the culture endophytic fungi TCBP 4 from bratawali (*Tinospora crispa*) had been carried out. The fungus TCBP 4 was cultivated into Potato Dextrose Broth (PDB) and incubated at room temperature for 1 month followed by extracting its metabolites with ethyl acetate. The ethyl acetate extract was separated and purified by several chromatography techniques to achieved six fractions (fraction 3e₁ - fraction 3e₆). Fractions 3e₃ - 3e₆ of TCBP 4 were tested against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Eschericia coli*, and *Candida albicans* by microdilution method. The fraction 3e₃ - 3e₅ showed antibacterial activity higher than commercial antibiotic against *S. aureus* and they showed the same activity as that commercial antibiotic against *B. subtilis*. Only fraction 3e₃ showed higher activity compare than commercial antibiotic against *C. albicans*. The GC-MS analysis could not identified the chemical constituent in fraction 3e₃. While fraction 3e₅ was identified as 1,4 – naphtalenedione – 3 acetyl – 2,5,7 trihydroxy.

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah, segala puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas semua limpahan dan karunia-Nya sehingga skripsi yang berjudul **Isolasi, Identifikasi, dan Uji Aktivitas Antimikroba Metabolit Sekunder Jamur Endofit TCBP 4 dari Tumbuhan Bratawali (*Tinospora crispa*)** dapat diselesaikan dengan baik. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Hasnirwan, M.Si, selaku pembimbing I dan Bapak Dr. Andria Agusta, selaku pembimbing II dari LIPI Cibinong yang telah memberikan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyusun skripsi ini.

Ucapan terima kasih yang sedalamnya penulis sampaikan kepada kedua orang tua atas semua do'a, kasih sayang serta dukungan yang tidak terhingga, baik moril maupun materil.

Selanjutnya ucapan terima kasih juga disampaikan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Emriadi selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.
2. Bapak Dr. Adlis Santoni selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Andalas, Padang.
3. Kepala bidang bagian Botani LIPI Cibinong, Ibu Dr. Joeni S. Rahajoe yang telah memberikan ijin dan kesempatan melaksanakan penelitian.
4. Bapak Prof. Dr. Hamzar Suyani, M.Sc selaku penasehat akademik yang telah memberikan pengarahan selama penulis menjalani perkuliahan di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas, Padang.
5. Ibu Yuliasri Jamal, M.Sc, Hj. Hertina, Dr. Praptiwi, Mas Arif, Mas Toni, Kang Asep yang telah membantu penulis selama melakukan penelitian di Laboratorium Biosains Puslit Biologi LIPI Cibinong.
6. Semua Dosen dan Karyawan Jurusan Kimia Universitas Andalas yang telah memberikan ilmu dan semangat.

7. Segenap karyawan Fakultas MIPA Universitas Andalas yang telah membantu penulis selama penulis berada di bangku perkuliahan.
8. Semua pihak dan teman-teman yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu yang telah membantu penulisan tugas akhir ini.

Kepada semua pihak yang telah membantu penulis, semoga Tuhan Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang berkenan membalas semua bantuan dan kasih sayang yang telah diberikan kepada penulis dan semoga makalah ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.



Padang, Juli 2011

Penulis,

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Tinospora crispa</i> (L.) Hook. F.	4
2.1.1 Tinjauan botani	4
2.1.2 Morfologi	5
2.1.3 Kegunaan secara tradisional.....	5
2.1.4 Kandungan kimia	5
2.2 Jamur Endofit	7
2.3 Metode Ekstraksi	7
2.4 Metode Kromatografi	8
2.4.1 Kromatografi lapis tipis.....	8
2.4.1 Kromatografi kolom.....	8
2.5 Antibiotik.....	9
2.6 Analisis GC-MS	9
III. METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	11
3.2 Alat dan Bahan	11
3.3 Prosedur Kerja.....	12
3.3.1 <i>Scaling up</i> jamur endofit TCBP 4 pada medium PDB (<i>Potato Dextrose Broth</i>)	12
3.3.1.1 Pembuatan medium kultivasi	12
3.3.1.2 Kultivasi jamur endofit.....	12
3.3.2 Ekstraksi kultur jamur endofit hasil <i>scaling up</i>	12
3.3.3 Fraksinasi dan purifikasi ekstrak etil asetat dari jamur endofit TCBP 4...	12
3.3.4 Uji aktivitas antimikroba hasil purifikasi	13
3.3.4.1 Persiapan medium	13
3.3.4.2 Persiapan larutan uji	14
3.3.4.3 Persiapan inokulum.....	15

3.3.4.4	Pengenceran larutan uji	16
3.3.4.5	Inkubasi <i>Microtiter Plate</i>	16
3.3.4.6	Penentuan nilai MIC	16
3.3.5	Identifikasi struktur senyawa dengan GC-MS	16
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1	<i>Scaling up</i> Jamur Endofit TCBP 4 pada Medium PDB (<i>Potato Dextrose Broth</i>)	18
4.2	Ekstraksi kultur jamur endofit hasil <i>scaling up</i>	18
4.3	Fraksinasi dan purifikasi ekstrak etil asetat dari jamur endofit TCBP 4... ..	19
4.4	Uji aktivitas antimikroba hasil purifikasi	21
4.5	Identifikasi struktur senyawa dengan GC-MS	23
V.	KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1	Kesimpulan.....	27
5.2	Saran	27

**DAFTAR PUSTAKA
LAMPIRAN**



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Tumbuhan <i>Tinospora crispa</i>	4
Gambar 2. Struktur senyawa dari (1) Palmatin, (2) Barberin, (3) Jatrorrhizin, (4) Apigenin, (5) Kolumbin, (6) Secoisolariciresinol, (7) N-cis feruloyltyramina, (8) N-trans-feruloyltyramina, (9) Sikloeukalenol, (10) Sikloeukalenon	6
Gambar 3. Profil KLT ekstrak etil asetat dari kultur TCBP 4 hasil <i>scaling up</i> setelah disemprot dengan pereaksi penampak noda $Ce(SO_4)_2$	18
Gambar 4. Profil KLT 9 fraksi (fraksi 1 – fraksi 9) dengan eluen diklorometan-metanol (10 : 1).....	19
Gambar 5. Profil KLT 11 fraksi setelah ditambah pereaksi penampak noda $Ce(SO_4)_2$	20
Gambar 6. Profil KLT hasil purifikasi dari fraksi 3e.....	21
Gambar 7. Kromatogram GC fraksi 3e ₃	24
Gambar 8. Spektrum MS fraksi 3e ₃	24
Gambar 9. Kromatogram GC fraksi 3e ₅	25
Gambar 10. Perbandingan spektrum masa fraksi 3e ₅ (atas) dengan senyawa 1,4 naftalendion-3-asetil-2,5,7-trihidroksi	25
Gambar 11. Spinocrom M.	26



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Hasil fraksinasi dari fraksi 3 ekstrak etil asetat TCBP 4	18
Tabel 2. Data MIC fraksi 3e ₃ , 3e ₄ , 3e ₅ , dan 3e ₆	22
Tabel 3. Data MIC antibiotik komersial	23



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perang antara antibiotika melawan infeksi bakteri patogen telah berlangsung selama lebih dari satu abad. Pada kenyataannya, perang tersebut tidak kunjung selesai, bahkan obat antibiotika seakan kehilangan tarungnya dengan berkembangnya bakteri-bakteri patogen yang resisten seperti *Staphylococcus*, *Enterococcus* dan jenis - jenis lainnya¹. Dengan berkembangnya populasi bakteri yang resisten, maka antibiotik yang pernah efektif untuk mengobati penyakit-penyakit tertentu kehilangan nilai kemoterapeutiknya. Sejalan dengan hal tersebut, jelas bahwa ada kebutuhan untuk mencari agen antimikroba yang efektif dan baru².

Produk alami dari tanaman yang berkhasiat obat diketahui telah lama menjadi sumber utama dalam bahan baku antibiotik³. Tumbuhan *Tinospora crispa* telah lama digunakan untuk pengobatan. Ekstrak tumbuhan ini berkhasiat sebagai antikanker, antioksidan⁴, antiprotzoa, antimalaria, antiinflamasi, antihiperlipikaemia⁵, antialergi, antivirus⁶, dan antimakan⁷.

Untuk mengambil senyawa bioaktif secara langsung dari tanamannya dibutuhkan sangat banyak biomassa atau bagian dari tanamannya. Untuk mengefisienkan cara memperoleh senyawa bioaktif tersebut, maka digunakan mikroba endofit spesifik yang diperoleh dari bagian dalam tanaman yang diharapkan mampu menghasilkan sejumlah senyawa bioaktif yang dibutuhkan tanpa harus mengekstrak dari tanamannya⁸. Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit⁹.

Mikroba endofit merupakan salah satu golongan mikroba di alam yang hidup berasosiasi dengan tumbuhan. Golongan mikroba endofit ini yaitu jamur endofit, merupakan sumber yang kaya akan metabolit sekunder aktif. Keutamaan

dari jamur ini adalah memiliki kemampuan untuk memproduksi kandungan metabolit yang sama dengan tumbuhan inangnya. Jamur endofit dilaporkan memiliki metabolit sekunder dengan diversitas yang tinggi. Berbagai golongan metabolit sekunder seperti alkaloid, terpenoid, kuinon, turunan isokumarin, fenilpropanoid, fenolik, dan senyawa alifatik telah diisolasi dari kultur *in-vitro* jamur endofit dalam kurun waktu 20 tahun terakhir⁹.

Jamur endofit TCBP 4 merupakan jamur endofit yang berasosiasi dengan tumbuhan *Tinospora crispa*. Jamur ini diisolasi dari batang tumbuhan *Tinospora crispa* yang dikoleksi dari daerah Pamengpeuk, Jawa Barat. Berdasarkan penelitian (Febryanto, 2011) ekstrak etil asetat jamur endofit TCBP 4 mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*¹⁰. Oleh sebab itu, maka dilakukanlah penelitian untuk mengisolasi dan mengidentifikasi metabolit bioaktif dari jamur endofit TCBP 4 serta menguji aktivitas antimikrobanya.

