

## **Aktivitas Antimikroba Ekstrak Jamur Endofit *Kabatiella caulivora* var. B yang Diisolasi dari *Alyxia reinwardtii* BL**

### **(Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi *Kabatiella caulivora* var. B Isolated from *Alyxia reinwardtii* BL)**

NOOR ERMA SUGIJANTO\*, DIAN ANGGRAENY, NOOR CHOLIES ZAINI

Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Darmawangsa Dalam Selatan, Surabaya, Indonesia.

Diterima 28 Agustus 2010, Disetujui 25 Februari 2011

**Abstrak:** Jamur endofit *Kabatiella caulivora* var B diisolasi dari *Alyxia reinwardtii* (pulasari), tumbuhan ini diambil dari Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan, Jawa Timur. Tujuan penelitian ini menentukan aktivitas antimikroba metabolit yang terkandung dalam ekstrak jamur endofit *Kabatiella caulivora* var. B terhadap *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Uji aktivitas antimikroba dilakukan secara difusi cakram (*disc diffusion method*) dengan dua macam konsentrasi ekstrak (10 mg/disk and 5 mg/disk). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat *Kabatiella caulivora* var. B memiliki aktivitas antimikroba terhadap semua mikroba uji pada konsentrasi 10 mg/disk sedangkan ekstrak metanol tidak menunjukkan hambatan pertumbuhan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Candida albicans* pada kadar 5 mg/disk. Penemuan jamur endofit yang mampu menghasilkan metabolit bioaktif merupakan terobosan baru yang berpotensi secara komersial sebagai sumber bahan obat dari mikroba yang ada di dalam tumbuhan inangnya.

**Kata kunci:** *Kabatiella caulivora* var B, *Alyxia reinwardtii* BL, aktivitas antimikroba, jamur endofit.

**Abstract:** Endophytic fungi *Kabatiella caulivora* var B, have been isolated from *Alyxia reinwardtii* which was collected at Purwodadi Botanical Garden, Pasuruan, East Java. The objective of this present work is to asses the antimicrobial activity from extracts of the endophytic fungi *Kabatiella caulivora* var B against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Disc diffusion method was conducted in this project with two concentration extracts (10 mg/disc and 5 mg/disc). The results showed that the methanol and ethyl acetate extracts of *Kabatiella caulivora* var B both have antimicrobial activity against all microbial tested, but the methanol extract showed negative activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* at concentration 5 mg. The discovery of endophytic fungi that produces bioactives metabolites has opened a promising new approach to obtain drugs on a commercial scale from microbes that grow inside plants.

**Key words:** *Kabatiella caulivora* var B, *Alyxia reinwardtii* BL, antimicrobial activity, endophytic fungi.

#### **PENDAHULUAN**

ANTIMIKROBA baru sangat diperlukan untuk terapi beragam penyakit infeksi pada manusia, hewan ternak dan agroindustri, mengingat telah terjadi resistensi pada beragam mikroba dan virus penyebab penyakit, seperti *severe acute respiratory syndrome* (SARS), flu burung, dan peningkatan insiden infeksi jamur pada

akhir-akhir ini<sup>(1)</sup>. Salah satu sumber utama metabolit sekunder berkhasiat obat adalah jamur. Diawali penemuan penisilin pada tahun 1928, dan diikuti beragam jenis antibiotika yang lain membuka jalan untuk mengeksplorasi metabolit sekunder berkhasiat dari jamur<sup>(2)</sup>.

Saat ini di antara beragam jenis jamur, jamur endofit merupakan salah satu yang paling menarik untuk diteliti karena berlimpahnya biodiversitas, kekayaan kimiawi metabolit yang dihasilkan dan keragaman

\* Penulis korespondensi, Hp. 085731212309  
e-mail: ermasugijanto@yahoo.co.id

bioaktivitasnya. Mikroba endofit dapat berupa bakteri, termasuk *Actinomycetes*, ragi dan jamur yang hidup inter dan intraseluler di dalam jaringan tanaman sehat<sup>(3)</sup>. Endofit yang paling sering diisolasi adalah jamur<sup>(2)</sup>. Strobel, juga mengungkapkan kebanyakan endofit yang telah diteliti, sebagian besar merupakan sumber antibiotik<sup>(4)</sup>.

