

Identifikasi Metabolit Sekunder Sekresi Jamur Lokal Tanah Gambut Riau *Penicillium* sp. LBKURCC34 Sebagai Antimikroba

Yuana Nurulita, Yuharmen, Annisa Fitri, Iin Evita Sari, Dian Novita Sary, Titania Tjandrawati Nugroho

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Pekanbaru, Indonesia 28293

*Penulis korespondensi: ynurulita@lecturer.unri.ac.id; ynurulita@unri.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v10.n3.45994>

Abstrak: *Penicillium* sp. LBKURCC34 adalah jamur yang diisolasi dari tanah gambut hutan primer di Giam Siak Kecil Bukit Batu (GSKBB), Cagar Biosfer di Provinsi Riau. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengeksplorasi potensinya sebagai penghasil antimikroba. Metode dilakukan melalui produksi metabolit sekunder dalam media cair, ekstraksi dalam larutan etil asetat, dan pemisahan ekstrak kasar dengan Kromatografi Kolom (CC). Ekstrak kasar dan fraksi diidentifikasi dengan KLT dan HPLC dan diuji aktivitas antimikrobanya dengan metode difusi cakram. Untuk mengidentifikasi senyawa aktif dilakukan uji fitokimia dan metode KLT-Bioautografi. Produksi tiga liter media menghasilkan 0,4 gram (0,0133% b/v) ekstrak etil asetat yang diidentifikasi sebagai terpenoid dan fenolat; dan mengandung senyawa semipolar berdasarkan uji KLT dan HPLC. Hasil KLT setelah disemprot dengan *p*-anisaldehida 0,5% menunjukkan adanya senyawa peptaibol (peptida). Ekstrak etil asetat dapat menghambat pertumbuhan kelima mikroba patogen yang diuji namun hanya 11-45% dibandingkan dengan kontrol positif. Uji bioautografi terhadap *Escherichia coli* menunjukkan noda aktif zona bening pada Rf sebesar 0,67. Sayangnya, dari Fraksi 1-5 yang terdapat noda dengan Rf 0,67 masih belum menunjukkan aktivitas berarti. Penyelidikan lebih lanjut diperlukan untuk mengidentifikasi struktur senyawa aktif dari isolat lokal ini.

Kata kunci: *Penicillium* sp. LBKURCC34, Antimikroba, Giam Siak Kecil – Bukit Batu (GSKBB)

Abstract: *Penicillium* sp. LBKURCC34 is a fungus isolated from peat soil of primary forest at Giam Siak Kecil Bukit Batu (GSKBB), Biosphere Reserve in Riau Province. The purpose of this study is to explore its potency as antimicrobial producer. Secondary metabolites production in liquid media, extraction in ethyl acetate solution, and separation the crude extract by Column Chromatography (CC) were applied. The crude extract and fraction were assessed by TLC and HPLC as well as checked the antimicrobial activity by the disc diffusion method. The active compound was assessed by phytochemicals test and TLC-Bioautography method. Production of three liters of media yielded 0.4 grams (0.0133% w/v) of ethyl acetate extract which were identified as terpenoids and phenolics; and contained semipolar compounds based on TLC and HPLC tests. Results of TLC after spraying with 0.5% *p*-anisaldehyde showed the presence of peptaibol compounds. The extract could inhibit the growth of the five pathogenic microbes tested but only 11-45% compared to the positive control. Bioautography test towards *Escherichia coli* showed the Rf active spot was 0.67. Unfortunately, from Fraction 1-5 that contained spot with Rf 0.67 still showed no activity. More investigation is required to identify the active the structure of the compounds from this local isolates.

