

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS JAMUR ENDOFIT DAUN KOKANG (*LEPISHANTES AMOENA* (HAASK) LEENH) SEBAGAI ANTIBAKTERI

Putri Rahmatilah, Jaka Fadraersada, Adam M. Ramadhan*

Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Kefarmasian “Farmaka Tropis”,
Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda, Indonesia

*Email: adam@farmasi.unmul.ac.id

ABSTRAK

Tanaman Kokang (*Lepishantes amoena* (Haask) Leenh) merupakan tanaman khas Kalimantan Timur yang mulai langka keberadaannya, apabila tanaman kokang dieksploitasi besar-besaran untuk dijadikan sebagai simplisia untuk diekstraksi maka akan menyebabkan kepunahan, sehingga diperlukan isolasi jamur endofit dari daun kokang untuk mencegah kepunahan tersebut. Jamur endofit dapat memproduksi metabolit sekunder yang serupa dengan tanaman inangnya dan umumnya memiliki aktivitas biologis. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengetahui karakteristik jamur endofit dari daun kokang, mengetahui golongan metabolit sekunder jamur endofit dan mengetahui aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Propionibacterium acne* dan *Eschericia coli*. Metode untuk identifikasi golongan metabolit sekunder dilakukan dengan analisis KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode KLT-Bioautografi. Hasil penelitian ini yaitu diperoleh 3 isolat jamur endofit yang memproduksi metabolit sekunder flavonoid dan steroid yang berfungsi sebagai antibakteri.

Kata Kunci: KLT-Bioautografi, metabolit sekunder, *Propionibacterium acne*, *Eschericia coli*.

DOI: <https://doi.org/10.25026/mpc.v6i1.260>

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki sumber kekayaan alam hayati yang beranekaragam. Tanaman tidak hanya digunakan sebagai penghias yang memiliki nilai estetika dan nilai jual, namun banyak dari tanaman tersebut memiliki khasiat sebagai obat namun belum diteliti lebih jauh. Tanaman kokang (*Lepishantes amoena* (Haask) Leenh) merupakan tanaman yang bagian daunnya digunakan oleh suku Dayak Tunjung untuk mengobati bisul dan digunakan untuk perawatan kulit (*skin care*) dengan

cara mengambil pucuk daunnya, lalu dipilin hingga berbusa kemudian dijadikan sebagai pencuci muka dan buahnya dapat pula dikonsumsi (Pramana dkk, 2013). Oleh masyarakat suku Kutai daun kokang digunakan sebagai pengganti sabun mandi karena daun kokang mengeluarkan busa seperti sabun (Hidayah, 2015).

Eka (2011) melaporkan bahwa ekstrak fraksi *n*-butanol daun kokang berpotensi sebagai antimikroba terhadap beberapa jenis bakteri patogen seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*

thyposa dan *Staphylococcus aureus*. Hasil penelitian Kuspradini (2012) menyatakan bahwa daun kokang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acne* pada konsentrasi 30 mg/mL. Hidayah (2015) menyebutkan bahwa ekstrak etanol daun kokang dapat menyembuhkan luka karena daun kokang mengandung metabolit-metabolit sekunder seperti fenolik, flavonoid, tannin, steroid dan saponin yang berfungsi sebagai antioksidan dan antibakteri yang berperan dalam penyembuhan luka.

Metode pencarian senyawa aktif yang akhir-akhir ini banyak dikembangkan adalah jamur endofit. Jamur endofit merupakan mikroorganisme yang hidup didalam sistem jaringan tumbuhan seperti biji, daun, bunga, ranting, batang, dan akar dengan membentuk koloni tanpa membahayakan inangnya. Keunggulan jamur endofit yaitu mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti yang dihasilkan oleh inangnya dan keunggulan lain dari jamur endofit adalah siklus hidup jamur endofit singkat dan senyawa-senyawa yang dihasilkan dapat diproduksi dalam skala besar melalui proses fermentasi sehingga tidak perlu mengisolasi secara langsung dari jaringan tumbuhan yang memerlukan jumlah sangat besar sehingga jamur endofit merupakan cara yang tepat untuk penemuan senyawa aktif untuk tanaman yang memiliki siklus hidup yang relatif lama dan untuk tanaman yang semakin langka.