Indonesia sangat kaya biodiversitas hayatinya, sehingga peluang untuk mendapatkan jamur endofit yang berpotensi menghasilkan senyawa berkhasiat obat khususnya sebagai antimikroba sangat besar. Diantara kekayaan tumbuhan obat Indonesia, dipilih *Alyxia reinwardtii* Bl (pulasari) untuk diisolasi jamur endofitnya karena memenuhi semua kriteria tumbuhan inang menurut Strobel dan Daisy<sup>(2)</sup>. *Alyxia reinwardtii* tumbuh di lingkungan hutan hujan tropis dengan ketinggian dan kelembaban tertentu dan akibat penggunaan pulasari sebagai jamu yang terus meningkat sedangkan budidayanya sulit, tumbuhan ini mulai langka. *Alyxia reinwardtii* (pulasari) mengandung senyawa kumarin, 5-hidroksikumarin, 8-hidroksikumarin, pinosresinol, 9  $\alpha$ -hidroksipinosresinol dan salisifoliol<sup>(5)</sup>. Salah satu jamur endofit hasil isolasi dari *A. reinwardtii* yaitu *Kabatiella caulivora* var.B (Kode isolat ALE.30.B) selanjutnya dipilih untuk diteliti lebih lanjut aktifitas antimikrobanya.

Tujuan penelitian ini menentukan aktivitas antimikroba metabolit yang terkandung dalam ekstrak jamur endofit *Kabatiella caulivora* var. B (Kode isolat ALE.30.B) dari tanaman *Alyxia reinwardtii* BL terhadap *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans*. Diharapkan dari hasil penelitian ini dapat dirintis jalan menuju penemuan senyawa antimikroba baru yang selektif dan berkhasiat namun aman digunakan.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** *Alyxia reinwardtii* BL (pulasari) diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur pada bulan April 2003, dan telah diidentifikasi oleh Irawati, LIPI Biologi, Bogor dengan voucher no 710/IPH.1.02/If.8/2003. Jamur endofit *Kabatiella caulivora* var. B diisolasi dari *A. reinwardtii* BL menurut prosedur (6) dan diidentifikasi secara biologi molekuler oleh Arnulf Diesel (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Germany).

Bahan media digunakan agar (*food grade*), *malt extract* (E. Merck), *Saboroud 2% dextrose broth* (Oxoid, CMI), *potatoes dextrose agar* (Difco), dan *nutrient broth* (Oxoid, CMI). Bahan kimia, digunakan NaCl (p.a., E. Merck), etil asetat, metanol, *n*-heksan, *n*-butanol dan diklorometan p.a. (Mallinckrodt Baker Inc. Philipsburg,

NJ), kloroform (p.a., E. Merck), lempeng KLT *Silicagel* 60 F<sup>254\*</sup> dan *Silicagel* 60 G for column (E. Merck). Streptomisin sulfat (PT. Meiji Indonesia no. Batch SS03364-1) dan mikonazol (pharmaceutical grade, P.T. Bernofarm, Surabaya) sebagai pembanding.

Mikroba uji dipakai *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* diperoleh dari ULP (Unit Layanan Pengujian) Fakultas Farmasi sedang *Bacillus subtilis* FNCC 0059 dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.

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

**METODE. Kultivasi jamur endofit.** *Kabatiella caulivora* var. B hasil isolasi dipelihara dalam media malt extract agar, diremajakan setiap enam bulan dan disimpan pada suhu 5-10 °C. Penyiapan inokulum untuk kultivasi dalam media cair, dilakukan peremajaan dengan cara satu Öse jamur endofit dari kultur induk ditumbuhkan dalam media padat *malt extract* dan diinkubasikan selama 7 hari. Satu Öse inokulum yang berumur 7 hari tersebut, ditumbuhkan dalam 40 mL media cair malt extract dengan pH 6.5 dalam labu Erlenmeyer 300 mL, dan diinkubasi secara kultur diam (*static culture*) pada suhu kamar, dipanen pada umur 28 hari<sup>(6)</sup>. Kultivasi massal dilakukan dalam  $\pm$  10 L media cair *malt extract*.