Keywords: *Penicillium* sp. LBKURCC34, Antimicrobial activity, Giam Siak Kecil – Bukit Batu (GSKBB)

PENDAHULUAN

Luasnya lahan gambut tropis Indonesia membuka peluang untuk eksplorasi mikroorganisme yang penting untuk kemaslahatan manusia. Selain bidang pertanian (Tate 2020; Joshi *et al.* 2019) dan industri seperti bir (Bianco *et al.* 2020), makanan (Pessôa *et al.* 2019), biodiesel (Patel *et al.* 2020), mikroorganisme juga memiliki peran di bidang kesehatan dan farmasi khususnya sumber antibiotik

(Toghueo & Boyom 2020; Pessôa *et al.* 2019). Ong *et al.* (2016) dan Aw *et al.* (2016) mengisolasi bakteri-bakteri dari tanah gambut Malaysia yang memiliki aktivitas antimikroba. Mikroorganisme dalam genus *Penicillium* juga dipelajari sebagai penghasil senyawa bioaktif alami yang potensial. *Penicillium* sp. CAM 64 ditemukan berpotensi sebagai antikanker sel HeLa dengan nilai LC₅₀ = 0,88 – 9,21 µg/mL (Pan *et al.* 2017). Isopenicillin dari

meroterpenoid baru yang memiliki dua jenis terpenoid poliketida diisolasi dari biakan *Penicillium* sp. sh18 yang memiliki aktivitas kuat menghambat jalur pensinyalan Wnt/ β -catenin (Tang *et al.* 2019). Selain itu, Bai *et al.* (2019) dan Bai *et al.* (2021) melaporkan senyawa bioaktif meroterpenoids dan isocoumarin dan juga austin meroterpenoid dari jamur mangrove *Penicillium* sp. TGM112 memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan larva *Helicoverpa armigera* Hubner dengan IC_{50} nilai masing-masing berkisar antara 50 hingga 200 $\mu\text{g/mL}$. Lebih lanjut, senyawa furan asam karboksilat dari jamur *Penicillium* sp. sb62 memiliki aktivitas penghambatan terhadap *Eschericia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dan *Candida albicans* (*C. Albicans*) dengan MIC berkisar 0,9 – 7,0 $\mu\text{g/ml}$ (Chang *et al.* 2020). Oleh karena itu, penting untuk terus mengeksplorasi jamur *Penicillium* spp. khususnya isolat lokal dalam rangka upaya penelitian berkelanjutan menuju agen sumber senyawa bioaktif yang dapat berkontribusi dalam mengatasi masalah kesehatan.

Laboratorium Biokimia–Enzim, Fermentasi dan Biologi Molekuler, Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Riau memiliki beberapa koleksi isolat *Penicillium* spp. yang diisolasi dari tanah gambut Hutan Primer Cagar Biosfer Giam Siak Kecil Bukit Batu (GSKBB) Provinsi Riau. Beberapa koleksi tersebut sedang diuji dalam menghasilkan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antimikroba. Nurulita dkk. (2020) telah menguji ekstrak etil asetat dari media cair jamur *Penicillium* spp. strain LBKURCC29 dan LBKURCC30 dimana *Penicillium* spp. LBKURCC29 memiliki aktivitas terhadap mikroba patogen *C. albicans*. Salah satu jamur *Penicillium* sp. koleksi Jurusan Kimia FMIPA Universitas Riau yang perlu juga dieksplorasi potensinya adalah *Penicillium* sp. LBKURCC34. Jamur yang juga diisolasi dari tanah gambut Hutan Primer Cagar Biosfer GSKBB dan diuji potensinya akan menjadi bagian dari upaya berkelanjutan untuk mencari novel metabolit bioaktif. Untuk mengetahui senyawa-senyawa aktif perlu dilakukan identifikasi melalui pemisahan ekstrak kasar dan isolasi senyawa aktif. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan produksi senyawa bioaktif dengan fermentasi cair pada media produksi, kemudian diekstraksi dengan pelarut etil asetat, dan difraksinasi lebih lanjut dengan kromatografi kolom. Setiap hasil tahap ekstraksi dan fraksinasi diuji aktivitas antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen yaitu *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) dan jamur *C. albicans*.

Mikroba patogen seperti bakteri *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, dan jamur *C. albicans* cukup intens digunakan dalam penelitian penemuan senyawa antimikroba patogen manusia. Bakteri *E. coli* digunakan karena bakteri ini merupakan bakteri indikator pencemaran yang berbahaya bagi manusia.