Jamur endofit merupakan metode yang tepat digunakan dalam pencarian senyawa aktif pada daun kokang karena ketersediaan tanaman kokang yang semakin langka. Isolat jamur endofit daun kokang diduga memiliki senyawa metabolit sekunder yang sama dengan inangnya yaitu senyawa fenolik, flavonoid, tanin, steroid dan saponin (Rijai, 2008).

METODE PENELITIAN

Isolasi Jamur Endofit

Jamur endofit yang akan diisolasi yaitu terdapat dalam jaringan daun tanaman kokang (*Lepishantes amoena* (Haask) Leenh). Pengujian dilakukan dengan membersihkan permukaan daun terlebih dahulu dengan menggunakan air mengalir. Selanjutnya dilakukan proses sterilisasi permukaan daun dengan merendam daun dalam alkohol 70% selama 5 menit, NaOCl 1% selama 5 menit, dan dilanjutkan dengan perendaman kembali menggunakan alkohol 70% selama 30 detik. Setelah itu daun dikeringkan dan dipotong. Diletakkan daun yang telah dipotong pada cawan petri berisi 10 mL medium *Potato Dextrose Agar Chloramphenicol* (PDAC) dan *Yeast Extract Agar Chloramphenicol* (YEAC). Kemudian diinkubasi selama 7 – 14 hari pada suhu ruang (25°C). Koloni jamur dimurnikan berdasarkan warna dan bentuk pertumbuhan koloni dan diinokulasi ke dalam medium yang baru hingga didapatkan isolat jamur endofit yang murni.

Karakterisasi Isolat Jamur Endofit

Karakterisasi isolat jamur endofit dilakukan secara makroskopis yaitu mengamati secara langsung dengan melihat bentuk dan warna koloni jamur endofit.

Pembenihan Isolat Jamur Endofit

Isolat jamur endofit daun kokang yang diperoleh selanjutnya diinokulasikan ke dalam 200 mL medium PDB dan YEB dalam Erlenmeyer dan diinkubasi dalam *rotary shaker* selama 14 hari pada suhu ruang (25°C) dengan kecepatan 120 rpm.

Hasil inkubasi kemudian disaring dengan kertas saring. Medium dan miselium dimaserasi dengan etil asetat (EtOAc) hingga miselium tidak berwarna sambil diaduk dengan pengaduk magnetik selama 1 jam untuk setiap ekstraksi. Ekstrak EtOAc disaring lalu dipisahkan

dengan corong pisah. Ditampung lapisan atas dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu air bak 30°C. Ekstrak digunakan untuk identifikasi golongan metabolit sekunder dan pengujian aktivitas antibakteri.

Identifikasi Golongan Metabolit Sekunder Isolat Jamur Endofit

Identifikasi golongan metabolit sekunder isolat jamur endofit daun kukang dilakukan menggunakan metode KLT dengan pereaksi semprot untuk masing-masing golongan metabolit sekunder yang akan diidentifikasi.

Dimasukkan eluen n-heksan : Etil Asetat (7:3) ke dalam *chamber* yang kemudian dijenuhkan. Selanjutnya dimasukkan plat kromatogram yang telah ditotol ekstrak isolat jamur endofit ke dalam *chamber*, plat diangkat apabila eluen mencapai batas atas plat, kemudian dikering-anginkan. Pengamatan dilakukan dengan menyinari plat kromatogram dengan lampu UV 254 nm dan 366 nm yang akan memberikan hasil berupa profil bercak noda yang berpendar, yang kemudian dipertegas dengan pereaksi semprot untuk masing-masing golongan metabolit sekunder yang diidentifikasi.

a. Senyawa Flavonoid

Identifikasi senyawa flavonoid menggunakan pereaksi semprot berupa sitroborat. Uji positif adanya golongan senyawa flavonoid ditunjukkan dengan adanya bercak noda berwarna hijau kekuningan setelah diamati pada UV 366 nm, setelah ditambah pereaksi semprot sitroborat akan terbentuk warna kuning.