1.2 Rumusan Masalah

Berkembangnya bakteri-bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik maka perlu dilakukan untuk mencari agen antimikroba yang efektif dan baru. Oleh karena itu, salah satu solusi yang dapat diterapkan adalah dengan menggunakan mikroba endofit spesifik yang diperoleh dari bagian dalam tumbuhan yang diharapkan mampu menghasilkan sejumlah senyawa bioaktif.

Jamur endofit TCBP 4 merupakan jamur endofit yang berasosiasi dengan tumbuhan *Tinospora crispa*. Berdasarkan penelitian (Febryanto, 2011) ekstrak jamur endofit TCBP 4 mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*¹⁰. Dalam penelitian ini, diharapkan mampu mengisolasi dan mengidentifikasi metabolit bioaktif dari jamur endofit TCBP 4 serta menguji aktivitasnya terhadap mikroba patogen.

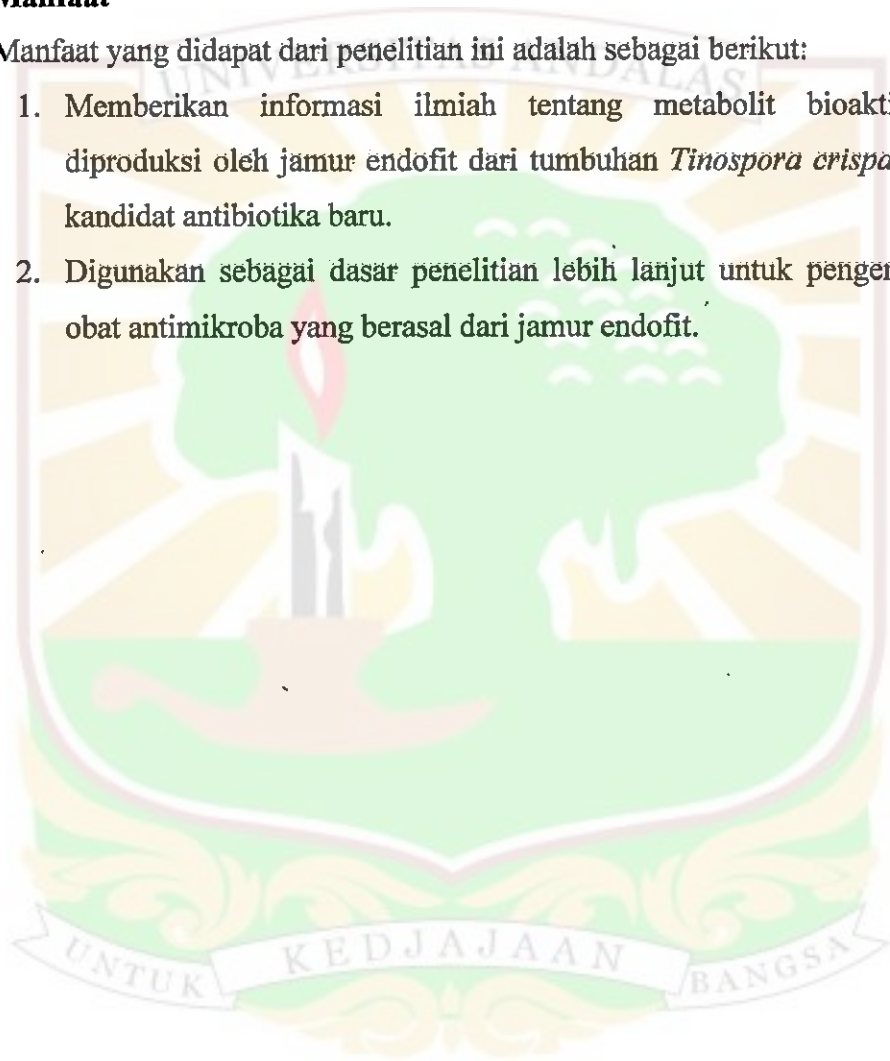
1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi metabolit bioaktif dari jamur endofit TCBP 4 yang berasosiasi dengan tumbuhan *Tinospora crispa*, mengidentifikasi senyawa tersebut, serta mengetahui aktivitas antimikrobanya terhadap beberapa mikroba patogen.

1.4 Manfaat

Manfaat yang didapat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memberikan informasi ilmiah tentang metabolit bioaktif yang diproduksi oleh jamur endofit dari tumbuhan *Tinospora crispa* sebagai kandidat antibiotika baru.
2. Digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut untuk pengembangan obat antimikroba yang berasal dari jamur endofit.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

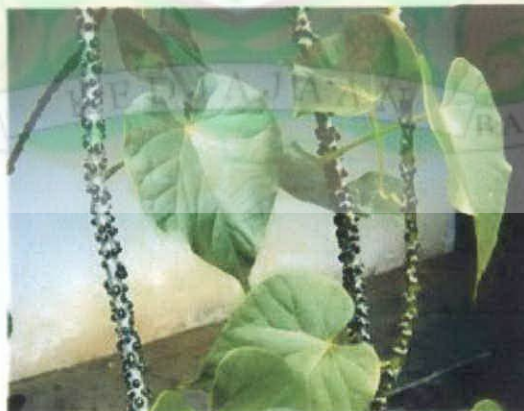
2.1 *Tinospora crispa* (L.) Hook. F.

2.1.1 Tinjauan Botani

Tinospora crispa (L.) Hook. F. adalah salah satu tumbuhan yang termasuk ke dalam famili Menispermaceae. Tanaman ini memiliki nama lain, seperti *Cocculus crispus* DC, *Menispermum crispum* L, *Menispermum tuberculatum* Lamk, *Menispermum Verrucosum* Flem, *Tinospora rumphii* Boerl, *Tinospora cordifolia*, dan *Tinospora tuberculata* (Lamk) Beumee ex Heyne. Di Indonesia tumbuhan *Tinospora crispa* memiliki nama, yaitu bratawali (Melayu), andawali (Sunda), brotowali (Jawa Tengah), dan antawali (Bali)¹¹.

Klasifikasi botani dari tumbuhan *Tinospora crispa* adalah sebagai berikut¹¹:

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Ranunculales
Suku	: Menispermaceae
Marga	: <i>Tinospora</i>
Jenis	: <i>Tinospora crispa</i> (L.) Hook. F.



Gambar 1. Tumbuhan *Tinospora crispa*¹²

2.1.2 Morfologi

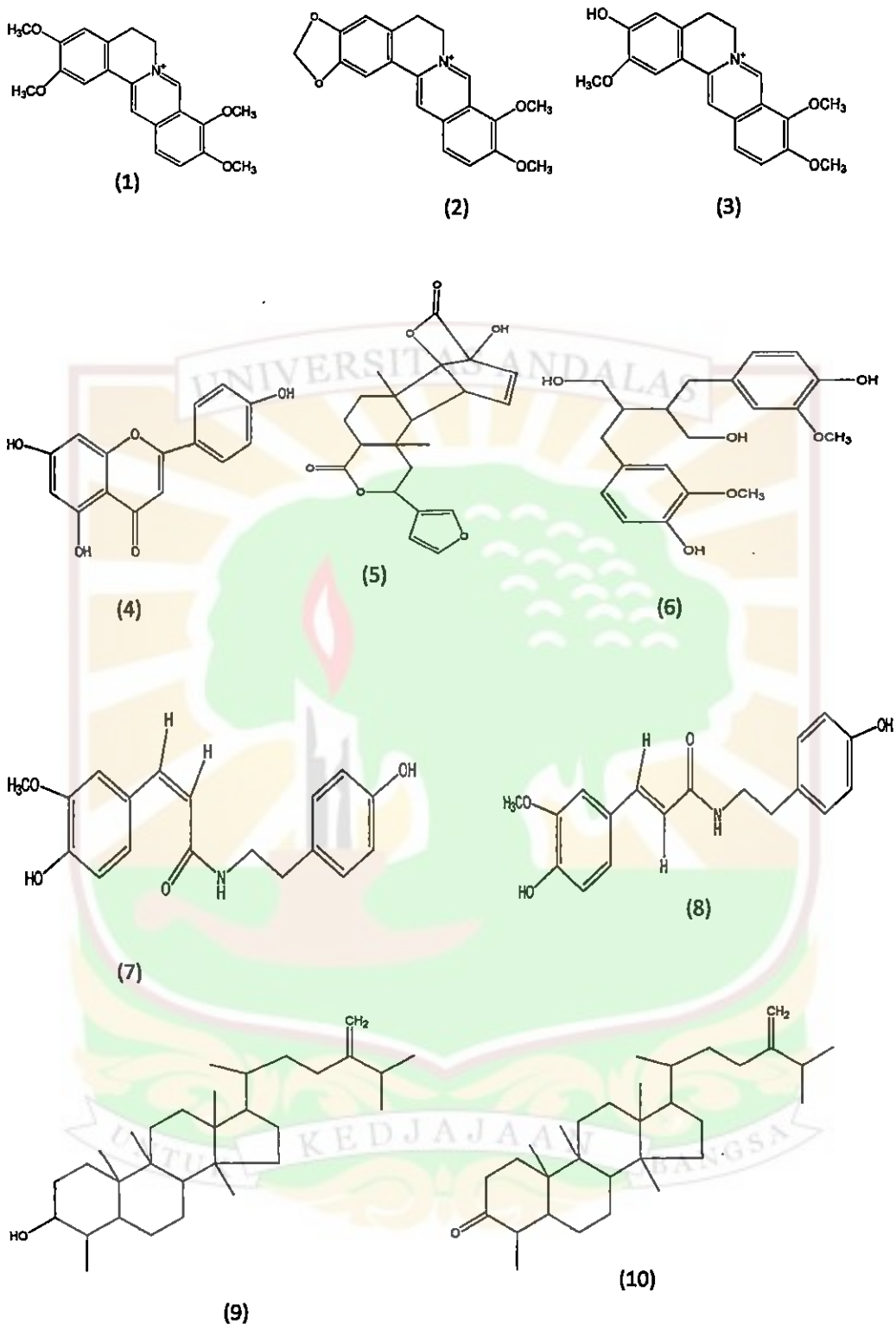
Tumbuhan *Tinospora crispa* (L.) Hook. F. berbentuk batang bulat, berkayu, permukaan berbenjol-benjol, bercabang dan berwarna hijau. Habitus berupa semak, memanjat dengan panjang lebih dari 15 cm. Daunnya tunggal, berwarna hijau, berbentuk jantung dengan ujung runcing, pangkal berlekuk, dan tepi rata. Panjang daun 7-12 cm, lebar 7-11 cm, bertangkai, pertulangan daun menjari dan tangkai daun menebal pada pangkal dan ujung. Bunga majemuk berbentuk tandan, terletak pada batang, kelopak tiga, bentuk bulat telur, mahkota enam, bentuk benang, kepala sari kuning. Buah berupa buah batu, kecil dan berwarna hijau. Akarnya tunggang berwarna putih kotor¹¹. Tumbuhan ini banyak terdapat di Indochina, Thailand, Malaysia dan Indonesia. Di daerah Indonesia banyak tumbuh di Jawa, Bali, dan Ambon¹¹.