**Preparasi ekstrak *Kabatiella caulivora* var.B.** Metabolit sekunder yg dihasilkan *Kabatiella caulivora* var. B diekstraksi dengan cara kultur endofit disaring. Cairan hasil penyaringan (kaldu fermentasi) diekstraksi dengan etil asetat setengah volumenya, diulang tiga kali. Biomassa jamur hasil penyaringan, setelah dikeringkan 2 x 24 jam pada suhu 50 °C, diekstraksi dengan metanol. Diperoleh ekstrak etil asetat yang mengandung metabolit sekunder dari cairan/kaldu fermentasi dan sebaliknya ekstrak metanol yang berasal dari biomassa jamur. Masing-masing ekstrak dipekatkan dengan *vacuum rotavapor* pada suhu 35 °C.

**Uji aktivitas antimikroba.** Uji aktivitas antimikroba dilakukan secara difusi cakram (*disc diffusion method*) menurut<sup>(7)</sup> terhadap enam mikroba uji. Medium pengujian digunakan *Saboroud 2% dextrose agar* untuk jamur dan nutrient agar untuk bakteri. Streptomisin sulfat digunakan sebagai senyawa pembanding antibakteri dan mikonazol untuk antifungi.

Preparasi inokulum mikroba uji dilakukan dengan cara diambil satu Öse dari kultur persediaan masing-masing koloni digoreskan kepermukaan agar miring,

diinkubasi 24 jam pada suhu 37-38 °C untuk bakteri dan 32-33 °C untuk jamur<sup>(7)</sup>. Biakan mikroba uji umur 24 jam ditambahkan 10 mL larutan natrium klorida 0.9% steril, dikocok dengan vortex sampai koloni mikroba tersuspensikan dengan baik ke dalam larutan. Kemudian suspensi mikroba uji diukur transmittansnya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm dengan blanko larutan natrium klorida 0.9% steril sampai dicapai transmittan 25%<sup>(8)</sup>.

Preparasi larutan uji dilakukan sebagai berikut, ditimbang ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol, dilarutkan dalam larutan tween 20 20% dalam air steril yang telah disiapkan<sup>(8)</sup>, kemudian, diultrasonik secukupnya hingga larut hingga didapatkan larutan induk dengan kadar 500 mg/mL. Diteteskan 10 µL dan 20 µL larutan uji yang setara dengan 5 mg dan 10 mg pada cakram kertas, diletakkan pada permukaan media yang telah diinokulasi dengan mikroba uji dan diamati daya hambatnya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *Kabatiella caulivora* var. B efektif menghambat pertumbuhan mikroba uji baik Gram positif maupun negatif seperti disajikan pada Tabel 1. Aktivitas terbesar ditunjukkan oleh ekstrak etil asetat *Kabatiella caulivora* var. B terhadap *Bacillus subtilis* FNCC 0059 dengan diameter zona hambatan 14.99 ± 1.24 mm, sedang pembandingan streptomisin menghasilkan 25.19 ± 1.14 mm. Ekstrak etil asetat yang mengandung metabolit dari kaldu fermentasi menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap semua mikroba uji pada konsentrasi 10 mg/disk maupun 5 mg/disk, zona hambat yang terbentuk juga relatif lebih besar dibandingkan ekstrak metanol. Hal ini dapat disebabkan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar memiliki kelarutan besar untuk senyawa-senyawa fitokimia (*phytoconstituents*) berkhasiat antimikroba<sup>(7)</sup>. Pada pengamatan jam ke-48 hingga jam ke-72 setelah

inkubasi, ekstrak etil asetat tidak menunjukkan adanya perubahan pada diameter zona hambat, tidak mengalami reduksi ataupun pembesaran. Tidak adanya pertumbuhan mikroba di daerah zona hambat selama lebih 24 jam diasumsikan bahwa ekstrak etil asetat bersifat bakterisida<sup>(7)</sup>, namun pada mikroba uji *Candida albicans*, setelah 24 jam mulai terjadi reduksi diameter zona hambat.

