

Isolasi Senyawa Depside-Depso done dari Lichen Sumatera (*Stereocaulon halei*) dan Uji Aktivitas Antimikroba serta Anti Tuberkulosis

(Isolation of Depside-Depso done Compound from Sumatran Linchen (*Stereocaulon halei*) and Antimicrobial Activity and Anti Tuberculosis Test)

FRIARDI ISMED*, SRI HARTATI, RAMA MULYADI, HANIF ERONI PUTRA,
NAURA PRIMA VIDIAN, DEDDI P. PUTRA.

Laboratorium Biota Sumatera, UPT. Sumber Daya Hayati, Fakultas Farmasi,
Universitas Andalas, Kampus UNAND Limau Manis Padang, Sumatera barat, Indonesia 25163.

Diterima 22 November 2015, Disetujui 18 Februari 2016

Abstrak: Investigasi fitokimia dari Lichen Sumatera (*Stereocaulon halei* Lamb) yang dikoleksi di Gunung Singgalang, Sumatera Barat telah dilakukan. Depsid, atranorin dan depsidon, asam loberat dapat diisolasi dan dipurifikasi secara singkat dari ekstrak etil asetat (15,88 g) masing-masing sebanyak 4,6 g dan 1,18 g. Penentuan struktur dari dua senyawa hasil isolasi diidentifikasi menggunakan ¹H dan ¹³C RMI. Kemudian dilanjutkan dengan pengujian anti mikroba dari setiap ekstrak dan isolat hasil isolasi menggunakan metode difusi agar terhadap bakteri Gram positif (*S. aureus*, *E. faecalis*) dan bakteri gram negatif (*E. coli*, *S. typhosa*, *S. typhimurium* dan *P. auresginosa*). Pada pengujian anti tuberkulosis, masing-masing ekstrak dan senyawa hasil isolasi memperlihatkan hambatan terhadap pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis* H37Rv menggunakan media Lowenstein Jensen. Asam loberat dan atranorin memberikan aktivitas yang besar dalam menghambat bakteri *S. aureus* dengan konsentrasi hambat minimum (KHM) 0,0125%, sedangkan terhadap *M. tuberculosis* H37Rv keduanya memiliki KHM 5 µg/ mL.

Kata kunci: isolasi, Lichen, *Stereocaulon halei* Lamb, anti tuberkulosis, antimikroba.

Abstract: Phytochemical investigation of Sumatran Lichen (*Stereocaulon halei* Lamb) harvested in Singgalang mountain, West Sumatera, has been done. Depside, atranorin and depsidon, lobaric acid were rapidly isolated and purified from the ethyl acetate extract (15.88 g) yielded 4.6 g and 1.18 g, respectively. The structures of the two compounds were identified by ¹H NMR and ¹³C NMR. Further each extracts and isolated compounds were investigated for their antibacterial activity using agar diffusion method against Gram-positive bacteria (*S. aureus*, *E. faecalis*) and Gram-negative bacteria (*E. coli*, *S. typhosa*, *S. Typhimurium* and *P. auresginosa*). Antituberculosis activity of each extracted and isolated compounds showed on growth inhibition of *M. tuberculosis* H37Rv by means of Lowenstein Jensen medium. Lobaric acid and atranorin showed maximum activity against *S. aureus* and *M. tuberculosis* H37Rv bacteria with MIC 0.0125% and 5 µg/ mL, respectively.

Keywords: isolation, Lichen, *Stereocaulon halei* Lamb, antimycobacterium, antimicrobial.

* Penulis korespondensi, Hp. 082389297691
e-mail: friardi@gmail.com

PENDAHULUAN

LICHEN atau yang lebih dikenal dengan lumut kerak merupakan tumbuhan simbiosis antara jamur (*mycobionts*) dan alga atau *Cyanobacteria* (*photobionts*). Tumbuhan ini banyak ditemukan di batang pohon, tanah, batuan, di atas batu cadas, di tepi pantai atau di tebing pegunungan. Sekitar 18.500 spesies lichen telah ditemukan di seluruh dunia dan lebih dari 800 senyawa yang diketahui terdapat pada lichen⁽¹⁾. Beberapa bioaktivitas senyawa kimia dari lichen antara lain, sebagai anti viral, anti jamur, anti inflamasi, analgesik, anti piretik, anti proliferasi, anti protozoal, antidiabetes, anti TB paru, anti kanker dan antimutagen⁽²⁾.

Pada observasi tumbuhan tingkat rendah di Sumatera Barat, khususnya di Gunung Singgalang (2877 m dpl) ditemukan beberapa lichen genus *Stereocaulon* salah satunya yaitu *Stereocaulon halei* Lamb. Karakteristik morfologi yang dimiliki yaitu thallus *S. halei* Lamb berwarna keabu-abuan dengan banyak cabang. Sama seperti lichen yang berasal dari kelompok *ascolichen* lainnya, di atas permukaan thallus dari lichen *S. halei* Lamb terdapat bagian yang menonjol yang disebut *apothecium* yang merupakan tempat penyimpanan spora. Spora ini berfungsi untuk proses perkembangbiakan generatif dari lichen⁽³⁾. *Apothecia* pada *S. halei* Lamb kecil dengan ukuran hingga 1 mm, berwarna coklat hingga kehitaman dan cabang-cabang lateral sederhana. *Pseudopodetia* dari *S. halei* Lamb berupa cabang kecil dan tegak⁽⁴⁾.