2.1.3 Kegunaan Secara Tradisional

Di Thailand tumbuhan *Tinospora crispa* digunakan sebagai obat untuk mengobati demam, kolera, diabetes, rematik, gigitan ular, luka, dan gatal-gatal. Di Malaysia digunakan untuk mengobati hipertensi, sakit pinggang dan diabetes⁶. Di Bali batangnya dipakai sebagai obat sakit perut, demam dan sakit kuning, bahkan juga dipakai sebagai obat gosok untuk mengobati sakit punggung dan pinggang. Di Jawa, air rebusannya digunakan untuk demam, dan digunakan sebagai obat luar untuk luka dan gatal-gatal¹³.

2.1.4 Kandungan Kimia

Kandungan kimia dalam tumbuhan *Tinospora crispa* diantaranya: palmatin, berberin, jatrorizhin, apigenin dan kolumbin. Cavin *et al*, (1998) mengidentifikasi tiga senyawa yang diisolasi dari ekstrak batang *Tinospora crispa* sebagai N-*cis*-feruloyltyramina, N-*trans*-feruloyltyramina dan secoisolariciresinol. Kongkathip *et al*, (2002) juga melaporkan dua senyawa triterpen yaitu sikloeukalenol dan sikloeukalenon yang diisolasi dari batang *Tinospora crispa*. Beberapa struktur senyawa yang terdapat pada tumbuhan ini dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



Gambar 2. Struktur senyawa dari (1) Palmatin, (2) Barberin, (3) Jatrorrhizin, (4) Apigenin, (5) Kolumbin, (6) Secoisolariciresinol, (7) N-cis-feruloyltyramina, (8) N-trans-feruloyltyramina, (9) Sikloeukalenol, (10) Sikloeukalenon

2.2 Jamur endofit

Salah satu kelompok jamur yang terdapat di alam adalah jamur endofit. Jamur endofit merupakan jamur yang hidup di dalam jaringan tumbuhan (daun, bunga, ranting, batang ataupun akar) tanpa menimbulkan gejala penyakit pada tumbuhan inangnya. Jamur endofit mampu menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif misalnya senyawa antibakteri, antifungi, antivirus, antikanker, antimalaria dan sebagainya¹⁶. Keuntungan dengan adanya jamur endofit pada tanaman inang adalah meningkatnya toleransi terhadap logam berat, meningkatkan ketahanan terhadap kekeringan, menekan serangan hama, resistensi sistemik terhadap patogen¹⁷.

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 akan mendapatkan metabolit sekunder dari jamur endofit yang bermanfaat untuk fisiologi dan ekologi tumbuhan inang⁹.

Pada umumnya jamur endofit diisolasi dari organ tumbuhan yang masih segar dan telah disterilkan permukaannya. Sterilisasi permukaan organ tersebut dilakukan dengan cara merendamnya dalam alkohol (70%-95%) yang dikombinasikan dengan 5,3% larutan natrium hipoklorit (NaOCl)¹⁸. Setelah steril, organ tumbuhan tersebut dapat difermentasikan pada medium dengan komposisi tertentu. Di dalam medium tersebut, jamur endofit akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder¹⁹.

2.3 Metode Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi cair-cair. Ekstraksi cair-cair atau disebut juga ekstraksi pelarut merupakan metode yang paling baik dan populer. Metode ekstraksi ini hanya menggunakan corong pisah. Ekstraksi cair-cair dilakukan untuk mendapatkan suatu senyawa dalam campuran berfase cair dengan pelarut lain yang fasenya cair juga. Prinsip dari metode ini berdasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur²⁰.

2.4 Metode Kromatografi

Metode kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan yang menggunakan dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Pemisahan ini terjadi karena adanya perbedaan migrasi yang disebabkan oleh beda koefisien distribusi dari masing-masing komponen. Salah satunya merupakan fase diam dengan permukaan yang luas dan fase yang lain berupa zat alir (fluid) yang mengalir lambat sepanjang fase diam²¹.

2.4.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis atau yang dikenal juga kromatografi kolom terbuka dikembangkan oleh Ismailoff dan Schraiber pada tahun 1938. Metode ini sederhana, cepat dalam pemisahan dan sensitif. Fasa diam yang digunakan berupa adsorben yang dilapiskan pada lempeng kaca. Fasa gerak akan merayap sepanjang fasa diam dan terbentuklah kromatogram²⁰.

Dalam kajian analisis kualitatif, kromatografi lapis tipis sangat umum digunakan dalam teknik analisis kimia, antara lain :

1. Untuk identifikasi suatu senyawa.
2. Untuk mengetahui berapa banyak jenis senyawa dalam suatu campuran (kemurnian).
3. Untuk mengetahui pelarut / perbandingan eluen yang cocok untuk pemisahan pada kromatografi kolom.
4. Untuk memonitor pemisahan pada kromatografi kolom.

Visualisasi untuk senyawa yang tidak berwarna harus dideteksi dengan cara penyinaran sinar UV, atau dengan pereaksi penampak noda seperti serum sulfat. Noda yang didapat ditandai dengan pensil untuk menentukan harga R_f yang berkisar 0-1. Harga R_f dapat dihitung dengan membandingkan jarak yang ditempuh komponen dengan jarak yang ditempuh eluen²².

2.4.2 Kromatografi kolom

Kromatografi kolom merupakan salah satu metode kromatografi dengan fase gerak cair dan fase diam padat. Penggunaan fase gerak (eluen) disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dipisahkan. Fase diam ditempatkan dalam tabung

kaca berbentuk silinder, pada bagian bawah tertutup dengan katup atau kran dan fase gerak dibiarkan mengalir ke bawah melaluinya karena gaya berat. Pada kondisi yang dipilih dengan baik, eluen yang merupakan komponen campuran, turun berupa pita dengan laju yang berlainan dan dengan demikian dipisahkan. Eluen biasanya dipisahkan dengan cara membiarkannya mengalir keluar dari kolom dan mengumpulkannya sebagai fraksi, sering kali dengan memakai pengumpul fraksi mekanis²¹.

2.5 Antibiotik

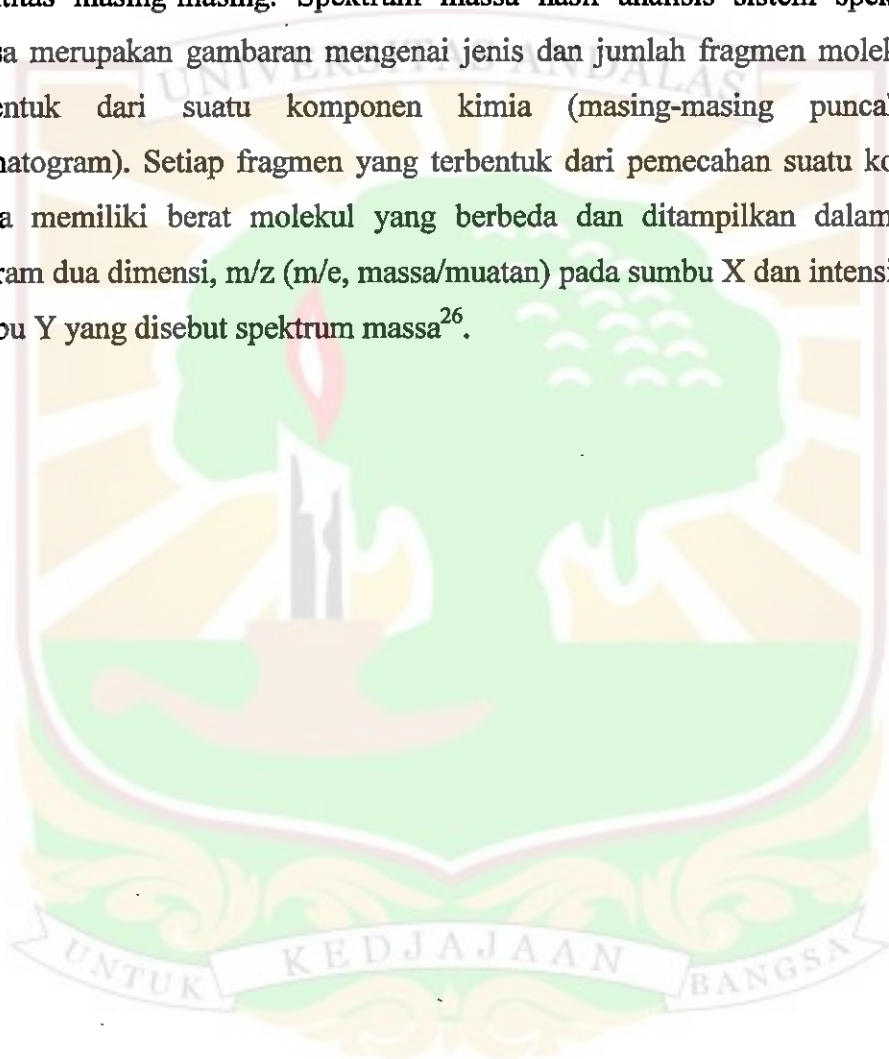
Antibiotik adalah zat yang dihasilkan suatu mikroba terutama fungi, yang dapat menghambat atau dapat membasmi mikroba jenis lain²³. Dalam Champney (2008) disebutkan bahwa antibiotika berasal dari dua kata, yaitu “anti” yang berarti “menentang” atau “mencegah” dan “biotik” yang berasal dari bahasa Yunani yang berarti kehidupan²⁴.