Ekstrak metanol *Kabatiella caulivora* var. B yang mengandung metabolit dari biomasnya menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap lima jenis bakteri uji dan *Candida albicans* pada 10 mg/disk namun tidak menghambat *Candida albicans* dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada kadar ekstrak 5 mg/disk. Hal ini, diduga karena pada konsentrasi ekstrak 5 mg/disk senyawa-senyawa fitokimia (*phytoconstituents*) yang berkhasiat antimikroba terdapat dalam konsentrasi yang relatif kecil sehingga tidak mampu melawan mikroba uji. Aktivitas terendah dihasilkan ekstrak metanol terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (diameter zona hambatan 7.79 ± 0.75 mm). Ekstrak metanol hanya mampu menghambat pertumbuhan mikroba uji pada jam ke-24 setelah inkubasi dan hambatan tersebut semakin lemah ketika jam ke-48, kemungkinan hambatan tersebut bersifat bakteriostatik. Dalam menyimpulkan suatu ekstrak lebih aktif terhadap bakteri Gram negatif atau bakteri Gram positif dan jamur perlu kehati-hatian, jika hanya ditinjau dari perbedaan diameter zona hambat yang terbentuk. Hal ini disebabkan adanya faktor-faktor lain yang mempengaruhi seperti jumlah inokulum dan homogen atau tidaknya larutan ekstrak<sup>(9)</sup>.

Mikroba uji yang digunakan mewakili bakteri Gram positif, Gram negatif, serta jamur penyebab berbagai penyakit seperti infeksi saluran kemih, infeksi mata dan telinga (*Pseudomonas aeruginosa*), infeksi kulit, jerawat, bisul, *cystitis*, *pyelitis* (*Staphylococcus aureus*), infeksi pada penderita *imunocompromise* (*Bacillus subtilis*), diare dan gangguan pencernaan (*Escherichia coli*), demam tifoid, infeksi usus (*Salmonella typhimurium*),

Tabel 1. Aktivitas antimikroba ekstrak *Kabatiella caulivora* var. B.

Mikroba uji	Diameter zona hambat (mm) ± SD				Streptomisin 2 µg	Mikonazol 0.2µg
	Eks MeOH. 10 mg	Eks MeOH 5 mg	Eks EtOAc 10 mg	Eks EtOAc 5 mg		
<i>B. subtilis</i> FNCC 0059	8.88 ± 1.11	7.69 ± 1.12	14.97 ± 1.84	11.72 ± 0.79	25.19 ± 1.14	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7.79 ± 0.79	-	14.78 ± 2.05	12.32 ± 1.41	24.48 ± 0.39	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	11.00 ± 0.95	7.64 ± 0.51	13.36 ± 0.67	11.55 ± 0.96	24.22 ± 0.81	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10.51 ± 0.45	7.99 ± 0.57	19.49 ± 0.52	12.33 ± 0.87	24.61 ± 0.77	-
<i>S. thyphi</i>	10.50 ± 1.26	8.47 ± 0.48	12.11 ± 0.65	11.59 ± 0.37	22.56 ± 0.26	-
<i>C. albicans</i>	7.88 ± 0.62	-	10.97 ± 0.53	9.51 ± 0.09	-	13.36 ± 0.62

Keterangan: MeOH = Ekstrak Metanol; EtOAc = Ekstrak Etil asetat; - = Tidak ada hambatan pertumbuhan

dan keputihan pada wanita atau *candidiasis* (*Candida albicans*)<sup>(8)</sup>. Kepekaan *Pseudomonas aeruginosa* terhadap aktivitas antimikroba ekstrak metabolit dari jamur endofit ini merupakan potensi penting yang patut dicatat sebagai bahan obat untuk melawan infeksi yang ditimbulkannya yang sering sulit diatasi<sup>(10)</sup>.

Pada penelitian pendahuluan telah dilakukan skrining kimiawi KLT-Densitometri terhadap metabolit sekunder dalam ekstrak jamur endofit *Kabatiella caulivora* var. B (ALE.30.B). Hasilnya menunjukkan pada ekstrak metanol terdeteksi senyawa golongan alkohol, keton, terpenoid, seskuiterpen, flavon, asam amino, dan steroid, sedangkan pada ekstrak etil asetat terdapat senyawa golongan seskuiterpen, steroid, dan terpenoid<sup>(11)</sup>. Senyawa-senyawa fitokimia (*Phytochemical constituent*) seperti tanin, flavonoid, alkaloid, dan senyawa aromatik lain yang merupakan metabolit sekunder dapat digunakan sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap hama mikroorganisme, serangga, ataupun herbivora<sup>(7)</sup>. Hal ini mengindikasikan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antimikroba dari kedua macam ekstrak jamur endofit *Kabatiella caulivora* var. B (ALE.30.B) tersebut dihasilkan sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap serangan bakteri dan jamur patogen bagi inangnya. Produksi senyawa bioaktif antara lain yang berkhasiat antimikroba oleh endofit, seperti telah diketahui diakibatkan kekhususan kondisi biologis tumbuhan untuk melindungi diri dari serangan hama patogen<sup>(2)</sup>.