b. Senyawa Steroid

Identifikasi senyawa steroid menggunakan pereaksi semprot berupa *Lieberman-Burchard*. Uji positif adanya golongan senyawa triterpenoid ditunjukkan dengan adanya bercak noda berwarna hijau sampai biru setelah diamati pada UV 366 nm.

c. Senyawa Tanin

Identifikasi senyawa tanin menggunakan pereaksi semprot berupa FeCl_3 0,1%. Uji positif adanya golongan tanin ditunjukkan dengan adanya bercak noda berwarna hijau kecoklatan atau biru kehitaman.

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri metabolit sekunder jamur endofit daun kukang dilakukan dengan menggunakan metode KLT-Bioautografi. Ditotolkan isolat jamur endofit pada plat kromatogram dan dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi eluen terbaik yang telah dijenuhkan sebelumnya. Dielusi noda hasil totolan sampai batas atas plat kromatogram. Lalu diangkat dan dikering-anginkan.

Cawan petri diisi 10 mL medium yang telah diinokulasi suspensi bakteri uji dan dibiarkan hingga agak memadat. Kemudian diletakkan plat kromatogram di atas permukaan medium dan didiamkan selama 60 menit. Setelah itu, plat kromatogram diangkat dan diinkubasi cawan petri pada suhu 37°C selama 24 jam. Diamati zona hambat di area bercak noda hasil totolan.

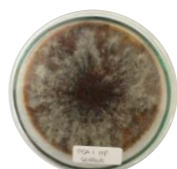
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi jamur endofit dari daun kokang setelah dilakukan pemurnian diperoleh 3 isolat yang berbeda-beda yaitu DK1, DK2 dan DK3. Isolat yang ditemukan belum dapat diidentifikasi jenisnya karena belum adanya data karakteristik mikroskopis yang dapat membantu memastikan jenis dari isolat yang didapat.

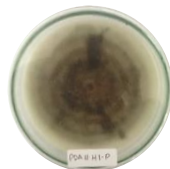
Isolat yang telah melewati proses karakterisasi kemudian dilakukan proses perbanyakan dengan memindahkan isolat kedalam medium cair dan diinkubasi dalam *rotary shaker* selama 14 hari.

Tabel 1. Karakteristik makroskopis isolat jamur endofit daun kokang

Kode Isolat	Warna Koloni	Serbuk Spora	Tepi Koloni	Elevasi	Warna Sebalik
DK1	cokelat	putih	tidak rata	timbul	cokelat
DK2	hijau	hijau	tidak rata	timbul	hijau
DK3	putih	putih	Rata	timbul	biru



a. DK1



b. DK2



c. DK3

Gambar 1. Isolat jamur endofit daun kokang

Tabel 2. Identifikasi Metabolit Sekunder

Metabolit Sekunder	EI DK1	EM DK1	EI DK2	EM DK2	EI DK3	EM DK3
Flavonoid	-	+	-	+	-	+
Steroid	+	+	+	+	+	+
Tanin	-	-	-	-	-	-
Ket:	EI = Ekstrak isolat		EM = Ekstrak medium			

Tabel 3. Identifikasi Metabolit Sekunder

Kode Isolat	Bakteri Uji	
	<i>Propionibacterium acne</i>	<i>Escherichia coli</i>
EI DK1	+	+
EM DK1	+	+
EI DK2	+	+
EM DK2	+	+
EI DK3	+	+
EM DK3	+	+

Ket : + = terdapat zona hambat

Uji metabolit sekunder yang pertama yaitu flavonoid. Uji positif adanya golongan senyawa flavonoid ditunjukkan dengan adanya bercak noda berwarna hijau kekuningan pada plat kromatogram setelah diamati pada UV 366 nm.

Uji metabolit sekunder yang kedua yaitu steroid. Uji positif adanya golongan senyawa triterpenoid ditunjukkan dengan adanya bercak noda berwarna hijau

sampai biru pada plat kromatogram setelah diamati pada UV 366 nm.