Lichen genus *Stereocaulon* memiliki kandungan kimia utama dari kelompok depside-depsidone, disamping kelompok lain seperti dibenzofuran dan fenolik. Kelompok senyawa ini memiliki aktivitas yang sangat luas, salah satunya sebagai antimikroba. Melalui penelusuran literatur, genus *Stereocaulon* dari spesies *S. alpinum* Laur, *S. arcticum* Lynge, *S. vanoyei* Duvign, *S. vesuvianum* Pers. memiliki daya hambat yang sangat tinggi terhadap pertumbuhan beberapa bakteri *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* dan *C. albicans*⁽⁵⁾. Gupta *et al* melaporkan bahwa ekstrak etanol dari *Stereocaulon foliolosum* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis strain* H37Rv dan H37Ra penyebab penyakit tuberkulosis⁽⁶⁾.

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit infeksi terbesar nomor dua penyumbang angka mortalitas dewasa yang menyebabkan sekitar 1,7 juta kematian. Di Indonesia, diperkirakan terdapat 528.000 kasus baru TB per tahun. TB juga menduduki peringkat dari 10 penyebab kematian yang menyebabkan 146.000 kematian setiap tahun⁽⁷⁾. Peningkatan kasus *Multi Drug Resistance Tuberculosis* (MDR-TB)

menjadi salah satu faktor penyebab meningkatnya kasus kematian pada penderita TB, diperkirakan ada sekitar 12.000 lebih pasien *Multi Drug Resistance Tuberculosis* (MDR-TB)⁽⁸⁾.

Penelitian ini bertujuan untuk mencari sumber obat TB baru dari lichen *S. halei* Lamb. Ekstrak dan isolat yang didapat dari lichen *S. halei* Lamb diuji aktivitasnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dengan media Lowenstein Jensen. Sampai saat ini belum ada laporan penelitian tentang aktivitas anti tuberkulosis dari depside, atranorin dan depsidon, asam lobarat. Melihat potensi antimikroba yang tinggi dari genus *Stereocaulon*, maka dilakukan juga uji aktivitas antimikroba dari ekstrak dan isolat *S. halei* Lamb terhadap beberapa bakteri Gram positif dan negatif dengan menggunakan metode difusi agar.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. *Stereocaulon halei* Lamb kering angin, heksan destilasi, etil asetat destilasi, aseton destilasi, metanol destilasi, DCM, anisaldehyd (Merck), H₂SO₄ (Merck), toluen, asam format (Merck), silika gel (Merck 35-70 µm), Sephadex LH-20 (BioChemika Fluka), plat KLT (Merck), biakan *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella typhosa* NCTC 786, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi BPOM Padang, Sumatera Barat, Medium *Nutrient Agar* (NA), DMSO (Merck), NaCl fisiologis, biakan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, media Lowenstein Jensen (Merck), telur bebek, gliserol (Merck), air suling dan air untuk injeksi.

Alat. Spektrofotometer UV-Vis pada Shimadzu Pharmaspec 1700, spektrofotometer FT-IR diukur pada plat KBr menggunakan Perkin Elmer FT-IR, jangka sorong, tabung Mc Cartney, mixer, *Melting Point Apparatus* MP-12615, ¹H (500 MHz) dan ¹³C-NMR (125 MHz) spektra diperoleh dengan menggunakan JEOL 500 MHz.

METODE. Pengambilan Sampel. Lichen *S. halei* Lamb diambil pada bulan Februari 2014 di puncak Gunung Singgalang, Tanah Datar, Sumatera Barat, pada ketinggian 2.877 m di atas permukaan laut. Sampel diidentifikasi di Laboratorium *Mycology*, Universitas de Rennes 1 dan Museum Botani Berlin dengan nomor koleksi FS 13.

Ekstraksi, Fraksinasi dan Isolasi. Lichen *S. halei* Lamb kering-angin (1 kg) diekstraksi dengan

cara maserasi bertingkat dimulai dengan pelarut non polar (*n*-heksana), selama 2 hari dan pengulangan 4 kali dengan volume pelarut 1,2 L lalu dilanjutkan dengan pelarut semi polar (etil asetat dan aseton) dan terakhir dengan pelarut polar (metanol). Ekstrak yang didapat diuapkan pelarutnya dengan *rotari in vacuo* dan dilihat kandungan kimianya dengan metode kromatografi lapis tipis menggunakan eluen/ pengembang standar lichen, yaitu pengembang G (toluene:etil asetat:asam format = 70:25:5) dan pengembang C (toluen:asam asetat = 85:15), lalu divisualisasi dibawah sinar UV (254 dan 365 nm) dan ditambahkan pereaksi penampak noda anisaldehyd- H_2SO_4 dan dipanaskan pada suhu 100 °C untuk melihat warna noda yang muncul dari berbagai senyawa⁽²⁾.

Ekstrak etil asetat (15,88 g) terdiri dari ekstrak kental dan endapan. Endapan dari etil asetat (5,98 g) dikristalisasi dengan *n*-heksan dan etil asetat sehingga didapat senyawa 1 sebanyak 4,66 g. Filtrat ekstrak kental etil asetat (10 g) dipisahkan dengan metode kromatografi kolom *flash* dengan fase diam silika gel (Merck 35-70 μ m), dielusi dengan *n*-heksana, etil asetat dan metanol dengan berbagai tingkat kepolaran (100:0 - 0:100), didapatkan subfraksi 2.1-2.14. Fraksi 2.4-2.10 digabung lalu dipisahkan menggunakan Sephadex LH-20 (BioChemika Fluka) dielusi dengan eluen metanol, didapatkan senyawa 2 berupa kristal putih sebanyak 1,18 g. Kedua senyawa ini dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan pengembang C dan G lalu divisualisasi dibawah sinar UV (254 dan 365 nm). Selanjutnya pada lembar plat KLT disemprotkan pereaksi penampak noda anisaldehyd- H_2SO_4 lalu dipanaskan sehingga memberikan warna jingga untuk senyawa 1 dan merah bata pada senyawa 2. Senyawa murni ini dianalisis dengan pengukuran titik leleh, spektrum IR dan UV-Vis dan dilanjutkan dengan 1H dan ^{13}C RMI.

