

SENYAWA FENOLAT DARI JAMUR ENDOFITIK *CLADOSPORIUM SP* TUMBUHAN BROTOWALI (*TINASPORA CRISPA* L)Elfita^{1)*}, Muharni¹⁾¹Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sriwijaya, Jl. Raya Palembang-Prabumulih
Km. 32, Indralaya, Ogan Ilir, Sumsel, 30662
*Email: el_fi_ta@yahoo.com**Abstrak**

Mikroba endofitik adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tumbuhan pada periode tertentu dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tumbuhan tanpa membahayakan inangnya. Setiap tumbuhan tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofitik yang mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang diduga sebagai koevolusi atau transfer genetik dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofitik. Telah diisolasi delapan jamur endofitik dari tanaman brotowali (batang dan daun). Ke delapan jamur tersebut adalah BB1-BB5 dan BD4-BD6. Jamur BB5 (*Cladosporium sp*) dikultur dalam 2L media PDB selama empat minggu dan disaring untuk memisahkan media dengan jamurnya. Selanjutnya media yang sudah mengandung metabolit sekunder dipartisi menggunakan etil asetat sebanyak 2L dengan tiga kali ulangan hingga didapatkan 2,6 g ekstrak etil asetat. Ekstrak tersebut dipreabsorpsi dan dipisahkan dengan kromatografi kolom menggunakan eluen heksan-etilasetat secara bergradien. Pemurnian dilakukan dengan rekromatografi kolom hingga didapatkan senyawa murni berupa kristal jarum berwarna putih yang termasuk senyawa fenolat.

Kata kunci: senyawa fenolat, jamur endofitik, *Cladosporium sp*, brotowali

PENDAHULUAN

Mikroba endofitik adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tumbuhan pada periode tertentu dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tumbuhan tanpa membahayakan inangnya. Setiap tumbuhan tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofitik yang mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang diduga sebagai koevolusi atau transfer genetik dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofitik (Tan and Zou, 2001).

Isolasi senyawa bioaktif dari bahan alam tumbuh-tumbuhan yang berorientasi pada penyediaan bahan aktif obat-obatan, sering mengalami kendala yaitu rendemen yang sangat rendah. Untuk menuju maksud ini tentu diperlukan senyawa aktif dalam jumlah yang banyak. Selama ini beberapa upaya untuk memperbanyak senyawa aktif tersebut diantaranya adalah dengan kultur jaringan, mencari enzim dalam tumbuhan tersebut yang berperan dalam pembentukan senyawa aktif, transplantasi gen ke dalam sel bakteri, dan sintesis laboratorium (Radji, 2005 dan Elfita dan Muharni, 2009)

Selain itu ada cara lain untuk mendapatkan senyawa bioaktif yaitu dengan memanfaatkan mikroba endofitik yang terdapat spesifik pada setiap tumbuhan. Mikroba ini hidup bersimbiosis saling menguntungkan dengan tumbuhan inangnya dan dapat bersama-sama menghasilkan metabolit sekunder tertentu (Hung and Annapurna, 2004 dan Hundley, 2005). Dengan mengisolasi mikroba endofitik dari tumbuhan inangnya, maka mikroba ini dapat

dikultivasi dalam waktu yang singkat sehingga menghasilkan metabolit sekunder dalam jumlah yang sesuai dengan kebutuhan. Cara ini perlu dikembangkan karena memiliki keunggulan dari segi waktu dan biaya.

