

Deteksi Senyawa Antimikrob yang Diisolasi dari Beberapa *Lentinus* Tropis dengan Metode Bioautografi

Detection of Antimicrobial Compounds Isolated from Several Tropical Lentinus by Bioautographic Method

LISDAR I. SUDIRMAN^{1,2}

¹Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

²Pusat Studi Ilmu Hayati, Institut Pertanian Bogor, Jalan Kamper, Darmaga, Bogor 16680

Tel. +62-251-421370, Fax. +62-251-621459, E-mail: lsd@indo.net.id

Diterima 23 Agustus 2004/Disetujui 27 April 2005

The antimicrobial compounds extracted either from culture filtrates or mycelia of several tropical *Lentinus* species could be detected their existences and locations by bioautographic method. For this purpose, the crude extracts were deposited as spots on silica gel plates and developed in a *n*-butanol-acetic acid-water mixture (3:1:1). The dry silica gel plates were then seeded with *Bacillus subtilis* and incubated at 35 °C for one night. On these plates, the extracts were separated into several bioautographic spots or growth inhibition zones. In parallel, the spots were detected by viewing with chemical revelations or under ultraviolet radiations at 254 nm or 366 nm. On silica gel thin-layer chromatograms, the crude extracts of *Lentinus* were separated into several bioautographic spots; for the filtrate extracts of *L. squarrosulus* 55A into three spots (R_f s 0.75, 0.50, 0.17), the mycelial extracts of *L. sajor-caju* LSC8 into two spots (R_f s 0.77, 0.54), the mycelial extract of *L. torulosus* LU3 into two spots (R_f s 0.77, 0.48), the filtrate extracts of *L. cladopus* LC6 into one spot (R_f 0.76) but the mycelial extracts of this mushroom separated into two spots (R_f s 0.79, 0.54), the filtrate and mycelial extracts of *L. cladopus* LC4 into three spots respectively (R_f s 0.75, 0.61, 0.45 for the filtrate extract and R_f s 0.83, 0.73, 0.60 for mycelial extract). By this method, the active compounds were detected directly and it is a usual method for further work on the purification of the target compounds.

PENDAHULUAN

Lentinus yang dikelompokkan dalam famili Lentinaceae, ordo Polyporales, kelas Basidiomycetes ditemukan tumbuh di seluruh dunia, kecuali di Antartika. Tubuh buahnya yang makroskopis kebanyakan bersifat *xeromorphic* dengan tekstur liat dan kokoh serta tahan lama (Pegler 1983). Banyak jenis *Lentinus* yang dapat dimakan di antaranya *L. sajor-caju* dan *L. squarrosulus*. Jenis lain yang dapat dimakan dan dapat ditemukan di Indonesia antara lain *L. tuberregium* (Delmas 1989) dan *L. badius* yang dikonsumsi oleh masyarakat Papua Barat (Sudirman 2000).

Lentinus ternyata berpotensi menghasilkan berbagai macam metabolit yang dapat dimanfaatkan untuk kepentingan kesehatan dan industri. Beberapa jenis *Lentinus* telah diteliti sebelumnya, di antaranya ialah *L. squarrosulus* yang berasal dari daerah Afrika tropis dan jenis lain yang berasal dari daerah subtropis yaitu *L. trabeum*, *L. lepideus*, *L. adhaerens*, dan *L. degener*. Potensi *Lentinus* sebagai antagonis dilaporkan oleh Sudirman *et al.* (1992, 1994) yang melaporkan bahwa *L. squarrosulus* menghasilkan dua senyawa antibiotik yang diisolasi dari filtrat kulturnya. Salah satu dari senyawa tersebut ialah senyawa Ls2 yang dapat menghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis*, *Mucor ramannianus*, khamir, dan *Rigidoporus lignosus*. Senyawa antibiotik dihasilkan juga dari *L. crinitus* (Abraham & Abate 1995), *L. degener* (Anchel *et*

al. 1948), dan *L. adhaerens* (Lauer *et al.* 1991), sedangkan *L. lepideus* menghasilkan senyawa pewangi (*fragrance compounds*) seskuiterpena dari kultur cairnya (Gross & Asther 1989), metabolit sekunder *p*-metoksifenilpropanol (Ohta *et al.* 1990) dan senyawa antitumor (Espenshade & Griffith 1966).