Uji Antimikroba dari Ekstrak dan Isolat.

Pengujian dilakukan menggunakan metode difusi dengan medium *Nutrient Agar* (NA). Masing-masing ekstrak (ekstrak *n*-heksana, etil asetat, aseton dan metanol) dibuat menjadi 3 konsentrasi yakni 1,25; 2,5 dan 5% dalam DMSO, sedangkan senyawa isolat konsentrasinya 0,0125; 0,025 dan 0,05% dalam DMSO, kontrol negatif digunakan DMSO dan pembanding kloramfenikol 30 μ g/mL. Media NA steril dituangkan pada cawan Petri sebanyak 15 mL untuk Petri kecil dan 30 mL untuk Petri besar. *Cotton bud* steril dicelupkan ke suspensi mikroba uji yang telah diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis hingga transmittan 20%, kemudian dioleskan ke permukaan medium sampai rata.

Cakram yang telah ditetesi zat uji sebanyak 10 μ L diletakkan secara aseptis ke permukaan medium. Cawan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam, kemudian dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter daerah hambat yang terbentuk sekitar cakram menggunakan jangka sorong.

Uji Anti Tuberkulosis dari Ekstrak dan Isolat.

Metode pengujian aktivitas anti tuberkulosis adalah menggunakan metode difusi agar dengan media Lowenstein Jensen. Dibuat larutan induk untuk setiap ekstrak (*n*-heksana, etil asetat, aseton dan metanol) dengan menimbang sebanyak 80 mg dan dilarutkan dalam 5 mL DMSO (larutan Induk 16.000 μ g/mL). Dari larutan induk ini di buat 3 konsentrasi uji yaitu 1600, 800 dan 400 μ g/mL di dalam 5 mL media uji (media Lowenstein Jensen dan sampel uji). Konsentrasi untuk isolat senyawa adalah 3,12; 1,56 dan 0,78 μ g/mL⁽⁹⁾. Pembanding yang digunakan adalah rifampisin 40 μ g/mL, ethambutol 2 μ g/mL dan isoniazid 0,2 μ g/mL serta kontrol DMSO 5 μ g/mL⁽¹⁰⁾. Uji sterilitas media dilakukan dengan cara media uji diinkubasi pada suhu 35-37 °C selama 24 jam. Jika tidak ada mikroba yang tumbuh, media bisa dipakai untuk pengujian.

Suspensi bakteri dibuat dari biakan *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv yang berumur 2-4 minggu. Ukur kekeruhannya hingga setara dengan standar Mc. Farland No. 1. Suspensi bakteri sebanyak 10 μ L diinokulasi pada media yang berisi masing-masing ekstrak, isolat, kontrol negatif dan zat pembanding, tutup botol dengan longgar. Botol diletakkan dalam inkubator dengan kemiringan 300 pada suhu 37 °C selama 24 jam. Botol yang diinkubasi pada hari sebelumnya ditegakkan dan tutupnya dirapatkan. Inkubasi selama 4 minggu dan pengamatan dilakukan setiap minggu. Jika zat uji memiliki aktivitas anti TB, pengamatan dilanjutkan sampai minggu ke-8.

Pembacaan Hasil Pengamatan. Untuk aktivitas antimikroba dilakukan pengukuran diameter zona hambat ekstrak dan isolat pada bakteri uji, sedangkan untuk pengujian anti tuberkulosis dilakukan setiap minggu selama 4-8 minggu, yang diamati adalah jumlah koloni yang tumbuh pada media, dengan pembacaan sebagai berikut: (-): tidak ada pertumbuhan; tulis jumlah koloni: 1-19 koloni; (1+): 20-100 koloni; (2+): 100-200 koloni; (3+): 200-500 koloni (hampir konfluen/ media tertutup oleh hampir seluruh koloni) dan (4+): >500 koloni (konfluen/media tertutup seluruhnya oleh koloni)⁽¹¹⁾.

Analisis data. Data yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel atau grafik, dianalisis dan dihitung nilai rata-rata serta standar deviasi, kemudian dideskripsikan hasilnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi. Dari 1 kg lichen *Stereocaulon halei* Lamb diperoleh ekstrak kental *n*-heksana 2,38 (0,23%), ekstrak etil asetat 20,07 g (2,007%), ekstrak aseton 6,25 g (0,62 %) dan ekstrak metanol 31,88 g (3,18%).

Isolasi Senyawa dari Fraksi Etil Asetat *S. halei* Lamb. Ekstrak etil asetat terdiri dari ekstrak kental dan endapan. Sebanyak 5,98 g endapan etil asetat direkristalisasi sehingga didapatkan 4,66 g senyawa 1 dan dari 10 g ekstrak kental etil asetat *S. halei* Lamb yang di-*sephadex* didapatkan senyawa 2 sebanyak 1,18 g.

Senyawa 1 berupa kristal jarum putih, titik leleh 196-197 °C, Rf 0,86 dengan eluen G, λ_{\max} 269 nm dan spektrum IR 2933,07 (OH aromatik), 2360,06 (C-H) dan 1654,74 (C=O aromatik). Analisis ¹H RMI menunjukkan senyawa 1 memiliki 3 gugus metil (CH₃-) terlihat *singlet* pada pergeseran kimia δ_{H} 2,10; 2,56 dan 2,70. Pada pergeseran δ_{H} 4,00 terlihat sinyal *singlet* yang merupakan sinyal gugus metoksi (-OCH₃). Proton aromatik terlihat pada pergeseran kimia δ_{H} 6,41 dan 6,52 dengan sinyal *singlet*. Adanya gugus aldehid terlihat pada pergeseran δ_{H} 10,37. Pada pergeseran δ_{H} 12,51 dan 12,56 mengindikasikan gugus hidroksil. ¹H dan ¹³C NMR atranorin dibandingkan dengan literatur dapat dilihat pada Tabel 1. Dari penelusuran literatur, struktur senyawa 1 merupakan senyawa depside, atranorin^(2,12). Depside terbentuk dari 2 buah asam fenil karboksilat yang dihubungkan oleh suatu ester.