Hal ini disebabkan oleh adanya strain *E. coli* yang memproduksi toksin hingga menyebabkan gastroenteritis pada manusia yang ditandai dengan gejala diare, demam yang disertai muntah, bahkan kematian (Brooks *et al.* 2012). Bakteri *S. aureus* dapat ditemukan pada mulut dan menghasilkan enterotoksin yang menyebabkan septikemia, endocarditis, meningitis, dan pneumonia. Selain enterotoksin, bakteri *S. aureus* juga memproduksi hemolisin yaitu toksin yang dapat merusak dan memecah sel – sel darah merah (Ajizah dkk. 2007). *B. subtilis* dapat menyebabkan sistem imun terganggu, gastroenteritis akut dan meningitis. *S. epidermidis* dapat menyebabkan infeksi neonates pada penderita yang sistem kekebalan tubuh yang rendah. Aktivitas antijamur *C. albicans* merupakan jamur patogen yang dapat menimbulkan penyakit yang disebut dengan penyakit Candidiasis. Penyakit tersebut menyerang selaput lendir mulut, vagina, dan saluran pencernaan (Fernandes *et al.* 2018). Upaya eksplorasi potensi isolat jamur lokal terhadap berbagai mikroba patogen tersebut bertujuan mencari senyawa metabolit sekunder media cair *Penicillium* sp. LBKURCC34 sebagai sumber senyawa bioaktif antimikroba.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Autoclaf All America model 1925/KY-23D, spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S UV-VIS v4.002 2L9N175013, Madison, USA), vortex mixer Genie 2TM, waterbath, vacuum Heidolph WB 2000 beserta rotary evaporator Buchi, UV hand lamp, jangka sorong (Vernier Caliper, 150×0,05mm, China), HPLC (Shimadzu LC solution seri UFLC, Kyoto, Japan), dan alat-alat standar laboratorium lainnya sesuai prosedur kerja.

Adapun bahan yang digunakan adalah kultur jamur *Penicillium* sp. (No. Koleksi LBKURCC34), bakteri *E. coli*, bakteri *S. aureus*, bakteri *B. subtilis*, bakteri *S. epidermidis* dan jamur *C. albicans*, Amoxsan[®] keluaran PT. Sanbe Farma, Indonesia sebagai kontrol positif uji antibakteri, Ketokonazol[®] sebagai kontrol positif uji antijamur, Nutrient Agar (NA) (Merck Cat. No. 1.05450), Nutrient Broth (NB) (Merck Cat.No. 1.06649), kertas cakram Durchmesser (No. Katalog 52355 Duren, Germany), kertas saring GF/C Whatman (No. Katalog 1882055), Plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Silica Gel 60F₂₅₄ (Merck Cat. No. 1.05554.0001) (Porositas 60 Å, ukuran partikel 10-12 μm), eluen KLT digunakan pelarut pro-analisis, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma Cat. No. 47989-10GM) dan bahan lain yang digunakan sesuai prosedur kerja.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini diawali dengan produksi ekstrak senyawa sekresi jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34

setelah diremajakan dengan metoda dan komposisi media mengikuti Lee *et al.* (2001) dan Saputra dkk. (2013) dengan modifikasi yang dipaparkan di Nurulita dkk. (2020). Setelah inkubasi selama 14 hari, media fermentasi cair diekstraksi dengan etil asetat dan identifikasi kandungan senyawa golongan metabolit sekunder (terpenoid/steroid, alkaloid, fenolik, flavonoid, dan saponin) dilakukan mengikuti metode yang telah dilakukan oleh Nurulita dkk. (2020). Penelitian dilanjutkan dengan fraksinasi dengan kromatografi kolom *Silica Gel* 60 GF₂₅₄, analisis KLT dan HPLC serta uji aktivitas senyawa antimikroba terhadap beberapa mikroba patogen (*E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* dan *C. albicans*) dan beserta uji KLT-Bioautografi.