Ekstrak bahan hayati umumnya mengandung berbagai macam komponen, baik komponen aktif maupun yang tidak aktif (senyawa pengotor). Salah satu metode untuk memisahkan komponen-komponen itu dapat dilakukan dengan metode kromatografi. Senyawa-senyawa yang terpisah atau bercak pada kromatogram biasanya dideteksi dengan pereaksi pembentuk warna atau diberi sinar ultraviolet. Kedua metode terakhir ini tidak dapat memberi informasi langsung tentang bercak aktif di antara bercak-bercak yang ada pada kromatogram. Akan tetapi melalui metode bioautografi yang merupakan gabungan metode kimia (kromatografi) dan mikrobiologi, dapat dihasilkan zona hambatan pertumbuhan pada senyawa-senyawa yang terpisah pada kromatogram karena di atasnya diberi media agar yang mengandung mikroba uji. Jadi senyawa aktif yang tepat dapat dipilih langsung untuk tujuan uji lanjut dan purifikasi, tanpa melalui pengujian aktivitas setiap bercak yang ada pada kromatogram. Walaupun metode ini merupakan metode lama tetapi masih tetap dipakai dengan sedikit modifikasi (Moreira *et al.* 2003; Pereira *et al.* 2003; Lopes *et al.* 2004).

Tujuan penelitian ini ialah mendeteksi pada tahap awal senyawa antimikrob yang dihasilkan oleh *Lentinus tropis* yaitu *L. squarrosulus* 55A, *L. sajor-caju* LSC8, *L. torulosus* LU3, *L. cladopus* LC4, dan *L. cladopus* LC6 dengan metode bioautografi. Melalui metode ini dapat diketahui langsung aktivitas dan jumlah minimum senyawa antimikrob yang terkandung di dalam ekstrak. Juga dapat diketahui langsung lokasi senyawa antimikrob yang ditentukan berdasarkan nilai R_f pada kromatogram yang sebelumnya dikembangkan pada sistem pelarut (Betina 1964). Rosner dan Aviv (1980) menemukan bahwa metode bioautografi lebih sensitif dibandingkan metode cakram kertas pada media agar-agar di cawan Petri yang biasa dipakai pada uji aktivitas. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Jassbi *et al.* (2002) yang menguji senyawa sklareol terhadap *B. subtilis* dengan metode bioautografi dan metode difusi cakram kertas. Pada metode yang pertama dihasilkan zona hambatan pertumbuhan sedangkan pada metode yang ke dua tidak dihasilkan zona hambatan pertumbuhan sama sekali. Di samping itu metode ini juga sangat membantu menemukan senyawa antibiotik baru yang belum dimurnikan (Betina 1973) seperti yang akan dilakukan terhadap senyawa antimikrob dari *Lentinus tropis*.

BAHAN DAN METODE

Sumber Isolat. Isolat *Lentinus cladopus* LC4 dan *L. cladopus* LC6 merupakan isolat hasil fusi antara hifa monokariotik dari dua spora tunggal yang diperoleh dari tubuh buah yang dibudidayakan pada substrat serbuk gergajian kayu. *Lentinus sajor-caju* LSC8 dan *L. torulosus* LU3 merupakan isolat yang berasal dari kultur jaringan tubuh buah jamur. Semua isolat di atas berasal dari Jawa Barat dan merupakan hasil isolasi dan koleksi Dr. Lisdar I. Sudirman, Pusat Studi Ilmu Hayati, IPB pada tahun 1994. *Lentinus squarrosulus* 55A berasal dari Cameroun, Afrika, koleksi Dr. Brunck dari Technical Center of Tropical Forestry, Abidjan, Pantai Gading, Afrika. Isolat terakhir ini diteliti lebih lanjut di Laboratorium Physiologie Vegetale et Forestiere, Nancy, Prancis. *B. subtilis* merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Industri, ENSAIA, Nancy, Prancis.

Produksi Filtrat Kultur. Filtrat kultur diperoleh dari kultur cair *L. cladopus* LC6 dan *L. cladopus* LC4 yang ditumbuhkan dalam kondisi fermentasi sebagai berikut: Satu potong inokulum berdiameter masing-masing 7 mm diinokulasikan pada permukaan media 100 ml ekstrak malt pepton (EMP: Ekstrak malt 15 g, pepton bakteriologi 5 g, glukosa 20 g, dan air destilata 1 l) dalam gelas Erlenmeyer 250 ml. Kultur ini diinkubasikan pada suhu 35 °C dalam keadaan statik selama 30 hari. Kultur dibuat 10 ulangan. Filtrat kultur *L. squarrosulus* 55A diperoleh dengan cara yang sama tetapi dari satu liter media ekstrak malt 1.5% dalam gelas Erlenmeyer 3000 ml yang diinokulasi dengan sepuluh potong inokulum berdiameter 7 mm, diinkubasi pada suhu 30 °C dalam keadaan statik selama 21 hari. Filtrat kultur dari setiap ulangan diekstraksi dan ekstrak kasarnya merupakan stok untuk uji lebih lanjut.