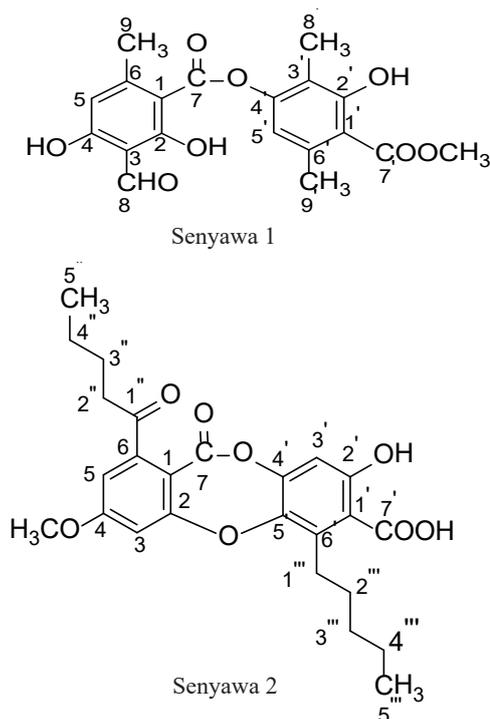
Senyawa 2 memiliki karakteristik kristal jarum, putih, titik leleh 201-202 °C, Rf 0,44 dengan eluen G, λ_{\max} 211, 266 dan 269 nm serta spektrum IR (cm⁻¹)

Tabel 1. ¹H dan ¹³CNMR atranorin dibandingkan dengan literatur.

Posisi	Atranorin ⁽¹²⁾ (500 MHz, CDCl ₃)		Senyawa 1 (500 MHz, CDCl ₃)	
	δ_{C}	δ_{H} (int., mult. <i>J</i> (Hz))	δ_{C}	δ_{H} (int., mult. <i>J</i> (Hz))
1	102,83	-	102,92	-
OH-2	169,09	12,49 (1H,s)	169,17	12,56 (1H,s)
3	108,54	-	108,63	-
OH-4	167,48	12,54 (1H,s)	167,57	12,51(1H,s)
5	112,86	6,39 (1H,s)	112,93	6,41(1H,s)
6	152,46	-	152,51	-
7	169,71	-	169,77	-
CHO-8	193,86	10,35 (1H,s)	193,92	10,37 (1H,s)
CH ₃ -9	25,60	2,68 (3H,s)	25,67	2,56 (3H,s)
1'	151,98	-	116,86	-
2'	116,78	-	162,95	-
3'	162,88	-	152,06	-
4'	110,25	-	110,34	-
5'	139,88	-	139,94	-
6'	116,02	6,51(1H,s)	116,09	6,52 (1H,s)
7'	172,21	-	172,27	-
CH ₃ -8'	9,37	2,09 (3,s)	9,46	2,10 (3H,s)
CH ₃ -9'	24,00	2,54 (3,s)	24,12	2,70 (3H,s)
OCH ₃ -7'	52,36	3,98 (3,s)	52,42	4,00 (3H,s)

3172,95 (OH aromatik), 2959,36 (OH fenolik), 1722,16 (C=O karbonil), 1694,27 (C=O ester), 1607,90 (C=C) dan 1567,53 (C=C). Analisis ¹H RMI menunjukkan senyawa 2 memiliki 2 gugus metil (CH₃) terlihat *multiplet* pada pergeseran kimia δ_{H} 0,95. Terlihat juga adanya rantai alifatik (CH₂-CH₂-) pada pergeseran kimia δ_{H} 1,43; 1,55; 1,68; 2,88 dan 3,29. Pada pergeseran δ_{H} 4,00 terlihat sinyal *singlet* yang merupakan sinyal gugus metoksi (-OCH₃). Proton aromatik terlihat pada pergeseran kimia δ_{H} 6,79 dan 7,03 dengan sinyal *singlet* (dapat dilihat pada Tabel 2). Dari penelusuran literatur, struktur senyawa 2 merupakan senyawa depsidon, asam loberat^(2,13). Jika 2 buah asam fenil karboksilat dihubungkan oleh ester dan eter maka senyawa tersebut disebut depsidone⁽¹⁴⁾. Struktur kimia senyawa 1 dan 2 disajikan pada Gambar 1.

Atranorin dan asam loberat merupakan metabolit sekunder yang diisolasi dari beberapa lichen genus *Stereocaulon* lainnya seperti *Stereocaulon paschale* (L.) Hoffm, *Stereocaulon alpinum* Laur, *S. austroindicum* Lamb dan *S. azureum* (Schaer.) Nyl⁽⁴⁾. Atranorin juga pernah diisolasi dari lichen *Cladonia uncialis*, *Cladonia rangiferin* dan *Cladonia kalbi*⁽¹⁵⁾. Beberapa studi yang menunjukkan bioaktivitas atranorin antara lain sebagai antimikroba⁽¹⁶⁾, antioksidan⁽³⁾, penghambat enzim tripsin⁽¹⁷⁾, pengobatan alzheimer⁽¹⁸⁾, *antinociceptive*⁽¹²⁾, dan analgetik dengan menghambat COX-1 dan COX-2⁽¹⁹⁾, sedangkan aktivitas asam loberat terlihat poten untuk beberapa aktivitas farmakologis seperti antidiabetes⁽²⁰⁾, antimetosis⁽²¹⁾, inhibitor arakidonat 5-lipooksigenase⁽¹³⁾ dan antioksidan⁽³⁾.