Fraksinasi Senyawa Antibakteri dengan Kromatografi Kolom *Flash* (KK)

Ekstrak total etil asetat *Penicillium* sp. LBKURCC34 dipisahkan dengan kromatografi vakum cair yang diisi dengan *silica gel* 60 GF₂₅₄ sebanyak 180 g. Pengisian silika ke dalam kolom dilakukan dalam keadaan vakum, agar diperoleh kerapatan maksimum. Ekstrak dimasukkan ke bagian atas kolom, selanjutnya kolom dan ekstrak elusi secara bergradien menggunakan perbandingan pelarut dimulai dari *n*-heksana 100%, campuran *n*-heksana:etil asetat (4:1; 3:2; 2:3; 1:4), etil asetat 100%, campuran etil asetat:methanol (9:1; 4:1; 7:3; 3:2; 1:1) hingga metanol 100%. Hasil elusi ditampung dalam erlenmeyer yang telah diberi nomor sesuai dengan pelarut dan pola pemisahan KK yang dihasilkan. Pelarutnya diuapkan hingga kering lalu dimasukkan ke dalam vial yang telah diberi nomor dan sudah diketahui beratnya agar diketahui rendemen setiap fraksi yang didapatkan.

Analisis KLT dan HPLC untuk Melihat Pola Noda Ekstrak Kasar dan Fraksi-Fraksi

Ekstrak kasar metabolit sekunder dari jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34 (ekstrak kering etil asetat) dilarutkan dalam metanol dianalisis dengan KLT pada plat KLT SiO₂ menggunakan eluen etil asetat:heksana (3:2). Noda dideteksi dengan penyinaran sinar UV 366 dan 254 nm serta penyemprotan 0,5% *p*-anisaldehid dalam larutan metanol:H₂SO₄:asam asetat dengan perbandingan 18:1:1 (v/v/v) dan dipanaskan dalam oven dengan suhu 110°C selama 3 menit untuk melihat keberadaan peptaibol dari ekstrak tersebut apabila terjadi noda berwarna merah terang (Chutrakul *et al.* 2008). KLT ini difoto dan nilai R_f dari noda ditentukan dengan jarak migrasi noda dibagi jarak migrasi eluen. Pemaparan dengan sinar UV 366 dan 256 nm dilakukan sebelum penyemprotan untuk mendeteksi noda-noda lain yang berfloresensi.

Ekstrak metabolit sekunder dari jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34 dianalisis menggunakan HPLC fase terbalik. Ekstrak dalam metanol disaring dengan penyaring *Grace* 0,45 µm.

Filtrat sebanyak 20 µL diinjeksikan ke dalam kolom HPLC *Shim-pack* VP-ODS (250×4,6 mm). Sampel dianalisis selama 25 menit menggunakan perbandingan pelarut air:metanol (3:2) dengan sistem elusi bergradien. Detektor sinar UV digunakan pada panjang gelombang 210 dan 365 nm. Pemilihan panjang gelombang ini berdasarkan pengukuran pendahuluan menggunakan spektrofotometer UV.

Deteksi Noda Aktif dari Fraksi Aktif Dengan Metode KLT-Bioautografi

Uji bioautografi dilakukan dengan membuat media NA sesuai dengan petunjuk kemasan produk (untuk lapisan bawah) dan media NA 80% sesuai dengan petunjuk kemasan produk (untuk lapisan atas mengandung bakteri patogen dan jamur). Media NA lapisan bawah dituang ke cawan petri berisi 1/3 tinggi cawan petri (sekitar 10 mL). Setelah media NA 100% padat, 1 plat KLT diletakkan di atas NA lapisan bawah dengan menghadap ke atas, lalu ditambahkan lapisan atas NA 80% (dengan keadaan hangat-hangat kuku) dengan suspensi bakteri uji yang telah diremajakan sebanyak 2 mL (OD 0.8) lalu dihomogenkan (15 mL media NA 80% dan 2 mL suspensi bakteri *E. coli*, di NB). Selanjutnya media dibiarkan mengeras dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kondisi terbalik. Setelah diinkubasi, larutan MTT disemprotkan pada plate dan menjadi bioautogram. Jika mengandung aktivitas, noda senyawa aktif pada KLT akan membentuk zona bening/putih dan ditentukan nilai R_f noda sebagai noda aktif antimikroba.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari uji aktivitas antijamur disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Untuk membandingkan nilai rata-rata hasil aktivitas antijamur senyawa metabolit sekunder dari media produksi antibiotik dengan kontrol positif Amoksisilin dan Ketokonazol digunakan *Duncan New Multi Range Test* (DNMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi metabolit sekunder menggunakan mikroba dilakukan dengan metode fermentasi *batch* dimana kondisi lingkungan media fermentasi dikendalikan, seperti komposisi media, suhu, suplai oksigen dan jumlah mikroba. Fermentasi *batch* menggunakan nutrisi yang diberikan hanya di awal proses fermentasi. Berbagai jenis media fermentasi digunakan, baik media dari bahan alami seperti media kentang dan juga sintesis seperti *potato dextrose broth* (PDB), *czapek dox broth* (CDB), *sabouraud dextrose broth* (SDB), *malt extract broth* (MEB), *yeast extract* (YE), *yeast malt extract broth* (YMB), *peptone glucose yeast* (PGY), *yeast extract peptone glucose* (YPD), and *czapek yeast extract* banyak digunakan dalam penelitian pertumbuhan jamur *Penicillium* sp. dari berbagai strain (Aftab *et al.* 2021). Pada penelitian ini, produksi senyawa