Produksi Miselium. Miselium diperoleh dari kultur cair *L. sajor-caju* LSC8, *L. torulosus* LU3, *L. cladopus* LC6 dan *L. cladopus* LC4 yang ditumbuhkan dalam kondisi fermentasi

yang sama seperti di atas. Miselium dari setiap ulangan diekstraksi dan ekstrak kasarnya merupakan stok untuk uji lebih lanjut.

Ekstraksi Filtrat Kultur. Ekstrak filtrat kultur *L. squarrosulus* 55A diperoleh dengan cara memisahkan filtrat terlebih dahulu dari miselium dengan kertas saring, kemudian filtrat diekstraksi dua kali dengan *n*-butanol (1:1 v/v). Ekstrak butanol dikeringkan dengan alat evaporator putar, dalam kondisi vakum, pada suhu bak 40 °C, kemudian dilarutkan dengan metanol hingga larut sempurna.

Ekstrak filtrat kultur *L. cladopus* LC6 dan *L. cladopus* LC4 diperoleh dengan cara filtrat langsung dievaporasi hingga kering dengan alat evaporator putar, dalam kondisi vakum, pada suhu bak 30 °C, kemudian dilarutkan dengan metanol hingga larut.

Ekstraksi Miselium. Miselium yang berasal dari masing-masing kultur di atas dipisahkan dari filtrat kultur dengan kertas saring. Kemudian miselium dihancurkan dengan bantuan mortar dan diekstraksi sebanyak dua kali dengan masing-masing 50 ml metanol dan dikocok dengan *shaker* selama satu malam untuk setiap kali ekstraksi. Ekstrak dalam metanol dipisahkan dari fragmen miselium dengan *fritted glass filter* nomor 3 dengan bantuan pompa vakum. Kemudian ekstrak metanol dikeringkan dengan evaporator putar, dalam kondisi vakum, pada suhu air bak 30 °C. Ekstrak kering kemudian dilarutkan kembali dengan metanol hingga larut.

Kromatografi Lapis Tipis Analitik. Adsorben yang digunakan ialah gel silika, Kieselgel 60 F 254 (MERCK). Kromatografi dilakukan menurut Wallhausser (1969) sebagai berikut: Ekstrak metanol, baik dari filtrat kultur maupun dari miselium, diteteskan secukupnya pada titik awal di lempengan atau lapisan tipis gel silika berukuran 5 x 20 cm atau 10 x 20 cm. Kromatografi ini dibuat pada empat buah lempengan dengan masing-masing terdiri atas satu atau dua tempat penetesan di titik awal, bergantung pada ukuran lempengan.

Bejana pengembang diisi dengan campuran pelarut *n*-butanol, asam asetat dan air dengan nisbah 3:1:1 (v/v/v) (Ikekawa *et al.* 1963) dan dibiarkan selama dua jam sampai lingkungan dalam bejana menjadi jenuh. Lempengan dimasukkan ke dalam bejana dan dibiarkan selama lebih kurang tiga jam, sampai batas pelarut atau garis depan mencapai bagian ujung lempengan. Batas pelarut ditandai dengan pensil segera setelah lempengan dikeluarkan dari bejana. Sisa pelarut pada lempengan diuapkan dengan membiarkannya dua atau tiga hari pada suhu kamar.

Deteksi Senyawa Aktif dengan Bioautografi. Metode bioautografi dilakukan sesuai dengan metode yang dilakukan oleh Sudirman (1992). Lempengan kromatogram di atas yang tidak berbau pelarut lagi diletakkan di atas penyangga di dalam kotak inkubasi yang dilapisi kertas lembap steril (Gambar 1). Untuk mengurangi kontaminan, lempengan disinari dengan sinar ultraviolet sekitar satu jam. Kemudian kromatogram dilapisi dengan sekitar 15 ml media TGY (Tryptone 5 g, ekstrak khamir 5 g, glukosa 1 g, K_2HPO_4 1 g, agar-agar 7.5 g, air destilata 1 l) yang telah mengandung bakteri *B. subtilis* sekitar $1-3 \times 10^5$ per ml. Sebelum diinkubasi pada suhu 35 °C selama 24 jam, kromatogram terlebih dahulu diinkubasi pada suhu sekitar 10 °C selama 3-4 jam supaya senyawa aktif dapat berdifusi ke dalam

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/9902169>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/9902169>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)