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antimikroba yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakteriostatik, dan ada yang bersifat membunuh mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba disebut sebagai kadar hambat minimal sedangkan kadar minimal yang diperlukan untuk membunuh mikroba disebut kadar bunuh minimal²³.

2.6 Analisis GC-MS

GC-MS adalah singkatan dari “*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*”. GC-MS merupakan gabungan dua buah alat yaitu kromatografi gas dan spektrometer massa. Kromatografi gas berfungsi sebagai alat pemisah berbagai komponen campuran dalam sampel, sedangkan spektrometer massa berfungsi untuk mendeteksi masing-masing komponen molekul yang telah dipisahkan pada sistem kromatografi gas²⁵. Analisis GC-MS merupakan metode yang cepat dan akurat untuk memisahkan campuran yang rumit, mampu menganalisis campuran dalam jumlah kecil dan menghasilkan data yang berguna mengenai struktur serta identitas senyawa organik.

Berdasarkan analisis GC-MS diperoleh dua informasi dasar, yaitu hasil analisis kromatografi gas yang ditampilkan dalam bentuk kromatogram dan hasil analisis spektrometri massa yang ditampilkan dalam bentuk spektrum massa. Kromatogram memberikan informasi mengenai jumlah komponen kimia yang terdapat dalam campuran yang dianalisis (jika sampel berbentuk campuran) yang ditunjukkan oleh jumlah puncak yang terbentuk pada kromatogram berikut kuantitas masing-masing. Spektrum massa hasil analisis sistem spektroskopi massa merupakan gambaran mengenai jenis dan jumlah fragmen molekul yang terbentuk dari suatu komponen kimia (masing-masing puncak pada kromatogram). Setiap fragmen yang terbentuk dari pemecahan suatu komponen kimia memiliki berat molekul yang berbeda dan ditampilkan dalam bentuk diagram dua dimensi, m/z (m/e , massa/muatan) pada sumbu X dan intensitas pada sumbu Y yang disebut spektrum massa²⁶.



Berdasarkan analisis GC-MS diperoleh dua informasi dasar, yaitu hasil analisis kromatografi gas yang ditampilkan dalam bentuk kromatogram dan hasil analisis spektrometri massa yang ditampilkan dalam bentuk spektrum massa. Kromatogram memberikan informasi mengenai jumlah komponen kimia yang terdapat dalam campuran yang dianalisis (jika sampel berbentuk campuran) yang dilanjutkan oleh jumlah puncak yang terdapat pada kromatogram berikut kuantitas masing-masing. Spektrum massa hasil analisis sistem spektroskopi massa merupakan gambaran mengenai jenis dan jumlah framen molekul yang terdapat dari suatu komponen kimia (masing-masing puncak pada kromatogram). Setiap framen yang terdapat dari pemecahan suatu komponen kimia memiliki berat molekul yang berbeda dan ditampilkan dalam bentuk diagram dua dimensi, m/z (mole. massamanian) pada sumbu X dan intensitas pada sumbu Y yang disebut spektrum massa.⁵⁶



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

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

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: kolom kromatografi, *chamber*, cawan petri, pipet mikro, pipet tetes, pipa kapiler, pinset, kawat ose, tip, spatel, hot plate (cimarec 2), tabung reaksi (pyrex), gelas ukur (pyrex), erlenmeyer (pyrex), gelas piala (pyrex), neraca analitik (and hr-202i), UV cabinet (camag), inkubator, *autoclave*, labu evaporator (pyrex), *rotary evaporator* (heidolph WB 2000), *laminar air flow*, *microtiter plate*, *incubator shaker*, vial, *spreader*, corong pisah, GC-MS (Varian Saturn 2000).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: sephadex LH-20, silika gel 70-230 mesh (merck), plat KLT silika gel GF 254 (merck), n-heksana, etil asetat, metanol, etanol, aseton, kloroform, diklorometan, akuades, air sumur, DMSO, pereaksi penampak noda serum sulfat, alkohol 70%, MHA (*Mueller Hinton Agar - criterion*), MHB (*Mueller Hinton Broth - criterion*), PDB (*Potato Dextrose Broth - difcoTM*), PDA (*Potato Dextrose Agar- difcoTM*), SB (*Sabouraud Dextrose broth - criterion*), kertas saring whatman, strain mikroba *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans* (Koleksi Laboratorium Mikrobiologi - LIPI Cibinong). Strain jamur endofit TCBP 4 yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi dari laboratorium Biosains - LIPI Cibinong.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 *Scaling up* jamur endofit TCBP 4 pada medium PDB (*Potato Dextrose Broth*)

3.3.1.1 Pembuatan medium kultivasi

Medium PDB dibuat sebanyak 2 liter dengan komposisi 24 gram PDB dalam 1 liter air sumur. Setelah semua komponennya larut, medium tersebut dibagi menjadi 10 erlenmeyer yang masing-masingnya diisi 200 mL medium dalam erlenmeyer 500 mL. Medium tersebut disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C.

3.3.1.2 Kultivasi jamur endofit

Koloni murni jamur endofit TCBP 4 yang ditumbuhkan pada medium PDA diambil kira-kira-kira seluas 1x1 cm sebanyak 10 buah dan diinokulasi dalam medium PDB yang telah disterilkan. Kemudian, kultur tersebut diinkubasi pada suhu kamar dalam kondisi statis selama 1 bulan. Pengerjaan kultivasi jamur endofit ini dilakukan dalam keadaan steril yaitu di *laminar airflow*.

3.3.2 Ekstraksi kultur jamur endofit hasil *scaling up*

Hasil kultivasi jamur endofit TCBP 4 selanjutnya diekstrak dengan pelarut etil asetat menggunakan corong pisah sebanyak tiga kali. Jumlah pelarut yang digunakan lebih kurang 4 liter. Lapisan atas yang merupakan fraksi etil asetat dipisahkan dan dipisahkan dengan *rotary evaporator*. Setelah diperoleh fraksi etil asetat kemudian dilanjutkan dengan analisis KLT. Fraksi yang telah pekat ditotolkan pada plat KLT kemudian dielus dengan fase gerak diklorometan-metanol (10 : 1) dan hasilnya diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm serta disemprot dengan pereaksi penampak noda $Ce(SO_4)_2$.

3.3.3 Fraksinasi dan purifikasi ekstrak etil asetat dari jamur endofit TCBP 4

Ekstrak pekat TCBP 4 (223.5 mg) difraksinasi menggunakan kromatografi kolom sephadex LH-20 dengan larutan pengelusi etanol. Fraksi-fraksi yang keluar kemudian ditampung dalam tabung reaksi dan setiap tabung dimonitor dengan KLT menggunakan eluen diklorometan-metanol (10:1). Selanjutnya, fraksi-fraksi

2. Medium SB juga dibuat dengan dua komposisi, yaitu medium SB 1 dibuat dengan melarutkan 30 g SB dalam 1 L akuades dan medium SB 2 dibuat dengan komposisi 2x medim SB 1 (60 g MHB dalam 1 L akuades). Medium tersebut disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C.
3. Medium MHA dibuat dengan melarutkan 38 g MHA dalam 1 L akuades. Setelah larut, medium disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C, kemudian dituang dalam cawan petri dan dibiarkan memadat.
4. Medium PDA dibuat dengan melarutkan 39 g PDA dalam 1 L akuades. Setelah larut, medium disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C, kemudian dituang dalam cawan petri dan dibiarkan memadat.

3.3.4.2 Persiapan larutan uji

Larutan uji yang digunakan yaitu fraksi 3e₃, 3e₄, 3e₅, dan 3e₆. Larutan uji dipersiapkan dengan konsentrasi 512 µg/mL sebanyak 1,5 mL menggunakan pelarut DMSO.

1. Larutan uji fraksi 3e₃ : fraksi 3e₃ (3.2 mg) dilarutkan dalam 1 mL DMSO, lalu dipipet sebanyak 240 µL dari larutan tersebut ke dalam vial. Kemudian ditambahkan DMSO sampai volume larutan menjadi 1.5 mL.
2. Larutan uji fraksi 3e₄ : fraksi 3e₃ (1.4 mg) dilarutkan dalam 1 mL DMSO, lalu dipipet sebanyak 548 µL dari larutan tersebut ke dalam vial. Kemudian ditambahkan DMSO sampai volume larutan menjadi 1.5 mL.
3. Larutan uji fraksi 3e₅ : fraksi 3e₃ (6.2 mg) dilarutkan dalam 1 mL DMSO, lalu dipipet sebanyak 124 µL dari larutan tersebut ke dalam vial. Kemudian ditambahkan DMSO sampai volume larutan menjadi 1.5 mL.
4. Larutan uji fraksi 3e₆ : fraksi 3e₃ (2.3 mg) dilarutkan dalam 1 mL DMSO, lalu dipipet sebanyak 334 µL dari larutan tersebut ke dalam vial. Kemudian ditambahkan DMSO sampai volume larutan menjadi 1.5 mL.