bioaktif dari jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34 menggunakan jamur yang telah diremajakan pada media PDA dan dilanjutkan media PDB. Media produksi berbeda dengan media pertumbuhan jamur karena memiliki komposisi nutrisi media menurut Lee *et al.* (2001) dan Saputra dkk. (2013) yang dimodifikasi oleh Nurulita dkk. (2020).

Komposisi nutrisi pada media merupakan hal yang penting, dimana sumber karbon sederhana seperti glukosa (dekstrosa) akan melalui jalur metabolisme yang mempengaruhi produksi intermediat yang mengarah ke metabolit primer dan sekunder selain CO₂, air, dan energi (Turner 1971). Penambahan glukosa menghasilkan pertumbuhan jamur tertinggi, tetapi produksi metabolit bioaktif secara signifikan lebih sedikit karena menekan produksi metabolit bioaktif (Merlin *et al.* 2013; Hutter 1982). Suplemen asam amino juga tidak kalah penting dalam media fermentasi mikroba. Berbagai cincin karbon atau kerangka karbon dan nitrogen berperan ke dalam proses metabolisme primer atau sekunder mikroorganisme (Noaman *et al.* 2004). Fermentasi dalam media produksi penelitian dilakukan selama 14 hari yang merujuk pada literatur produksi antibiotik oleh Saputra dkk. (2013). Merlin *et al.* (2013) menyatakan bahwa pertumbuhan dan produksi senyawa antibakteri akan maksimum setelah jamur mencapai fase stasioner dan bertahan hampir konstan hingga 15 hari inkubasi dan setelah itu produksi metabolit sekunder secara nyata sangat rendah.

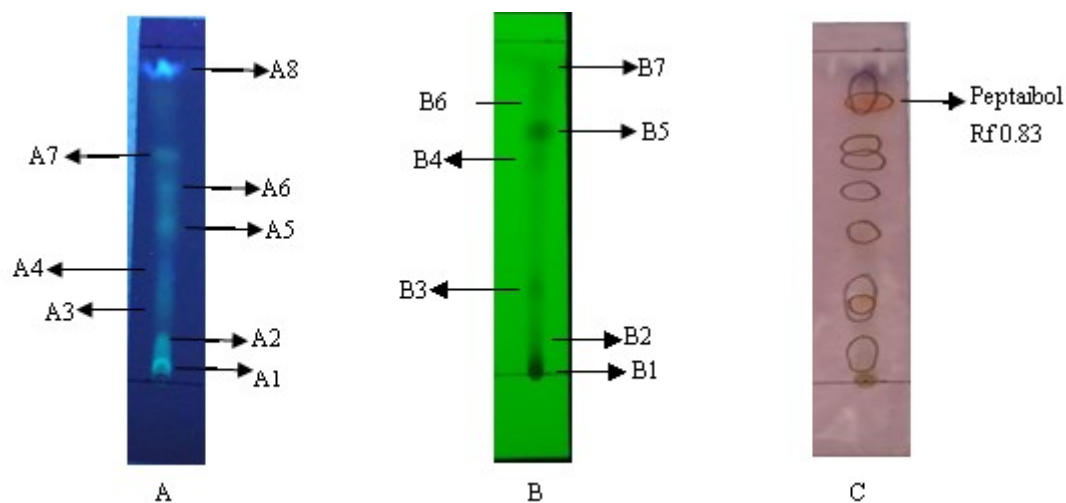
Setelah fermentasi selama 14 hari, ekstraksi media fermentasi dengan etil asetat menghasilkan evaporasi dari ekstrak etil asetat berwarna coklat dengan rendemen 0,0133%. Uji fitokimia pada ekstrak etil asetat dilakukan untuk mengetahui jenis metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak yang diperoleh. Berdasarkan hasil uji fitokimia

menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat positif mengandung senyawa terpenoid dan senyawa fenolik (Tabel 1). Hal ini sejalan dengan penemuan Tang *et al.* (2019) yang dapat mengisolasi isopenicilin yang merupakan terpenoid dengan aktivitas menghambat aktivitas mensinyal Wnt/ β -catenin (Tang *et al.* 2019). Senyawa bioaktif terpenoid lain, yaitu meroterpenoid memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan larva *Helicoverpa armigera* Hubner (Bai *et al.* 2019; Bai *et al.* 2021).

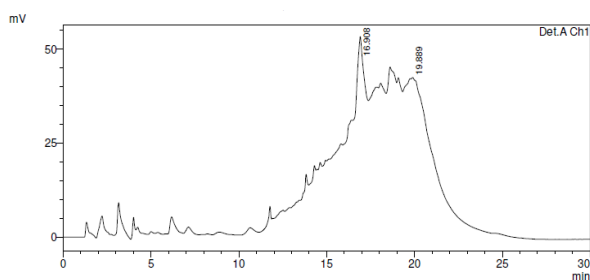
Tabel 1. Uji fitokimia ekstrak etil asetat hasil fermentasi jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34

No	Uji Fitokimia	Ekstrak
1	Terpenoid	+
2	Steroid	-
3	Fenolik	+
4	Flavonoid	-
5	Alkaloid	-
6	Saponin	-

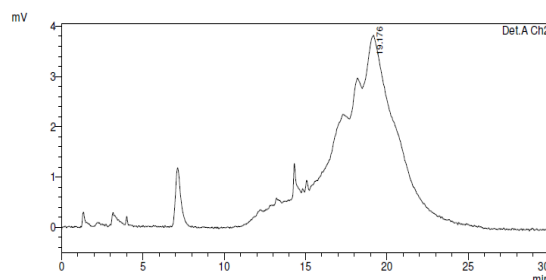
Analisis pola noda dan puncak ekstrak dengan KLT dan HPLC dilakukan dengan melarutkan terlebih dahulu ekstrak kering dengan metanol. Untuk KLT, elusi dilakukan menggunakan eluen dengan pemisahan terbaik yaitu etil asetat:heksana (3:2). Hasil yang didapat yaitu adanya 8 noda yang berfluoresens di bawah sinar UV 366 nm dan 7 noda yang berfluoresens di bawah sinar UV 254 nm (Gambar 1). Pada KLT tersebut dilakukan penyemprotan 0,5% *p*-anisaldehid untuk melihat adanya kandungan peptaibol yang berupa noda merah muda (Chuttrakul *et al.* 2008). Analisis peptaibol dilakukan karena peptaibol berperan dalam



Gambar 1. Kromatogram KLT ekstrak etil asetat dari media produksi isolat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34 dengan eluen etil asetat:n-heksana (3:2) pada panjang gelombang 366 nm (noda A1 – A8) (A), panjang gelombang 254 nm (noda B1 – B7) (B), dan dengan pewarna anisalaldehid (C).