Metabolit yang berkhasiat antimikroba dari kedua jenis ekstrak jamur endofit ini berpeluang untuk diisolasi, diuji, dan digunakan sebagai bahan obat dan biokontrol terhadap bakteri dan jamur patogen pada manusia, tumbuhan dan hewan. Apabila jamur endofit ini mampu memproduksi senyawa antibakteri atau antifungi walaupun kadarnya relatif kecil dapat diupayakan peningkatan kemampuan kapasitas suplainya melalui berbagai cara yaitu, sintesis kimia total, semi sintesis, inovasi kultivasi biomasnya atau fermentasi, rekayasa genetika dan pendekatan kimia kombinatorial<sup>(2)</sup>. Jamur endofit seperti diketahui mempunyai arti ekonomis penting di masa depan karena menyimpan potensi tak terbatas yang saat ini belum banyak diaplikasikan dalam bidang industri farmasi dan pertanian sebagai sumber bahan baku obat, enzim dan senyawa biologis berkhasiat lainnya<sup>(3)</sup>.

### SIMPULAN

Ekstrak metanol dan etil asetat jamur endofit *Kabatiella caulivora* var. B (ALE.30.B) keduanya menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap semua mikroba uji sedangkan ekstrak metanol tidak menunjukkan hambatan pertumbuhan terhadap *Staphylococcus aureus*

ATCC 25923 dan *Candida albicans* pada kadar 5 mg/disk.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Disampaikan terima kasih kepada Depdiknas R.I. atas bantuan finansial untuk penelitian ini melalui Hibah Kompetitif Penelitian Sesuai Prioritas Nasional Tahun 2009, Arnulf Diesel (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Germany) untuk bantuan identifikasi jamur, dan Wardaya untuk pengambilan sampel tumbuhan pulasari dari Kebun Raya Purwodadi.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Tejesvi MV, Nalini MS, Mahesh B, Prakash HS, Kini KR, Shetty HS, Subbiah V. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. *Bol Soc Quim Méx.*, 2007. 1(1):19-26.
2. Strobel G and Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Rev.* 2003. (67):491-502.
3. Tan RX and Zou WX. Endophytes a rich source of fungsional metabolites. *Natural Prod Reports.* 2001. (18):448-59.
4. Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection.* 2003. (5):535-44.
5. Steffan B. Inhaltsstoffe aus Pflanzen der Indonesischen Volksmedizin (Jamu): Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften. Inaugural-Dissertation zue Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. [Dissertation], 2006. 195-6.
6. Sugijanto NE, Diesel A, Ebel R, Indrayanto G, Cholies N. Chemical constituents of the endophytic fungus *Lecythophora* sp. isolated from *Alyxia reinwardtii*. *Natural Product Communications.* 2009. (4):1485-8.
7. Doughari JH. Research article antimicrobial activity of *Tamarandus indica* Linn. *Tropical J Pharm Research.* 2006. (5):597-603
8. Sugijanto NE, Putra H, Pritayuni F, Albathaty N, Cholies N. Daya antimikroba ekstrak *Lecythophora* sp., endofit yang diisolasi dari *Alyxia reinwardtii*. *Berkala Penelitian Hayati.* 2009. (15):37- 44
9. Raviraja NS. Fungal endophytes in five medicinal plant species from Kudremukh Range. *Western Ghats of India J Basic Microbiol.* 2005. (45):230-5.
10. Aliero AA and Afolayan AJ. Antimicrobial activity of *Solanum tomentosum*. *African J Biotechnology.* 2006. (4):369-372.
11. Irfiani N. Studi profil kandungan metabolit jamur endofit *Kabatiella caulivora* (ALE 30 B) dari *Alyxia reinwardtii* BL secara KLT-Densitometri. [Skripsi]. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga; 2005. 99-100.