3.3.4.3 Persiapan inokulum

Bakteri uji yang digunakan: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, dan *Escherichia coli*, sedangkan jamur uji yang digunakan: *Candida albicans*.

Persiapan inokulum terdiri dari 3 tahap, yaitu:

1. Pembuatan suspensi inokulum

Sebanyak 1 ose isolat mikroba diinokulasikan pada 5 mL medium MHB atau SB. Kemudian, diinkubasi selama 18 jam dalam *incubator shaker* untuk memperoleh suspensi.

2. Perhitungan jumlah koloni suspensi

Suspensi yang didapat diencerkan untuk mempermudah perhitungan koloni, yaitu dengan cara dipipet 50 μL suspensi ke dalam 4,95 mL medium MHB atau SB. Suspensi tersebut diencerkan lagi dengan cara yang sama hingga didapat suspensi dengan pengenceran 10^4 . Suspensi dengan faktor pengenceran 10^4 , diinokulasikan sebanyak 25 μL ke dalam medium MHA atau PDA. Setelah itu diinkubasi selama 18 jam. Koloni yang muncul dihitung.

$$\text{Jumlah koloni suspensi} = \frac{\text{koloni yang muncul} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{volume medium}}$$

3. Pengenceran suspensi inokulum

Setelah diketahui jumlah koloni suspensi, dilanjutkan dengan pengenceran suspensi inokulum untuk mendapatkan jumlah koloni 10^5 CFU/mL.

Contoh pengenceran:

Jumlah koloni *E.coli* = 5.6×10^8 CFU/mL, dipipet sebanyak 5 μL ke dalam 4,995 mL medium MHB sehingga didapat koloni bakteri = 2×10^5 CFU/mL

3.3.4.4 Pengenceran larutan uji

Pengenceran larutan uji dari konsentrasi 512 $\mu\text{g/mL}$ menjadi 128 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, dan 1 $\mu\text{g/mL}$ menggunakan *Microtiter plate* dengan 12 sumur. Contoh untuk uji antibakteri :

1. Sumur 1 diisi dengan 0,1 mL medium MHB 2.
2. Sumur 2-10 diisi dengan 0,1 mL medium MHB 1, sumur 12 diisi dengan 0,2 mL medium MHB 1.
3. Pada sumur 1 ditambahkan sebanyak 0,1 mL sampel uji dengan konsentrasi 512 $\mu\text{g/mL}$. Dihomogenkan dengan pipet mikro. Ambil sebanyak 0,1 mL campuran pada sumur 1, masukkan pada sumur 2, homogenkan. Begitu seterusnya hingga sumur 8. Pada sumur 8 dibuang sebanyak 0,1 mL campuran.
4. Tambahkan sebanyak 0,1 mL inokulum pada sumur 1-8.
5. Sumur 10 merupakan GC (*growth control*) yang berisi 0,1 mL medium MHB 1 dan 0,1 mL inokulum.
6. Sumur 12 merupakan blanko yang berisi 0,2 mL medium MHB 1.

Untuk uji aktivitas antijamur juga dilakukan dengan cara yang sama tetapi dengan menggunakan medium SB. Skema pengenceran dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.3.4.5 Inkubasi *Microtiter Plate*

Microtiter plate kemudian diinkubasi dengan *incubator shaker* selama 18 jam pada suhu kamar.

3.3.4.6 Penentuan Nilai MIC

Nilai MIC ditentukan dengan pengamatan visual yaitu pada konsentrasi terendah dimana sumur masih mempertahankan kebeningannya. Penentuan nilai MIC dilakukan sebanyak 3 kali ulangan.

3.3.5 Identifikasi struktur senyawa dengan GC-MS

Identifikasi struktur senyawa metabolit sekunder hasil purifikasi dilakukan dengan menggunakan peralatan GC-MS Varian Saturn 2000 di Laboratorium Analisis Umum, Pusat Penelitian Biologi, LIPI Cibinong. Jenis kolom yang digunakan adalah VF-17 MS panjang 30 mm dan diameter 0,25 mm. Gas pembawa adalah

helium dengan kecepatan aliran 2.0 mL/menit. Volume injeksi : 5 μ L, suhu injektor 250 °C. Suhu kolom diprogram dari 100 °C sampai 270 °C. Pada tahap awal suhu kolom dibuat konstan 100 °C selama 3 menit, lalu dinaikkan sampai 270 °C dengan kecepatan kenaikan suhu 10 °C/menit. Kondisi ini dipertahankan selama 18 menit. Komponen kimia yang terdeteksi pada analisis ini diidentifikasi dengan membandingkan spektrum massa senyawa target dengan spektrum massa pada database (NIST, Wiley).



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 *Scaling up* Jamur Endofit TCBP 4 pada Medium PDB (*Potato Dextrose Broth*)

Jamur endofit TCBP 4 *discaling up* pada medium PDB karena ekstrak etil asetat kultur jamur endofit TCBP 4 yang dikultivasi pada medium PDB memiliki aktivitas menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*¹⁰. Bentuk dari jamur endofit TCBP 4 dapat dilihat pada Lampiran 3.

4.2 Ekstraksi Kultur Jamur Endofit Hasil *Scaling up*

Berat ekstrak etil asetat TCBP 4 yang didapatkan, berwarna merah kecoklatan seberat 371,5 mg dari total 2 L medium. Proses pengekstrakan sebanyak 3x bertujuan agar semakin banyak metabolit sekunder yang terekstrak dari kultur jamur endofit tersebut. Ekstrak etil asetat TCBP 4 yang diperoleh kemudian dianalisis kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase gerak diklorometan-metanol (10 : 1) dan hasilnya diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm serta disemprot dengan pereaksi penampak noda $Ce(SO_4)_2$. Pola KLT yang terbentuk dari hasil analisis KLT diberikan pada Gambar 2.



Gambar 3. Profil KLT ekstrak etil asetat dari kultur TCBP 4 hasil *scaling up* setelah disemprot dengan pereaksi penampak noda $Ce(SO_4)_2$

4.3 Fraksinasi dan purifikasi ekstrak etil asetat dari jamur endofit TCBP 4

Ekstrak pekat kultur jamur endofit TCBP 4 sebanyak 223.5 mg selanjutnya difraksinasi dengan metode kromatografi kolom menggunakan fase diam sephadex LH-20 dengan eluen etanol. Fraksi-fraksi yang keluar ditampung dalam tabung reaksi. Total didapat 25 tabung reaksi dan berdasarkan pola yang terbentuk dari analisis KLT terhadap ke-25 tabung didapat 9 fraksi (fraksi 1 – fraksi 9). Kesembilan fraksi tersebut dipekatkan dengan *rotary evaporator* kemudian ditimbang. Berat masing- masing fraksi yaitu fraksi 1 sebanyak 55.6 mg, fraksi 2 sebanyak 85.5 mg, fraksi 3 sebanyak 66.9 mg, fraksi 4 sebanyak 13.4 mg, fraksi 5 sebanyak 4.8 mg, fraksi 6 sebanyak 1.6 mg, fraksi 7 sebanyak 1.5 mg, fraksi 8 sebanyak 0.3 mg dan fraksi 9 sebanyak 4.1 mg. Profil KLT dari hasil fraksinasi kolom sephadex LH-20 diberikan pada Gambar 3.



Gambar 4. Profil KLT 9 fraksi (fraksi 1 – fraksi 9) dengan eluen diklorometan-metanol (10 : 1)

Fraksi 3 yang masih menunjukkan beberapa noda, difraksinasi kembali menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam silika gel (70-230 mesh). Fasa geraknya menggunakan sistim elusi dengan kenaikan kepolaran secara bertahap, yaitu menggunakan eluen diklorometan - metanol (100:1), (50:1), (25:1), (10:1), (5:1), dan metanol. Eluat total didapat 28 tabung dan dianalisis KLT. Berdasarkan pola noda yang terbentuk pada KLT didapat 11 fraksi yaitu

fraksi 3a – fraksi 3k. Profil KLT dari hasil fraksinasi dengan kromatografi kolom silika gel diberikan pada Gambar 4.



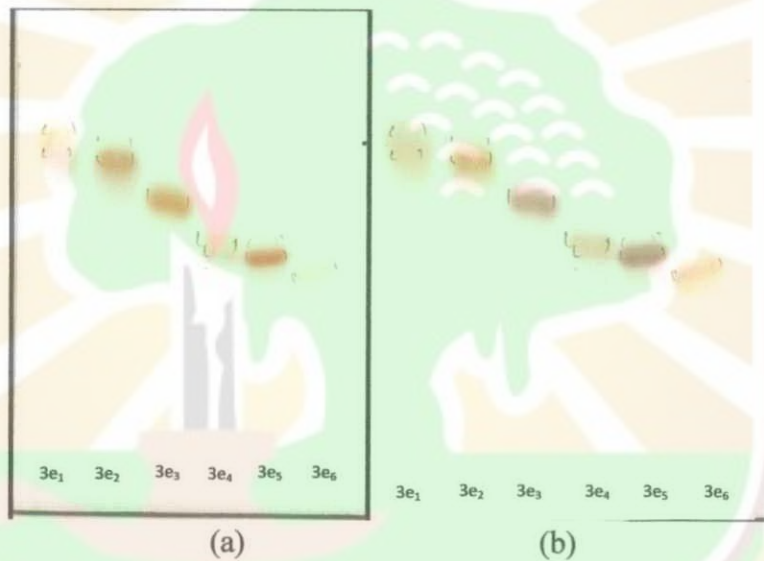
Gambar 5. Profil KLT 11 fraksi setelah ditambah pereaksi penampak noda $Ce(SO_4)_2$
 (a) Fraksi 3a – fraksi 3f dengan eluen diklorometan-metanol (100 : 1)
 (b) Fraksi 3f – fraksi 3k dengan eluen diklorometan-metanol (10 : 1)