Banyak jenis tumbuhan di dunia, maka perlu suatu pendekatan agar dapat mempermudah pencarian mikroba endofitik yang menunjukkan aktivitas biologis tertentu. Salah satunya adalah tumbuhan yang memiliki sejarah etnobotani yang terkait dengan beberapa penggunaannya dalam pengobatan atau aplikasi spesifik, sehingga peluang untuk mendapatkan senyawa aktif akan lebih besar (Strobel *et al.*, 2004)

METODE PENELITIAN

Bahan. Bahan penelitian berupa tumbuhan brotowali, media PDA dan PDB untuk isolasi jamur endofitik, serangkaian media yang umum digunakan untuk uji-uji fisiologis atau enzimasi dalam identifikasi mikroba, bahan-bahan kimia yang digunakan untuk pemisahan dan pemurnian metabolit sekunder yang terdiri dari: berbagai pelarut organik (diantaranya metanol, *n*-heksan, etil asetat, diklorometan, aseton, kloroform), kromatografi kolom grafitasi (KKG) menggunakan Si-gel 60G (70-230 Mesh), dan analisis KLT menggunakan plat KLT Kiessel gel 60 F₂₅₄, 0,25 mm, 20 x 20 cm.

Alat. Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini antara lain: colony counter, autoklaf, alat inkubator, water bath, shaker incubator, timbangan analitik, refreegerator, mikroskop, hotplat magnetic, foto mikroskop,

vakum evaporator, lampu UV, kolom kromatografi, dan alat-alat gelas lainnya yang biasa digunakan dilaboratorium Kimia Organik dan laboratorium Mikrobiologi.

Prosedur kerja. Penelitian ini diawali dengan isolasi jamur dari tanaman brotowali dan seleksi isolat jamur yang menghasilkan metabolit sekunder potensial (Misaghi and Donndelinger, 1990 dan Lumyong *et al.*, 2001). Setelah diperoleh isolat jamur potensial maka dilanjutkan pada tahap optimasi pertumbuhan setiap isolat mikroba endofitik terseleksi untuk mendapatkan kultur yang optimal (Chandrashekhara *et al.*, 2007). Isolat jamur potensial dikultivasi pada kondisi yang optimum sehingga mampu menghasilkan senyawa bioaktif yang maksimum, dan dipanen berdasarkan fase pertumbuhan yang diperoleh. Tahap selanjutnya adalah isolasi senyawa metabolit sekunder dari mikroba endofitik terseleksi (Hundley, 2005).

Isolat yang berpotensi menghasilkan senyawa metabolit sekunder, dikultur kembali dalam 2 L medium cair PDB dan diinkubasi hingga kondisi optimum untuk menghasilkan senyawa bioaktif. Selanjutnya dilakukan penyaringan untuk memisahkan antara biomassa dan filtratnya. Filtrat yang mengandung metabolit sekunder aktif difraksinasi cair-cair (partisi) dengan *n*-heksan dan etil asetat. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dengan *rotary evaporator*, sehingga didapatkan ekstrak kental *n*-heksan dan etil asetat. Setiap fraksi dianalisa dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan pelarut dengan berbagai eluen, selanjutnya dikromatografi kolom gravitasi (KK) menggunakan fasa diam Si gel dengan perbandingan 1 : 30. Sampel yang sudah disiapkan secara preabsorpsi, dimasukkan ke dalam kolom kromatografi secara merata dan dielusi menggunakan eluen dengan kepolaran meningkat. Eluat ditampung dalam botol, dan masing-masing dikromatografi lapis tipis untuk dikelompokkan ke dalam fraksi kolom. Masing-masing fraksi kolom diuapkan dan selanjutnya dipisahkan dan dimurnikan dengan teknik kromatografi dan rekristalisasi hingga didapatkan senyawa murni. Identifikasi senyawa murni dilakukan dengan melihat pola noda pada plat KLT dengan penampak noda lampu UV, uji fitokimia, dan pengukuran spektroskopi ¹H-NMR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