Gambar 1. Struktur Metabolit Sekunder dari *S. halei* Lamb.

Table 2. ¹H dan ¹³C RMI asam lobarat dibandingkan dengan literatur.

Posisi	Asam lobarat (¹³)			Senyawa 2		
	(250 MHz, acetone-d ₆)			(500 MHz, acetone-d ₆)		
	δ _C	δ _H (mult., J in Hz)		δ _C	δ _H (mult., J in Hz)	
1	111,64	-		111,64	-	
2	162,83	-		162,83	-	
3	106,04	7,04 (1H, d, J= 2,4)		106,04	7,03 (1H, dd, J= 2,4, 2,5)	
4	164,58	-		164,58	-	
5	111,33	7,04 (1H, d, J= 2,4)		111,33	7,03 (1H, dd, J= 2,4 ; 2,5)	
6	149,32	-		149,32	-	
7	161,45	-		161,45	-	
1''	202,38	-		202,38	-	
2''	41,34	2,87 (2H,m)		41,34	2,88 (2H,t, J=7,25)	
3''	25,79	1,61(10H, m)		25,79	1,68 (2H,m)	
4''	22,29	-		22,29	1,43 (4H,m)	
5''	13,30	0,94 (3H,t, J= 7,1)		13,30	0,95 (3H,m)	
1'	111,35	-		111,35	-	
2'	159,92	-		159,92	-	
3'	107,12	6,79 (1H,s)		107,12	6,79 (1H,s)	
4'	148,29	-		148,29	-	
5'	141,60	-		141,60	-	
6'	138,96	-		138,96	-	
7'	171,18	-		171,18	-	
1'''	27,79	3,27 (2H,m)		27,79	3,29 (2H, t, J=1,00)	
2'''	31,00	-		31,00	1,68 (2H,m)	
3'''	32,00	-		32,00	1,55 (2H,m)	
4'''	21,83	-		21,83	1,43 (4H,m)	
5'''	13,45	0,93 (3H,t, J= 7,2)		13,45	0,95 (3H,m)	
OCH ₃ -4	56,01	3,99 (3H,s)		56,01	3,99 (3H,s)	

Uji Aktivitas Antimikroba pada Ekstrak dan Isolat Senyawa. Hasil pengujian antimikroba pada fraksi *n*-heksana, etil asetat, aseton dan fraksi metanol dari *S. halei* Lamb menunjukkan aktivitas antimikroba yang besar pada bakteri uji terutama untuk bakteri *Staphylococcus aureus* (Tabel 3, Gambar 2(I)). Aktivitas antimikroba dikelompokkan menurut metode Davis Stout dimana diameter hambat ≥ 20 mm menunjukkan aktivitas sangat kuat, 10-20 mm kuat, 5-10 mm sedang dan ≤ 5 mm lemah⁽²²⁾.

Fraksi *n*-heksana *S. halei* Lamb menunjukkan aktivitas sedang dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* (5%) dan *Pseudomonas aeruginosa* (1,25%) dengan diameter hambat 6 mm serta aktivitas kuat pada bakteri *S.aureus* dengan diameter hambat 13,5 mm pada konsentrasi 5%.

Fraksi *n*-heksana *S. halei* Lamb tidak menunjukkan aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella thyphosa*, *S. thypimurium*, *Enterococcus faecalis* (Tabel 3).

Fraksi etil asetat *S. halei* Lamb aktif sebagai antimikroba karena memberikan daya hambat pada semua bakteri uji kecuali bakteri *E. faecalis*. Fraksi etil asetat *S. halei* Lamb memberikan aktivitas sedang dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. thyphosa*, *S. thypimurium* dan aktivitas sangat kuat dalam menghambat bakteri *S. aureus*. Diantara semua fraksi uji, fraksi etil asetat *S. halei* Lamb memberikan diameter hambat paling besar pada *S. aureus* dengan diameter hambat 24 mm (5%) (Tabel 3).

Tabel 3. Diameter hambat yang dihasilkan fraksi-fraksi ekstrak *S. halei* Lamb pada bakteri uji.

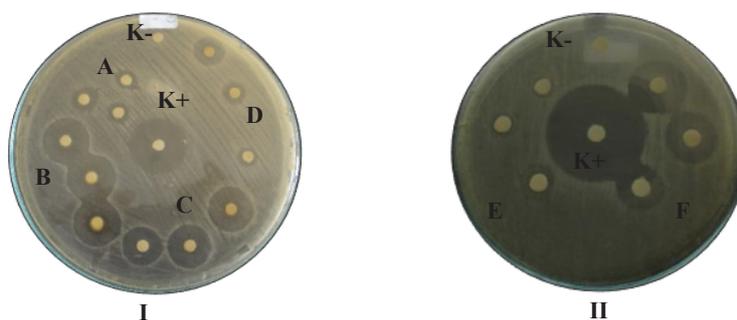
Bakteri uji	Diameter hambat (mm)												K (+)	K (-)
	Fraksi <i>n</i> -heksana (%)			Fraksi etil asetat (%)			Fraksi aseton (%)			Fraksi metanol (%)				
	1,25	2,5	5	1,25	2,5	5	1,25	2,5	5	1,25	2,5	5		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	6	6,3±0,5	6,3±0,5	7,3±0,3	7,3±1,1	6,7±1,1	7,6±0,5	7	6,7±0,5	11	35	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10	12±14	13,5±2	23,5±0,7	23,5±0,7	24	19,5±2	21±1,4	24±1,4	12±1,4	14±1,4	17,5±2	30	-
<i>S.thypimurium</i> ATCC 14028	-	-	-	6,7±0,5	6,7±0,5	7,7±0,5	-	-	-	-	-	-	30	-
<i>S. thyphosa</i> NCTC 786	-	-	-	6,3±0,5	6,3±0,5	6,3±0,5	-	-	-	-	-	-	25	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6	6	6	6,3±0,5	6,7±0,5	6,7±0,5	6	6,7±0,5	6,7±0,5	6	6	6,5±0,7	7	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	-

Keterangan: K(-) = DMSO, K(+) = kloramfenikol 30 µg/mL.