Kesebelas fraksi kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan ditimbang beratnya. Berat masing-masing dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil fraksinasi dari fraksi 3 ekstrak etil asetat TCBP 4

Fraksi	Berat (mg)
3a	0.4
3b	0.1
3c	0.4
3d	0.8
3e	15.6
3f	2.1
3g	9.4
3h	3.8
3i	2.5
3j	1.6
3k	29.7

Fraksi 3e (15.6 mg) kemudian dipurifikasi lebih lanjut. Fraksi 3e dipisahkan kembali dengan teknik KLT preparatif. Proses pemurnian dengan KLT preparatif dilakukan dengan menggunakan eluen n-heksana-kloroform-metanol (1:1:0,25). Dari hasil purifikasi didapatkan 6 fraksi yaitu fraksi 3e₁ berwarna kuning kemerahan (1.1 mg), fraksi 3e₂ berwarna merah (1.4 mg), fraksi 3e₃ berwarna orange (3.2 mg), fraksi 3e₄ berwarna kuning kemerahan (1.4 mg), fraksi 3e₅ berwarna merah (6.2 mg) dan fraksi 3e₆ berwarna orange muda (2.3 mg). Keenam fraksi tersebut selanjutnya dianalisis KLT untuk melihat kemurniannya (Gambar 5).



Gambar 6. Profil KLT hasil purifikasi dari fraksi 3e

(a) tanpa pereaksi penampak noda

(b) dengan pereaksi penampak noda $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$

Dari profil KLT (Gambar 5.) hanya terdapat 1 senyawa yang relatif murni yaitu pada fraksi 3e₃, dimana pada fraksi tersebut terdapat 1 noda sedangkan pada fraksi lainnya masih terdapat pengotor yaitu noda yang dihasilkan belum tunggal.

4.4 Uji aktivitas antimikroba hasil purifikasi

Hasil purifikasi diuji aktivitas anti mikroba dengan menentukan nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*).

Pada penentuan MIC ini, yang digunakan sebagai larutan uji adalah fraksi 3e₃, 3e₄, 3e₅, dan 3e₆, sedangkan mikroba uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Eschericia coli*, dan *Candida albicans*. Mikroba uji tersebut diinokulasikan ke dalam medium cair sehingga didapat suspensi inokulum. Suspensi tersebut dihitung jumlah koloninya. Jumlah kloni yang didapat masing-masing mikroba yaitu: *Staphylococcus aureus* (1,27 x 10⁹), *Bacillus subtilis* (5,09 x 10⁹), *Eschericia coli* (5,6 x 10⁸), dan *Candida albicans* (8 x 10⁶).

Penentuan MIC hasil pemurnian ekstrak etil asetat jamur TCBP 4 terhadap beberapa mikroba uji dilakukan berdasarkan pengamatan secara visual, dengan indikasi bahwa konsentrasi minimum penghambatan mikroba uji ditunjukkan dengan medium yang bening pada *microtiter plate*. Nilai MIC fraksi-fraksi tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data MIC fraksi 3e₃, 3e₄, 3e₅, dan 3e₆.

Larutan uji	Nilai MIC (µg/mL)			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
fraksi 3e ₃	8	8	64	16
fraksi 3e ₄	8	8	64	32
fraksi 3e ₅	4	8	64	32
fraksi 3e ₆	16	16	64	32

Berdasarkan nilai MIC memperlihatkan bahwa fraksi 3e₃, 3e₄, 3e₅, dan 3e₆ aktif menghambat pertumbuhan mikroba uji dengan nilai MIC yang berbeda-beda. Pengujian aktivitas antimikroba larutan uji dibandingkan dengan aktivitas antibiotik komersial, yaitu kloramfenikol, eritromisin, nistatin, dan kabisidin²⁷ (lihat pada Tabel 3).

Tabel 3. Data MIC antibiotik komersial, (kloramfenikol dan eritromisin merupakan antibakteri komersial sedangkan nistatin dan kabisidin merupakan antijamur komersial).

Antibiotik komersial	Nilai MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
kloramfenikol	16	8	8	-
eritromisin	0,06	0,03	32	-
nistatin	-	-	-	32
kabisidin	-	-	-	32

Catatan: “-“ tidak diujikan

Dari tabel diatas dapat dilihat fraksi 3e₃, 3e₄, dan 3e₅, memiliki aktivitas yang lebih tinggi dari kloramfenikol terhadap bakteri *S. aureus*, dan aktivitasnya sama dengan kloramfenikol terhadap bakteri *B. subtilis*. Namun, fraksi 3e₃, 3e₄, dan 3e₅ tidak lebih aktif daripada kloramfenikol dan eritromisin terhadap bakteri *E. coli*. Berbeda dengan fraksi 3e₄, 3e₅, dan 3e₆, fraksi 3e₃ memiliki aktivitas yang lebih tinggi terhadap jamur *C. albicans* apabila dibandingkan dengan nistatin dan kabisidin.

4.5 Identifikasi struktur senyawa dengan GC-MS

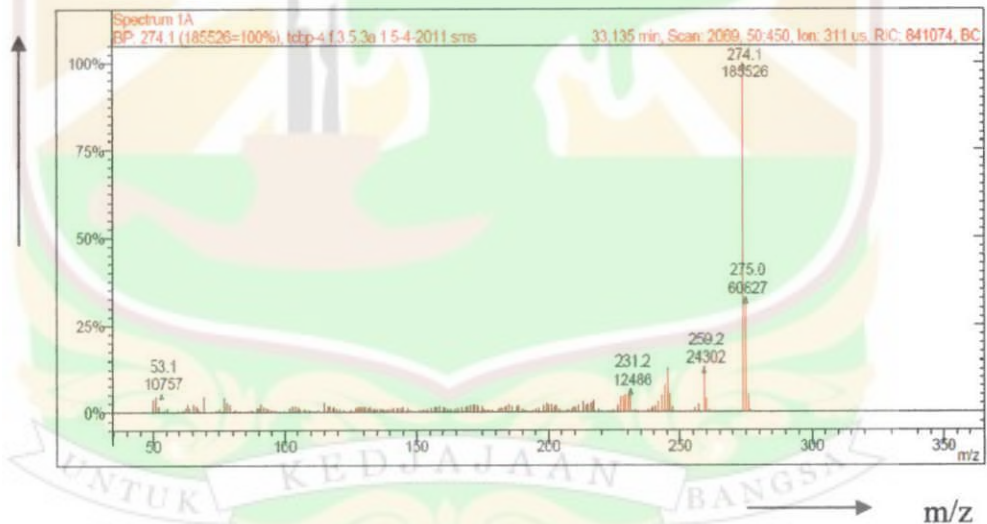
Fraksi 3e₁, 3e₂, 3e₃, 3e₄, 3e₅, dan 3e₆ diidentifikasi struktur kimianya. Namun, yang dijelaskan lebih lanjut hanya fraksi 3e₃ dan 3e₅ karena fraksi ini mempunyai aktivitas yang lebih bagus dibandingkan fraksi lainnya. Hasil analisis GC-MS fraksi 3e₃ (gambar 6) memperlihatkan adanya satu puncak senyawa yang tinggi pada waktu retensi 33.23 menit. Spektrum MS senyawa pada puncak tersebut memiliki *base peak* pada 274 m/z. Hasil perbandingan spektrum massa (gambar 7) senyawa fraksi 3e₃ dengan *NIST Library and Wiley* memperlihatkan tidak ada kemiripan dengan spektrum massa dari database tersebut. Hal ini diduga, kemungkinan fraksi 3e₃ merupakan senyawa baru yang belum diidentifikasi struktur kimianya.

Intensitas



Gambar 7. Kromatogram GC fraksi 3e₃

Kelimpahan relatif

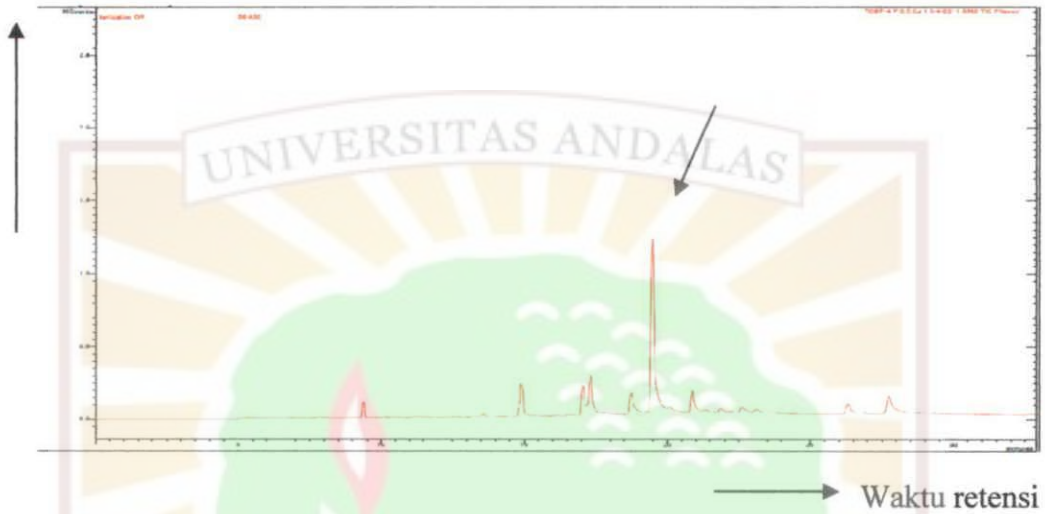


Gambar 8. Spektrum MS fraksi 3e₃

Hasil analisis GC-MS fraksi 3e₅ (gambar 8) memperlihatkan adanya satu puncak senyawa yang tinggi pada waktu retensi 19.53 menit dan beberapa pengotor. Diduga, puncak senyawa yang tinggi inilah yang berperan dalam menghambat mikroba patogen dalam penentuan nilai MIC. Spektrum MS senyawa pada puncak tersebut memiliki *base peak* pada 248 m/z. Hasil