Uji metabolit sekunder yang ketiga yaitu tanin. Uji positif adanya golongan tanin ditunjukkan dengan adanya bercak noda berwarna hijau kecoklatan atau biru kehitaman. Namun pada pengujian ini, tidak ditemukan hasil positif adanya senyawa tanin karena warna yang terbentuk setelah penyempotan dengan pereaksi FeCl_3 adalah warna coklat.

Pengujian aktivitas antibakteri metabolit sekunder jamur endofit daun kokang dilakukan dengan menggunakan metode KLT-Bioautografi. Terlihat zona hambat disekitar totolan yang menunjukkan bahwa bercak noda tersebut memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap *Propionibacterium acne* dan *Escherichia coli* diduga karena ekstrak isolat jamur endofit daun kokang memiliki senyawa flavonoid dan steroid yang dapat beraktivitas sebagai antibakteri.

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antimikroba adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Ngajow, 2013).

Menurut Putra (2007), mekanisme kerja steroid dalam menghambat pertumbuhan mikroba yaitu dengan merusak membran plasma sel mikroba, sehingga menyebabkan bocornya sitoplasma keluar sel yang selanjutnya menyebabkan kematian sel. Diduga hal tersebut disebabkan karena steroid memiliki gugus nonpolar (hidrofobik) dan polar (hidrofilik) sehingga memiliki efek surfaktan yang dapat melarutkan komponen fosfolipid pada membran plasma mikroba.

Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Nuria, 2009). Menurut Sari (2011), tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati.

KESIMPULAN

1. Diperoleh 3 isolat jamur endofit daun kokang yaitu DK1, DK2 dan DK3 dengan karakteristik makroskopis yang berbeda-beda.

2. Metabolit sekunder yang terdapat pada isolat jamur endofit daun kokang yaitu flavonoid dan steroid.
3. Semua isolat jamur endofit daun kokang memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap *Propionibacterium acne* dan *Escherichia coli*

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini, Fauzi Darma. 2012. Isolasi dan Uji Antimikroba Metabolit Sekunder Ekstrak Kultur Jamur Endofit AFKR-5 dari Tumbuhan Akar Kuning (*Arcangelisia flava* (L) Merr).
- Eka, S. 2011. *Potensi Ekstrak Fraksi n-Butanol Daun Kokang sebagai Antibakteri*. Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman. Samarinda.
- Hidayah, H., Rusli, R., Herman, H., & Masruhim, M. 2015. Potensi Ekstrak Daun Kokang (*Lepisanthes amoena* (Haask) Leenh) Sebagai Obat Luka. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 1 (3), 96-98.
- Kuspradini, H. Ritmaleni., Dwi Susanto., and Tohr Mitsunaga 2012. *Phytochemical and comparative Study of Antimicrobial Activity of Lepishantes amoena leaves Extract*. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. Vol 2.
- Ngajow, M. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* secara In Vitro. *Jurnal MIPA Unstrat*. Vol 2.
- Nuria, M.C., A. Faizatun., dan Sumantri. 2009. Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella*

- typhi* ATCC 1408. Jurnal Ilmu Pertanian.
- Pramana, M. Riza, A dan Chairul, S. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid pada Fraksi n-heksana dari Daun Kukang (*Lepishantes amoena* (Haask) Leenh). Jurnal Kimia Mulawarman. Vol 10. No 2.
- Putra, I.N.K. 2007. *Study Daya Antimikroba Ekstrak Beberapa Bahan Tumbuhan Pengawet Nira Terhadap Mikroba Perusak Nira Serta Kandungan Senyawa Aktifnya*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal Vol. II. *Majalah Ilmu Kefarmasian* No. 3. FMIPA Universitas Indonesia. Jakarta.
- Rijai, L. 2008. *Penelusuran dan Bioaktivitas Tumbuhan Obat di Kabupaten Kutai Barat*. Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman. Samarinda.
- Sari, F.P dan S. M. Sari. 2011. *Ekstraksi Zat Aktif Antimikroba dari Tanaman Yodium (*Jatropha multifida* Linn) sebagai Bahan Baku ALternatif Antibiotik Alami*. Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Semarang.