Tabel 4. Diameter hambatan atranorin dan asam lobarat pada bakteri uji.

Bakteri uji	Diameter hambatan (mm)						K(+)	K(-)
	Atranorin (%)			Asam lobarat (%)				
	0,0125	0,025	0,05	0,0125	0,025	0,05		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7	7	7	6	7	7	35	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7,5	8,5	10	14	17	20	30	-
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	6	6	7	6	6	6	30	-
<i>S. typhosa</i> NCTC 786	6	7	7	6	7	7,7±0,5	30	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	7	7	8	7	7	8±1	18	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	6	6	6	23	-

Keterangan: Kriteria diameter hambatan ≥ 20 mm: sangat kuat, 10-20 mm: kuat, 5-10 mm: sedang dan ≤ 5 mm: lemah.



Gambar 2. Diameter hambatan fraksi (I) dan isolat (II) *S. halei* Lamb. terhadap bakteri *S. aureus*. A = Fraksi *n*-heksana, B = fraksi etil asetat, C = fraksi aseton, D = fraksi metanol, E = isolat atranorin, F = isolat asam lobarat, K+ = kontrol positif (kloramfenikol 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), K- = kontrol negatif (DMSO).

Fraksi aseton dan metanol *S. halei* Lamb memberikan aktivitas sedang dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *P. aeruginosa*. Untuk bakteri *E. coli*, fraksi metanol *S. halei* Lamb memberikan diameter hambatan lebih besar dibanding fraksi *S. halei* Lamb lainnya yaitu 11 mm (5%) sedangkan fraksi *S. halei* Lamb lainnya hanya memberikan diameter hambatan sekitar 6 mm- 7 mm (5%). Fraksi aseton dan metanol *S. halei* Lamb memberikan daya hambatan yang hampir sama besar dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* yaitu 6,7 mm pada fraksi aseton (5%) dan 6,5 mm pada fraksi metanol (5%) (Tabel 3).

Semua fraksi dari *S. halei* Lamb aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, *E. coli* dan *P. aeruginosa* namun tidak ada satupun dari fraksi *S. halei* Lamb yang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. faecalis*. Dari hasil pengamatan uji aktivitas antimikroba juga menunjukkan fraksi etil asetat *S. halei* Lamb lebih aktif sebagai antimikroba, untuk itu dilakukan isolasi dan uji aktivitas isolat dari fraksi etil asetat *S. halei* Lamb.

Atranorin dan asam lobarat yang merupakan metabolit sekunder mayor dari fraksi etil asetat *S. halei* Lamb memberikan aktivitas antimikroba pada semua bakteri uji kecuali atranorin tidak menunjukkan aktivitas dalam menghambat pertumbuhan *E. faecalis* (Tabel 4). Pada ketiga konsentrasi uji, atranorin dan

asam lobarat menunjukkan aktivitas sedang dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, *S. typhosa*, *S. typhimurium* dan *P. aeruginosa*. Atranorin memberikan aktivitas kuat dalam menghambat *S. aureus* dengan diameter hambatan 10 mm (0,05%) sedangkan asam lobarat menunjukkan aktivitas sangat kuat dengan diameter hambatan 20 mm (0,05%) hampir menyamai kontrol positif dengan konsentrasi 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabel 4 dan Gambar 2(II)).

Uji Aktivitas Antituberkulosis pada Ekstrak dan Isolat *S. Halei* Lamb. Bakteri *M. tuberculosis* H37Rv mulai tumbuh pada minggu ke-2. Hasil pengujian aktivitas antituberkulosis pada fraksi etil asetat, aseton dan fraksi sisa dari *S. halei* Lamb menunjukkan aktivitas antituberkulosis yang besar pada bakteri uji dimana pada konsentrasi 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tidak ditumbuhi bakteri uji. Sedangkan pada konsentrasi 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ditumbuhi bakteri *M. tuberculosis* H37Rv, namun tidak sebanyak pada kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fraksi etil asetat, aseton dan metanol *S. halei* Lamb aktif sebagai antituberkulosis. Untuk fraksi *n*-heksana, pada semua konsentrasi ditumbuhi bakteri uji. Fraksi *n*-heksana *S. halei* Lamb kurang aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis* H37Rv (Tabel 5, Gambar 3).

Atranorin dan asam lobarat menunjukkan aktivitas anti TB pada konsentrasi 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ karena pada

Tabel 5. Pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis* H37Rv pada media yang mengandung ekstrak *S. halei* Lamb.