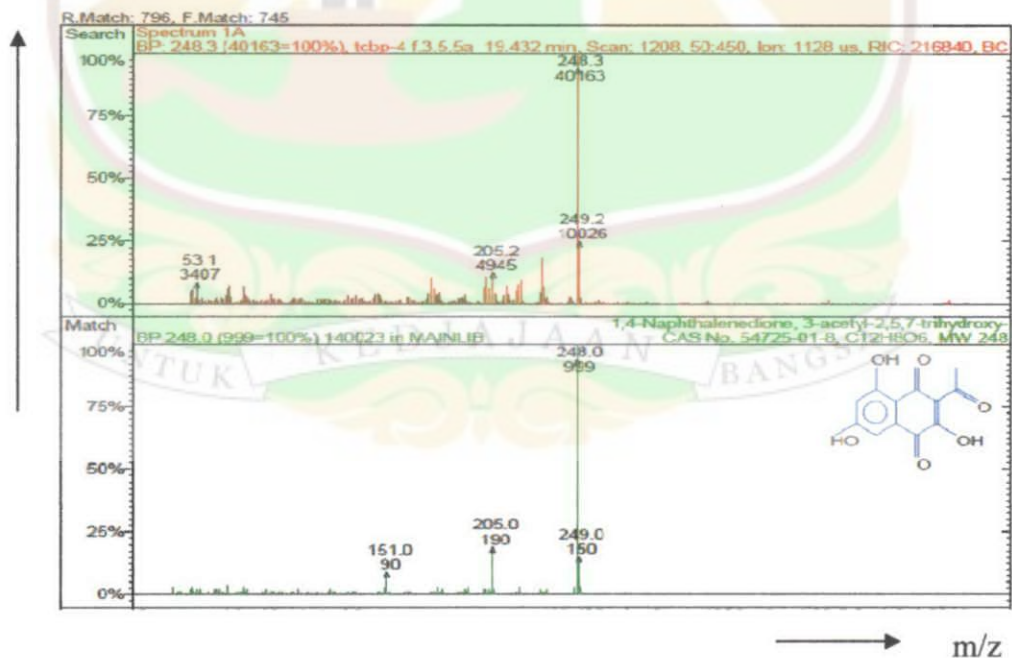
perbandingan spektrum massa (gambar 9) senyawa fraksi 3e₅ dengan *NIST Library and Wiley* memperlihatkan kemiripan dengan spektrum massa dari 1,4-naftalendion-3-asetil-2,5,7-trihidroksi dengan rumus molekul C₁₂H₈O₆.

Intensitas



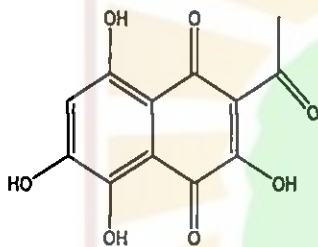
Gambar 9. Kromatogram GC fraksi 3e₅

Kelimpahan relatif



Gambar 10. Perbandingan spektrum masa fraksi 3e₅ (atas) dengan senyawa 1,4-naftalendion-3-asetil-2,5,7-trihidroksi (bawah).

Struktur yang diusulkan dari senyawa diatas memiliki kerangka 1,4 naftoquinon. Naftoquinon merupakan golongan metabolit sekunder yang berperan sebagai zat warna²⁸. Beberapa senyawa dari golongan ini seperti alkannin, shikonin dan turunannya memiliki aktivitas biologis sebagai antiinflamasi, antibakteri, antifungal, antioksidan, dan antitumor²⁹. Dari penelusuran secara literatur, struktur senyawa ini identik dengan struktur senyawa spinocrom M (2,7 dihidroksi-3 asetil-naptazarin), yaitu senyawa golongan naftoquinon yang diisolasi dari pigmen landak laut *Echinometra oblonga* Blainville dan *Colobocentrotus atratus* Linn³⁰.



Gambar 11. Spinocrom M

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diambil beberapa kesimpulan, yaitu:

1. Metabolit bioaktif pada fraksi 3e₃ ekstrak etil asetat jamur endofit TCBP 4 diduga merupakan senyawa baru yang belum teridentifikasi struktur kimianya.
2. Metabolit bioaktif pada fraksi 3e₅ ekstrak etil asetat jamur endofit TCBP 4 diduga merupakan senyawa 1,4-naftalendion-3-asetil-2,5,7-trihidroksi dengan rumus molekul C₁₂H₈O₆.
3. Fraksi 3e₃, 3e₄, 3e₅, dan 3e₆ ekstrak etil asetat dari jamur endofit TCBP 4 memiliki aktivitas biologi sebagai antimikroba, melawan mikroba patogen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Eschericia coli*, dan *Candida albicans*.
4. Fraksi 3e₃, 3e₄, dan 3e₅ ekstrak etil asetat jamur endofit TCBP 4 memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi antibiotik.

5.2 Saran

Beberapa saran untuk penelitian lanjutan diantaranya:

1. Pemurnian lebih lanjut terhadap 3e₁, 3e₂, 3e₄, 3e₅, dan 3e₆.
2. Dilakukan penetapan struktur lebih lanjut terhadap fraksi 3e₃ dengan melakukan analisa spektroskopi yang lain disamping data analisis yang telah ada.
3. Isolasi dan identifikasi metabolit sekunder lainnya dari kultur jamur endofit TCBP 4 serta uji aktivitas biologinya.

DAFTAR PUSTAKA

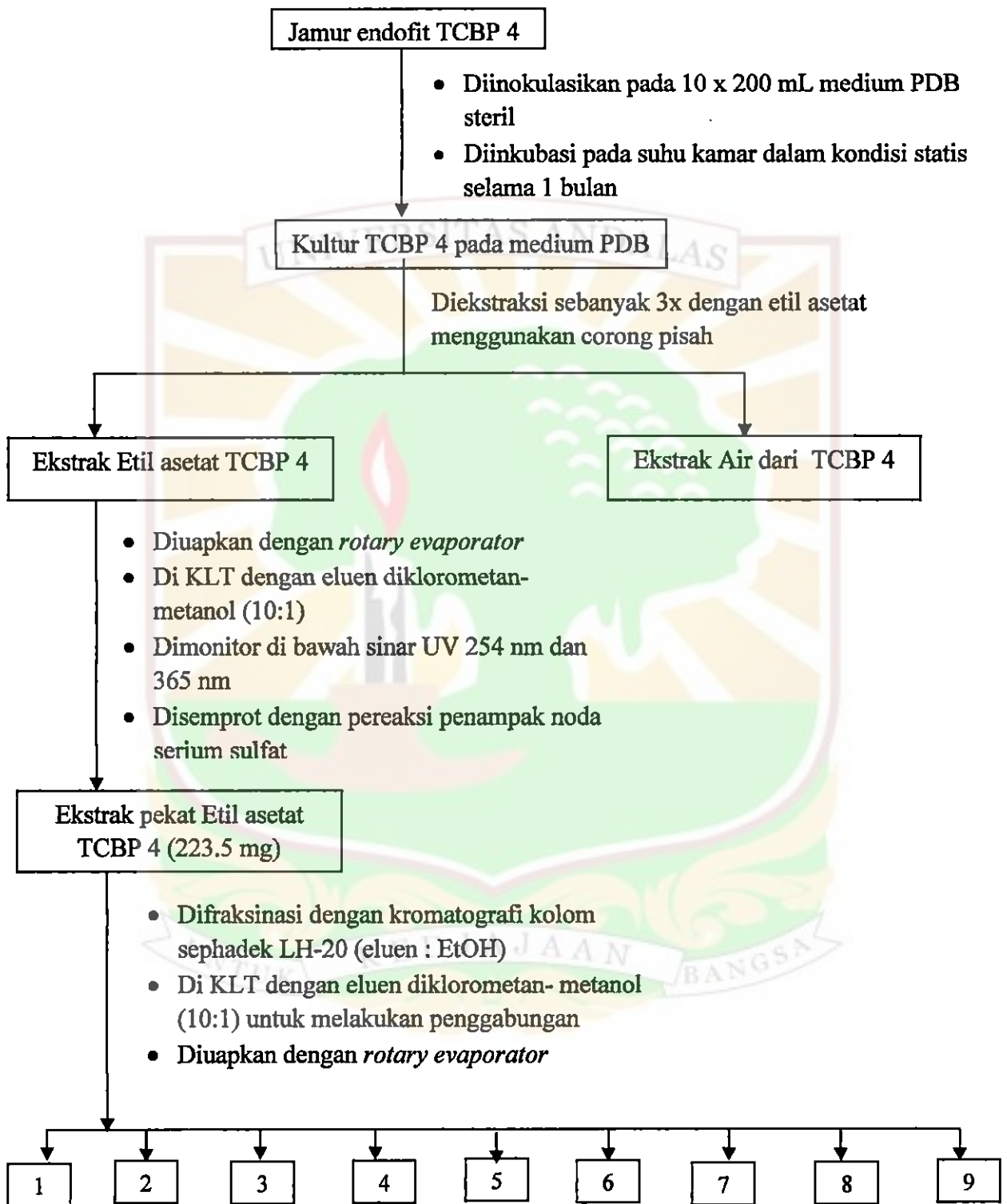
1. Jamal, Y., M. Ilyas, A. Kanti, dan A. Agusta. 2008. Diversitas dan Profil Metabolit Sekunder Jamur Endofit yang diisolasi dari Tumbuhan Gambir (*Uncaria gambier*) serta Aktivitas Biologisnya Sebagai Antibakteri. *Berita Biologi*. 9(2). 149-154.
2. Barik, B.P., K. Tayung P.N. Jagadev, dan S.K. Dutta. 2010. Phylogenetic Placement of an Endophytic Fungus *Fusarium oxysporum* Isolated from *Acorus calamus* Rhizomes with Antimicrobial Activity. *EJBS* 2 (1). 8-16.
3. Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit Dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. II (3). 113 – 126.
4. Zulkhairi, A., M.A. Abdah, M. Kamal, B. Hasnah, F. Fazali, F.A. Khairunnur, K.A. Kamilah, M.S Zamree, dan M. Shahidan. 2008. Biological Properties of *Tinospora crispa* (Akar Patawali) and Its Antiproliferative Activities on Selected Human Cancer Cell Lines. *Mal J Nutr*. 14(2). 173 – 187.
5. Ling, K.H., C.T. Kian, dan T.C. Hoon. 2009. *A Guide to Medicinal Plants, An Illustrated, Scientific and Medicinal Approach*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore.
6. Dweck, A.C., dan J.P. Cavin. 2006. *Andawali (Tinospora crispa) – A Review*. Personal Care 2006. Nanterre, France.
7. Sukadana, I.M., W.S. Rita, dan F.R. Koreh. 2007. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antimakan dari Batang Tumbuhan Brotowali (*Tinospora tuberculata* BEUMEE.). *Jurnal Kimia*. 1 (1). 55-61.
8. Simarmata, R., S. Lekatompessy, dan H. Sukiman. 2007 Isolasi Mikroba Endofit dari Tanaman Obat Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) dan Analisis Potensinya Sebagai Antimikroba. *Berk. Penel. Hayati*. 13. 85-90.
9. Tan, R.X., dan W.X. Zou. 2001. Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18. 448–459.
10. Febriyanto, E., 2011. *Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Alkaloid yang Berpotensi Sebagai Antibakteri dari Jamur Endofit TCDC-2 pada Tumbuhan Bratawali (Tinospora crispa)*. Tesis Program Pasca Sarjana Universitas Andalas. Padang.
11. Anonim. 2008. *Taksonomi Koleksi Tanaman Obat Kebun Obat Citeureup*. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. Jakarta.
12. Prasko. "Khasiat Brotowali". <http://zona-prasko.blogspot.com/2011/05/khasiat-brotowali.html>. (diakses tanggal 2 Mei 2011).