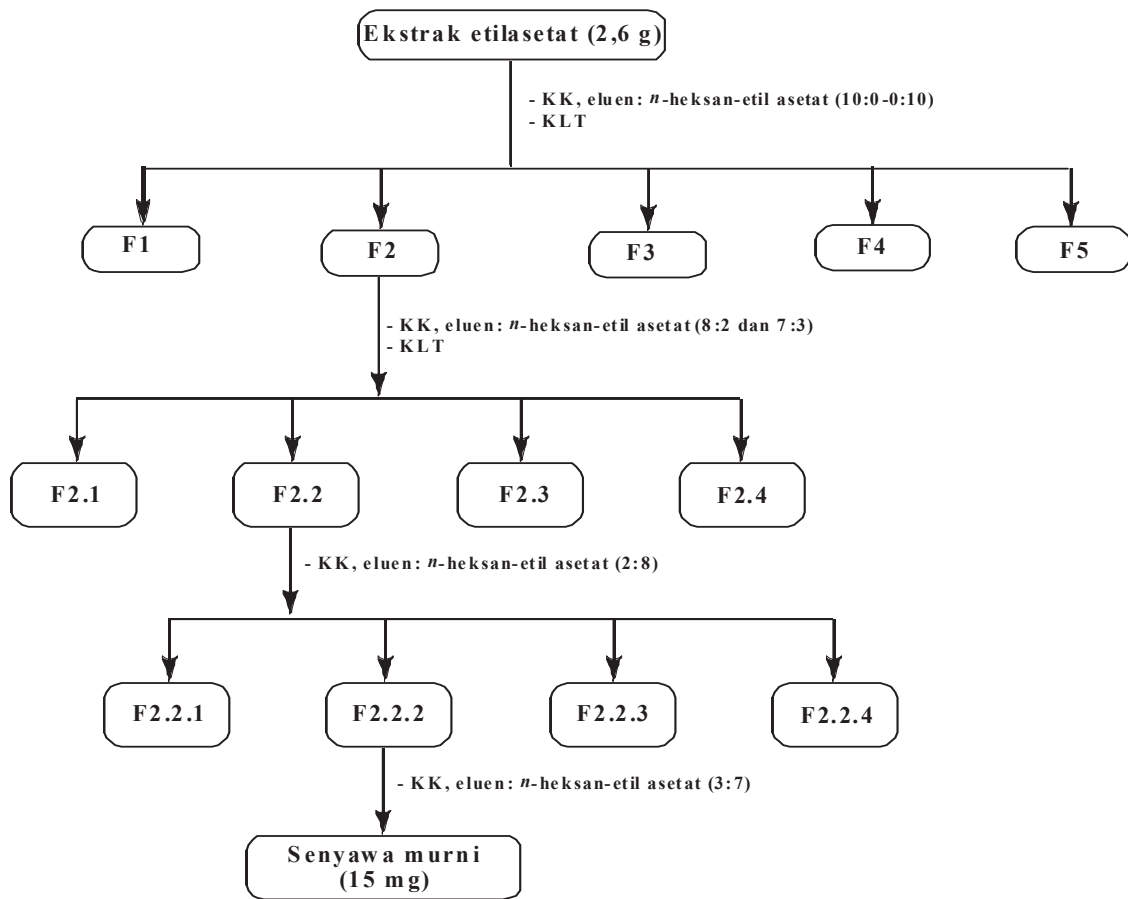
Dari tanaman brotowali (batang dan daun) telah diisolasi delapan jamur yaitu BB1-BB5 dan BD4-BD6. Masing-masing isolat jamur yang diperoleh telah dikultivasi dalam 1,5 L

medium cair PDB selama empat minggu dan kemudian di saring. Ekstrak etil asetat masing-masing isolat setelah di KLT menunjukkan bahwa isolat jamur BB5 berpotensi untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder. Selanjutnya terhadap isolat jamur tersebut telah dilakukan tahap optimasi pertumbuhan untuk mendapatkan kultur yang optimal. Dari data yang dihasilkan dapat diketahui bahwa waktu yang tepat untuk mengisolasi metabolit sekunder yaitu pada hari ke-30 yang berada diakhir pertumbuhan yang terlihat pada kurva merupakan fase stasioner dimana pada fase tersebut pertumbuhan jamur akan terjadi keseimbangan antara pertumbuhan dan kematian sehingga pada fase tersebut juga akan dihasilkan metabolit sekunder yang maksimal. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa jamur SD2 adalah *Cladosporium sp.*