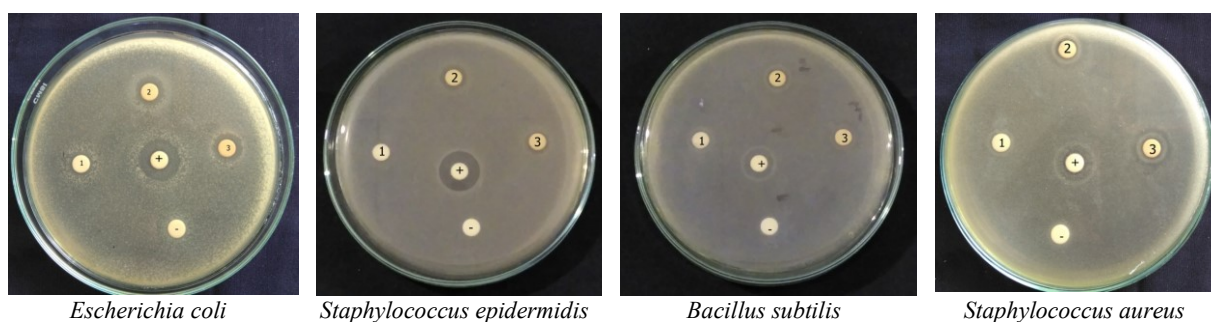


Di bawah panjang gelombang 210



Di bawah panjang gelombang 365

Gambar 2. Kromatogram HPLC ekstrak etil asetat dari media produksi isolat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34



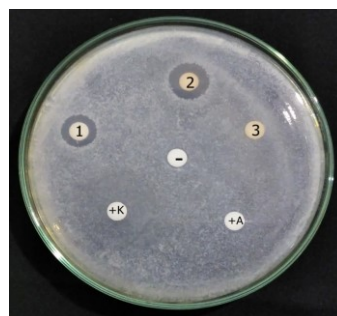
Gambar 3. Uji antibakteri ekstrak etil asetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34 pada beberapa bakteri patogen. (1) Ekstrak konsentrasi 1,9 mg/mL, (2) Ekstrak konsentrasi 3,8 mg/mL, (3) Ekstrak konsentrasi 5,7 mg/mL, (+) kontrol positif amosisilin 3,8 mg/mL, (-) kontrol negatif metanol.

sintesis spora pada kultur yang sudah tua yang mungkin saja merupakan senyawa bioaktif. Hasil analisis ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat dari jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34 mengandung peptaibol yang merupakan polipeptida rantai pendek pada noda dengan Rf 0,83.

Ekstrak etil asetat yang telah dilarutkan dengan metanol dengan konsentrasi 500 ppm dianalisis dengan HPLC dengan panjang gelombang deteksi 210 dan 365 nm yang sebelumnya didapatkan dari pengukuran menggunakan spektrofotometri UV-Vis dari panjang gelombang absorbansi maksimal. Dengan sistem HPLC yang digunakan menyebabkan senyawa yang bersifat polar keluar terlebih dahulu karena tidak tertahan oleh fasa diam yang bersifat nonpolar dikarenakan prinsip HPLC yaitu “like dissolve like”. Hasil analisis HPLC terhadap ekstrak dapat dilihat pada Gambar 2. Kromatogram menunjukkan adanya 2 puncak dominan pada panjang gelombang 210 m, waktu retensi kedua puncak berturut-turut adalah 16,908 dan 19,889 menit, pada panjang gelombang 365 nm terdapat 1 puncak dominan dengan waktu retensi 19,176 menit. Puncak-puncak dominan pada waktu retensi sekitar 15 – 20 menit menunjukkan bahwa ekstrak didominasi senyawa-senyawa semipolar.

Metode yang digunakan untuk uji antimikroba ekstrak etil asetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34 adalah metode difusi cakram Kirby-Bauer dengan beberapa konsentrasi (1,9; 3,8; dan 5,7

mg/mL) dan 2 kali pengulangan. Penggunaan konsentrasi ini lebih kecil penelitian yang dilakukan Nuthan *et al.* (2020) yaitu sebesar 50 µg/µL. Dari hasil pengamatan, diketahui bahwa ekstrak etil asetat dapat menghambat pertumbuhan dari kelima mikroba patogen yang diuji (Gambar 3 dan Gambar 4, Tabel 2). Peningkatan konsentrasi ekstrak tidak meningkatkan aktivitas antimikroba yang terlihat dari hasil uji Duncan tidak berbeda nyata satu sama lain pada tiga konsentrasi uji. selain itu, walaupun ada zona penghambatan, tetapi aktivitas hanya berkisar 11 - 45% dibandingkan dengan kontrol positif.