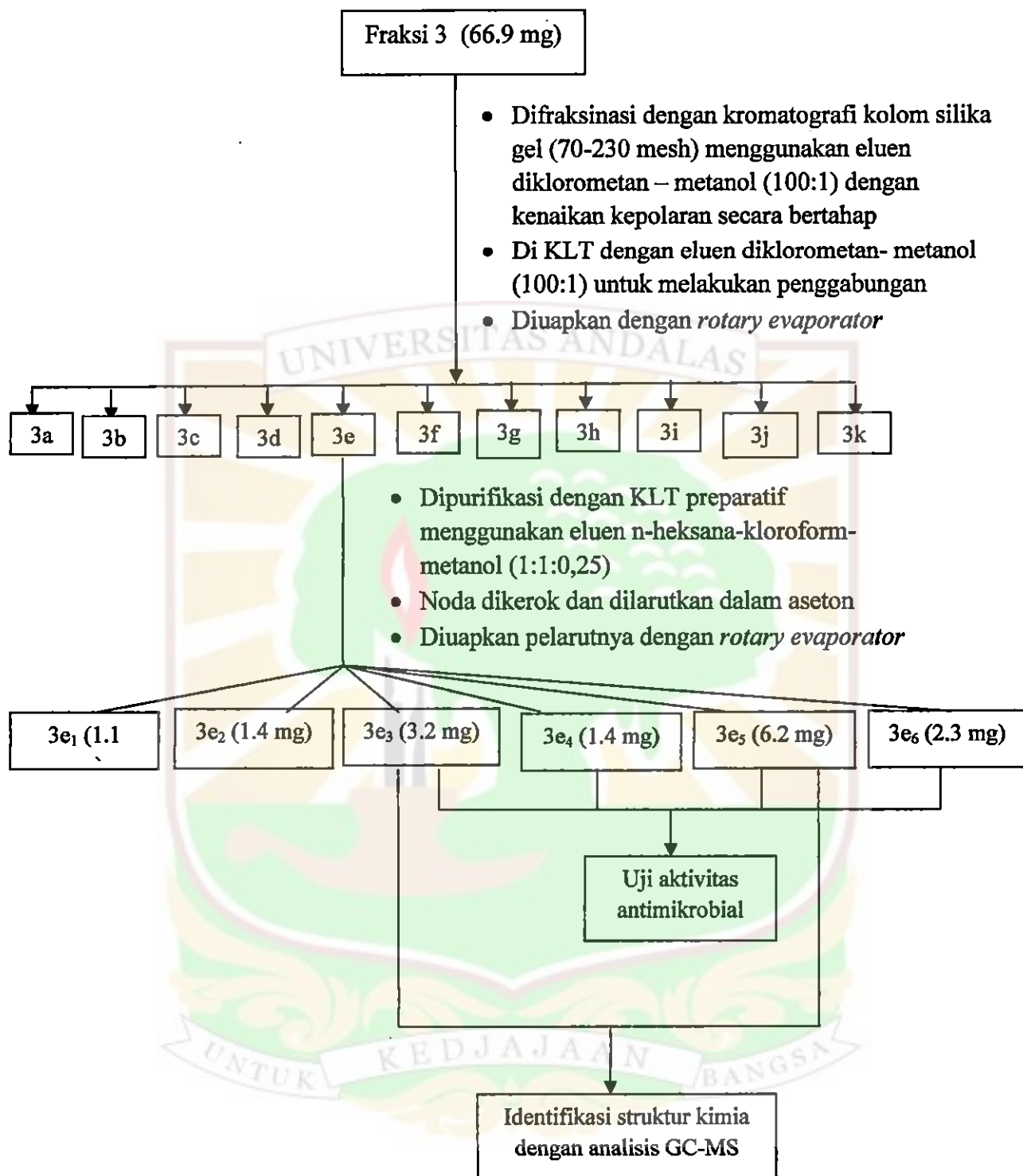
13. Kardaron, D. "Brotowali (*Tinospora crispa* Miers. Hool. f. & Thems)". http://www.asiamaya.com/jamu/isi/brotowali_tinosporacrispa.htm. (diakses tanggal 12 Desember 2010).
14. Cavin, A., K. Hostettmann, W. Dyatmyko, dan O. Potterat. 1998. Antioxidant and Lipophilic Constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Medica*. 64. 393-396.
15. Kongkathip, N., P. Dhumma-upakorn, K. Chawanoraset, dan S. Hatthakitpanichakul. 2002. Study on Cardiac Contractility of Cycloeucalenol and Cycloeucalenone Isolated From *Tinospora crispa*. *Journal of Ethnopharmacology*. 83. 95-99.
16. Strobel, G., dan B. Daisy. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67. 491-502.
17. Clay, K. 1988. Fungal Endophytes of Grasses : A Deensive Mutualism Between Plants and Fungi. *Ecology*. 69 (1) : 10-16.
18. Agusta, A. 2009. *Biologi dan Kimia Jamur Endofit*. Penerbit ITB. Bandung.
19. Mumpuni, E., Amalia, T. Parwati, dan P. Simanjuntak. 2004. Produksi asam Lemak Oleat oleh Mikroba Endofit *Sporodiobolus salmonicolor* dari Tumbuhan Kina (*Chincona pubescens* Vahl.). *Alchemy*. 3 (2). 16-21.
20. Khopkar, S.M., 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*, diterjemahkan oleh: Pudjaatmaka, A.H dan Setiono. UI Press. Jakarta.
21. Gritter, R.J., J.M. Bobbit dan A.E. Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi*. ITB Press. Bandung.
22. Satrohamidjojo, H. 2001. *Dasar-dasar Spektroskopi*. Penerbit Liberty. Yogyakarta.
23. Gunawan, S.G., R. Setiabudy, Nafrialdi, dan Elysabeth. 2007. *Farmakologi dan Terapi* Edisi Lima. Gaya Baru. Jakarta.
24. Champney, W.,S. 2008. *New Antibiotic Targets*. Humana Press. Totowa, New Jersey.
25. Hites, R.A., *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. Indiana University School of public and Eviromental Affairs and Department of Chemistry.
26. Agusta, A. 2000. *Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia*. Penerbit ITB. Bandung.

27. Astuti, D. 2009. *Aktivitas Antibiotik (+)-2,2'- episitokirin dari Jamur Endofit Diaporthe sp. yang diisolasi dari Tumbuhan Gambir (Uncaria gambir Roxb rubiaceae)*. Skripsi Universitas Andalas. Padang.
28. Babula, P., V. Adam, L. Havel, and R. Kizek. 2009. Noteworthy Secondary Metabolites Naphthoquinones – their Occurance, Pharmacological Properties and Analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*. Vol. 5, (1). 47-68.
29. Yazdinezhad, A., H.R. Monsef, Y. Amanzadeh, S.E. Sadat Ebrahimi, M.H. Ghahremani, and S.N. Ostad. 2009. Naphthazarin Derivates from *Alkanna Frigida*. *European Journal of Scientific Research*. Vol. 27 (1). 29-33.
30. Singh, I., 1967. *Synthetic Approaches Toward Naphtazarin Derivatives*. Dissertation. University of Hawaii. Michigan.



Lampiran 1. Bagan Kerja Penelitian





Lampiran 3. Gambar Jamur Endofit TCBP 4

(a). Tampak atas

(b). Tampak bawah



(a)

(b)

Lampiran 5. Gambar alat yang digunakan



Rotary evaporator



UV Cabinet



Timbangan digital



Autoclave



Laminar Air Flow



Inkubator