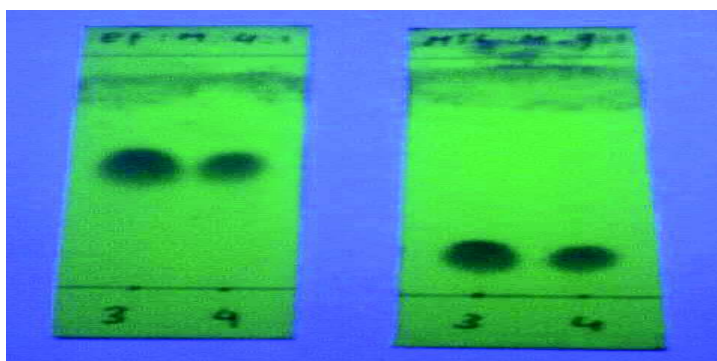
Jamur *Cladosporium sp* kembali dikultivasi dalam 2 L medium PDB selama 30 hari, supernatannya diekstraksi dengan cara partisi masing-masing menggunakan pelarut *n*-heksan dan etilasetat, yang dilanjutkan dengan evaporasi. Dari hasil evaporasi diperoleh 1,0 g ekstrak *n*-heksan dan 2,6 g ekstrak etil asetat. Ekstrak etil asetat (2,6 g) dipreabsorpsi dan dikromatografi kolom gravitasi menggunakan eluen *n*-heksan-etil asetat secara bergradien dan ditampung dalam 56 vial masing-masing berisi 10 mL. Setelah di KLT maka dikelompokkan menjadi lima fraksi kolom (F1-F5). Fraksi F2 menunjukkan noda potensial sehingga direkromatografi kolom menggunakan eluen *n*-heksan-etil asetat (8:2 dan 7:3) hingga diperoleh 35 vial dan di KLT. Hasilnya dapat dikelompokkan kedalam empat fraksi kolom yaitu F2.1-F2.4. Fraksi F.2.2 dengan noda potensial dimurnikan dengan rekromatografi kolom hingga diperoleh senyawa murni berupa kristal putih sebanyak 15 mg. Skema pemisahan dan pemurnian senyawa hasil isolasi tertera pada Gambar 1.

Hasil identifikasi senyawa hasil isolasi pada plat KLT terlihat noda tunggal berwarna ungu dengan penampak noda lampu UV. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa ini merupakan senyawa aromatik yang salah satunya adalah sebagai senyawa fenolat. Hal ini juga didukung oleh uji fitokimia dengan FeCl₃ yang positif turunan fenolat. Foto pola noda senyawa hasil isolasi tertera pada Gambar 2.

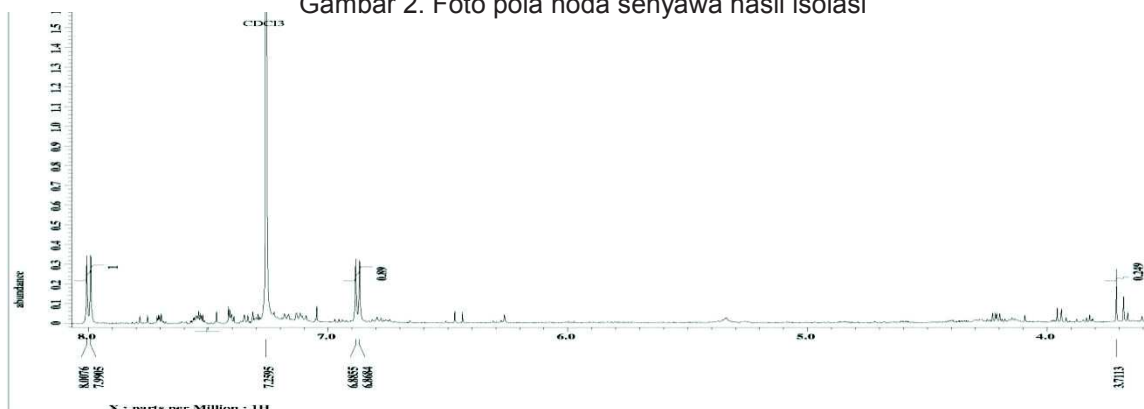
Analisis spektroskopi senyawa hasil isolasi yang telah dilakukan adalah NMR 1D yaitu ¹H-NMR, spektrum tertera pada Gambar 3.