Sampel (konsentrasi)	Pengamatan minggu ke-							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Fraksi 1 400 µg/mL	-	1+	1+	1+	1+	2+	3+	3+
800 µg/mL	-	1+	1+	1+	1+	1+	3+	3+
1600 µg/mL	-	-	-	-	-	1+	1+	1+
Fraksi 2 400 µg/mL	-	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+
800 µg/mL	-	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+
1600 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
Fraksi 3 400 µg/mL	-	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+
800 µg/mL	-	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+
1600 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
Fraksi 4 400 µg/mL	-	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+
800 µg/mL	-	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+
1600 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrol negatif	-	1+	1+	1+	1+	2+	3+	3+
Isoniazid 0,2 µg/mL	-	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
Ethambutol 2 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
Rifampicin 40 µg/mL	-	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+

Keterangan:

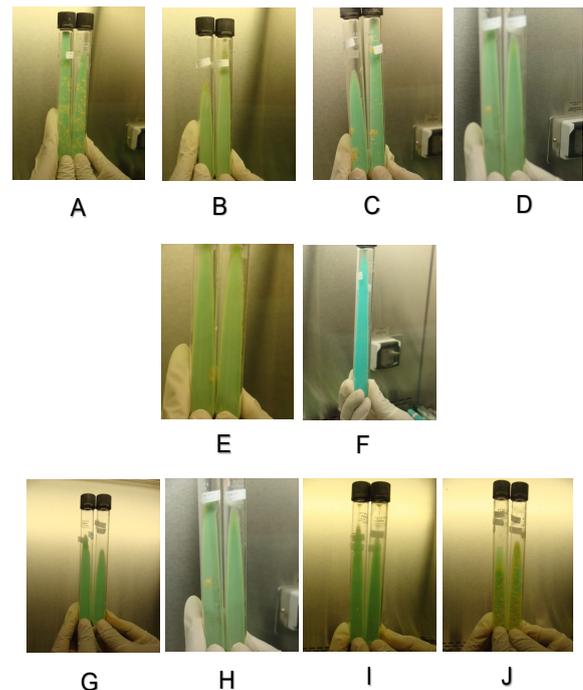
Fraksi 1 = fraksi n-heksana; fraksi 2 = fraksi etil asetat; fraksi 3 = fraksi aseton; fraksi 4 = fraksi metanol; kontrol negatif = DMSO; - = tidak ada koloni yang tumbuh; 1+ = jumlah koloni (1+): 20-100 koloni; (2+): 100-200 koloni; (3+): 200-500 koloni (hampir konfluen/ media tertutup oleh hampir seluruh koloni) dan (4+): >500 koloni (konfluen/media tertutup seluruhnya oleh koloni)⁽¹¹⁾.

Tabel 6. Pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis* H37Rv pada media yang mengandung isolat senyawa *S. halei* Lamb.

Sampel (konsentrasi)	Pengamatan minggu ke-							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Atranorin 1,25 µg/mL	-	1+	1+	1+	1+	1+	2+	2+
2,5 µg/mL	-	1+	1+	1+	1+	1+	2+	2+
5 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
Asam loyarat 1,25 µg/mL	-	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
2,5 µg/mL	-	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
5 µg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrol negatif	-	1+	1+	1+	1+	2+	3+	3+
Isoniazid (0,2 µg/mL)	-	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
Ethambutol(2 µg/ml)	-	-	-	-	-	-	-	-
Rifampicin(40 µg/ml)	-	1+	1+	1+	1+	2+	2+	2+

Keterangan:

Kontrol negatif = DMSO; - = tidak ada koloni yang tumbuh; 1+ = jumlah koloni (1+): 20-100 koloni; (2+): 100-200 koloni; (3+): 200-500 koloni (hampir konfluen/ media tertutup oleh hampir seluruh koloni) dan (4+): >500 koloni (konfluen/media tertutup seluruhnya oleh koloni)⁽¹¹⁾.



Gambar 3. Pertumbuhan koloni *M. tuberculosis* H37Rv pada ekstrak dan isolat *S. halei* Lamb. A= ekstrak n-heksana 1600 µg/mL; B= ekstrak etil asetat 1600 µg/mL; C= ekstrak aseton 1600 µg/mL; D= ekstrak metanol 1600 µg/mL; E= atranorin 5 µg/mL; F= asam loyarat 5 µg/mL; G= isoniazid 0,2 µg/mL; H= rifampicin 40 µg/mL; I= etambutol 2 µg/mL; J= kontrol negatif/ DMSO.

konsentrasi tersebut tidak ada pertumbuhan bakteri uji. Asam loyarat menunjukkan aktivitas antituberkulosis yang lebih besar dibandingkan atranorin yakni pada konsentrasi 1,25 dan 2,5 µg/mL atranorin menunjukkan hasil +2 sedangkan asam loyarat +1. Dari hasil pengamatan, kedua senyawa ini memberikan aktivitas yang lebih besar dalam menghambat bakteri *M. tuberculosis* H37Rv dibandingkan dengan isoniazid (0,2 µg/mL) dan rifampicin (40 µg/mL). Hal ini teramati pada pembandingan isoniazid dan rifampicin masih ditumbuhi bakteri *M. tuberculosis* H37Rv sedangkan pada atranorin dan asam loyarat tidak ditumbuhi bakteri uji (Tabel 6, Gambar 3).

SIMPULAN

Dari penelitian ini didapat 2 isolat yang berhasil diisolasi dari fraksi etil asetat *S. halei* Lamb. Dari 5,98 g endapan etil asetat didapatkan 4,6 g atranorin⁽¹⁾ dan dari ekstrak kental etil asetat (10 g) didapatkan asam loyarat⁽²⁾ sebanyak 1,18 g. Semua fraksi memberikan aktivitas antibakteri yang besar terutama pada *S. aureus* namun tidak aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. faecalis*. Ekstrak dari fraksi etil asetat, aseton dan metanol dari *S. halei* Lamb juga aktif sebagai antituberkulosis (1600 µg/mL). Namun fraksi n-heksana kurang aktif sebagai antituberkulosis.