Gambar 1. Skema pemisahan dan pemurnian senyawa hasil isolasi



Gambar 2. Foto pola noda senyawa hasil isolasi



Gambar 3. Spektrum ¹H-NMR senyawa hasil isolasi

Dari spektrum $^1\text{H-NMR}$ diketahui bahwa senyawa hasil isolasi memiliki dua proton aromatik masing-masing pada δ_H 7,99 ppm (1H, d, $J=8,5$ Hz) dan 6,87 ppm (1H, d, $J=8,5$ Hz). Hal ini menunjukkan bahwa proton pada δ_H 7,99 ppm bertetangga atau bersebelahan dengan proton pada δ_H 6,87 ppm, yang diindikasikan oleh harga tetapan kaplingan yang sama antara kedua sinyal proton tersebut yaitu 8,5 Hz. Sinyal proton yang lain muncul pada δ_H 1,59 ppm (2H, m); 1,42 ppm (1H, q); 1,25 ppm (3H, s); 0,87 ppm (3H, m); dan 0,83 ppm (3H, m).

Berdasarkan pola noda pada plat KLT, uji fitokimia, dan spektroskopi $^1\text{H-NMR}$, maka senyawa hasil isolasi diidentifikasi sebagai senyawa turunan fenolat.

SIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian ini adalah bahwa jamur endofitik yang hidup pada tumbuhan inang brotowali dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder. Berdasarkan pola noda pada plat KLT, uji fitokimia, dan spektroskopi $^1\text{H-NMR}$, maka senyawa hasil isolasi diidentifikasi sebagai senyawa turunan fenolat. Metabolit sekunder golongan fenolat ini merupakan kelompok senyawa bioaktif yang sudah terbukti berkhasiat sebagai obat. Oleh karena itu senyawa hasil isolasi ini sangat berpotensi untuk dijadikan kandidat obat dan dapat diperbanyak sesuai kebutuhan dalam waktu yang relatif singkat.

DAFTAR PUSTAKA

Chandrashekhara, Niranjanraj, S., Deepak, S.A., Amruthesh, K.N., Shetty, N.P., and Shetty, H.S. 2007. Endophytic Bacteria from Different Plant Origin Enhance Growth and Induce Downy Mildew Resistance in Pearl Millet.

Asian Journal of Plant Pathology, 1 (1): 1-11.

- Elfita dan Muharni, 2009. Metabolit Sekunder dari Jamur Endofitik Tumbuhan Sambiloto (*Andographis paniculata* Nees). Simposium Nasional Kimia Bahan Alam XVII tanggal 27-28 Oktober, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Hundley, N.J. 2005. Struktur Elucidation of Bioactive Compounds Isolated from Endophytes of *Alstonia Scholaris* and *Acmena Graveolens*. Thesis. Department of Chemistry and Biochemistry, Brigham Young University.
- Hung, P.Q. and Annapurna, K. 2004. Isolation and Characterization of Endophytic Bacterial in Soybean (*Glycine* sp.). *Omonrice*, 12: 92-101.
- Lumyong, S., Norkaew, N., Ponpathachart, D., Lumyong, P., and Tomita, F. 2001. Isolation, Optimization, and Characterization of Xylanase from Endophytic Fungi. *Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources. The Tropic*, 15.
- Misaghi, I.J. and Donndelinger, C.R. 1990. Endophytic Bacteria in Symptom-Free Cotton Plants. *The American Phytopathological Society*, 80 (9): 808-811.
- Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2(3): 113-126.
- Strobel G., Daisy B., Castillo U., and Harper J. 2004. Natural Products from Endophytic Mikroorganisms. *J. Nat. Prod*, 67, 257-268.
- Tan, RX and Zou, WX. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod. Rep.* 18: 448-459