Asam lobarat memiliki aktivitas antimikroba dan antituberkulosis yang lebih besar dibandingkan atranorin dimana atranorin memberikan aktivitas kuat dalam menghambat *S. aureus* (10 mm) sedangkan asam lobarat menunjukkan aktivitas sangat kuat (20 mm) pada konsentrasi 0,05%. Isolat atranorin dan asam lobarat memiliki aktivitas yang lebih besar dalam menghambat pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis* H37Rv pada konsentrasi 5 µg/mL dibandingkan dengan isoniazid (0,2 µg/mL) dan rifampicin (40 µg/mL).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan hibah penelitian Ristek Sinas 2015. Ucapan terima kasih kepada Dr. Harrie J.M. Sipman, BGBM Berlin yang telah mengidentifikasi Lichen, Dr. Ahmad Darmawan dan Sofa Fajriah M.Si, Pusat Penelitian Kimia LIPI, Serpong yang telah membantu pengukuran ¹H dan ¹³C RMI. Seterusnya Kepala lab. Mikrobiologi BPOM Padang dan Lab. Mikrobiologi Balai Pengobatan Penyakit Paru-Paru Lubuak Aluang dan Lab. Biota Sumatera, UPT Sumber daya Hayati Universitas Andalas.

DAFTAR PUSTAKA

- Rankovic B. Lichen secondary metabolites bioactive properties and pharmaceutical potential. New York: Springer; 2015.
- Huneck S, I Yoshimura. Identification of lichen substances. Verlag Berlin Heidelberg. New York: Springer; 1996.
- Ismed F, FLL Dévéhat, O Delalande, S Sinbandhit, A Bakhtiar and J Boustie. Lobarin from the Sumatran lichen (*Stereocaulon halei*). *Fitoterapia*. 2012. 83:1693–8.
- Lamb MA. Conspectus of lichen genus *Stereocaulon* (Schreb.) Hoffm. *J Hattori Bot Lab*. 1977. 43:191-335.
- Ingolfssdottir K, PJ Hylands and Y Solberg. Structure of vesuvianic acid from *Stereocaulon* species. *Phytochemistry*. 1985. 25(2):550-3.
- Gupta VK, M Darokar, D Saikia, A Pal, A Fatima, SPS Khanuja. Antimycobacterial activity of lichens. *Pharm Biol*. 2007. 45(3):200-4.
- Syahrini H. Tuberculosis paru resistensi ganda. Medan: USU Digitalis Library; 2008.
- Burhan E. Tuberculosis *multi drug resistance* (TB-MDR). *Majalah Kedokteran Indonesia*. 2010. 6(12).
- Sudta P, P Jiarawapi, A Suksamrarn, P Hongmanee and S Suksamrarn. Potent activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of α -mangostin analogs. *Chemi Pharm Bull*. 2013. 61(2):194-203.
- Grange JM and NJC Snell. Activity of bromohexine and ambroxol, semi synthetic development of vacisine from the Indian shrub *Adhatoda vasica* against *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. *J Ethnopharmacol*. 1996. 50:49-53.
- Kementerian Kesehatan RI. Petunjuk teknis pemeriksaan biakan, identifikasi, dan uji kepekaan *Mycobacterium tuberculosis* pada media padat. Jakarta: Direktorat Jenderal Bina Upaya Kesehatan dan Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan; 2012.
- Melo MGD, AA Araujo, CP Rocha, EM Almeida, RS Siqueira, L R Bonjardim, LJ Quintans. Purification, physicochemical properties, thermal analysis and antinociceptive effect of atranorin extracted from *Cladonia kalbii*. *Biol Pharm Bull*. 2008. 31:1977-80.
- Ingolfssdottir K, SR Gissurason, B Muller-Jakic, W Breu and H Wagner. Inhibitory effects of the lichen metabolite lobaric acid on arachidonate metabolism *in vitro*. *Phytomedicine*. 1996. 2(3):243-6.
- Hudson H. Fungal biology. England: Cambridge University; 1991.
- Kowalski M, G Hausner, MD Piercey. Bioactivity of secondary metabolites and thallus extracts from lichen fungi. *Mycoscience*. 2011. 52:413–8.
- Rankovic B, M Misic, S Sukdolak. The antimicrobial activity of substances derived from the lichen *Physciaaipolia*, *Umbilicariapolyphylla*, *Parmeliacapitata* and *Hypogymniaphysodes*. *World Journal Microbial Biological*. 2008. 24:1239-42.
- Proksa B, J Adamcova, M Sturdikova, J Fuska. Metabolites of *Pseudevernia furfuracea* and their inhibition potential of proteolytic enzymes. *Pharmazie*. 1994. 49:282-3.
- Tan J, RD Shytle, D Obregon, MM McGaw. Method of treatment using atranorin. Patent cooperation treaty. 2008. WO 2008/109521 A2.
- Bugni TS, CD Andjelic, AR Pole, P Rai, CM Ireland, LR Barrows. Biologically active components of a papus New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. *Fitoterapia*. 2009. 80:270-3.
- Yim JH, C Kim, DK Kim, SJ Han, *et al*. Pharmaceutical and food compositions for preventing or treating diabetes or obesity. United States Patent Application Publication. 2014. US 2014/0073614 A1.
- Morita H, T Tsuchiya, K Kishibe, S Noya, M Shiro and Y Hirasawa. Antimitotic activity of lobaric acid and a new benzofuran, sakisacaulon A from *Stereocaulon sasakii*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009. 19:3679-81.
- Harlina U, A Prajitno, E Suprayitno and H Nursyam. The identification of chemical compound and antibacterial activity test of kopasanda (*Chromolaena odorata* L.) leaf extract against vibriosis--causing *Vibrio harveyi* (MR 275 Rif) on tiger shrimp. *Aquatic Science and Technology*. 2013. 1(2):15-29.