Gambar 4. Uji antijamur *Candida albicans* dari ekstrak etil asetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34. (1) Ekstrak konsentrasi 1,9 mg/mL, (2) Ekstrak konsentrasi 3,8 mg/mL, (3) Ekstrak konsentrasi 5,7 mg/mL, (+) kontrol positif katekonazol 3,8 mg/mL, (-) kontrol negatif metanol.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat dari isolat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34

Mikroba Patogen	Konsentrasi	Diameter Daya Hambat (mm)		
		P1	P2	Rata-rata
<i>E. coli</i>	1,9 mg/mL	7,53	7,35	7,44±0,13 ^{cde}
	3,8 mg/mL	11,39	12,4	10,89±0,70 ^c
	5,7 mg/mL	8,75	11,54	10,14±1,97 ^{cd}
	+amoxsan	15,4	15,19	15,29±0,15 ^b
	-metanol	6,00	6,00	6,00±0,00 ^e
<i>S. aureus</i>	1,9 mg/mL	9,28	8,85	9,06±0,30 ^{cde}
	3,8 mg/mL	11,01	11,28	11,14±0,19 ^c
	5,7 mg/mL	9,85	9,1	9,47±0,53 ^{cde}
	+amoxsan	14,56	14,58	14,57±0,01 ^b
	-metanol	6,00	6,00	6,00±0,00 ^e
<i>S. epidermidis</i>	1,9 mg/mL	6,58	6,65	6,61±0,05 ^{de}
	3,8 mg/mL	9,2	9,66	9,43±0,32 ^{cde}
	5,7 mg/mL	8,86	8,52	8,69±0,24 ^{cde}
	+amoxsan	14,53	14,44	14,48±0,06 ^b
	-metanol	6,00	6,00	6,00±0,00 ^e
<i>B. subtilis</i>	1,9 mg/mL	6,58	6,58	6,58±0,00 ^{de}
	3,8 mg/mL	6,5	6,75	6,62±0,17 ^{de}
	5,7 mg/mL	6,21	6,18	6,19±0,02 ^e
	+amoxsan	10,39	8,39	9,89±0,70 ^{cd}
	-metanol	6,00	6,00	0,00±0,00 ^e
<i>C. albicans</i>	1,9 mg/mL	10,46	10,17	10,31±0,20 ^c
	3,8 mg/mL	9,54	8,27	8,90±0,90 ^{cde}
	5,7 mg/mL	6,00	6,00	6,00±0,00 ^e
	+ketokonazol	28,32	18,35	23,33±7,04 ^a
	-metanol	6,00	6,00	6,00±0,00 ^e

Catatan: +: kontrol positif, -: kontrol negatif, P1: pengulangan pertama, P2: pengulangan kedua, (a,b,c,d,e): rata-rata nilai aktivitas antimikroba dari 2 kali pengukuran, pangkat huruf yang sama menyatakan tidak berbeda secara nyata pada tingkat kepercayaan 95% ($p \leq 0,05$) pada kolom yang sama berdasarkan uji Duncan jarak berganda. Diameter 6 mm setara dengan tidak ada inhibisi

Pada uji aktivitas penghambatan jamur *C. albicans* terlihat bahwa konsentrasi lebih besar (5,7 mg/mL) menunjukkan penghambatan lebih kecil (1,9 mg/mL) dan ditunjukkan bahwa konsentrasi tersebut tidak berbeda nyata daripada kontrol negatif. Nilai deviasi yang cukup besar menyebabkan pengulangan uji antimikroba metode difusi ini perlu dilakukan lebih dari dua kali ulangan. Akan tetapi keterbatasan rendemen ekstrak tidak memungkinkan. Produksi dengan fermentasi cair ini perlu dilakukan dengan volume yang lebih besar.

Korelasi dengan hasil uji fitokimia yang menunjukkan ekstrak mengandung senyawa

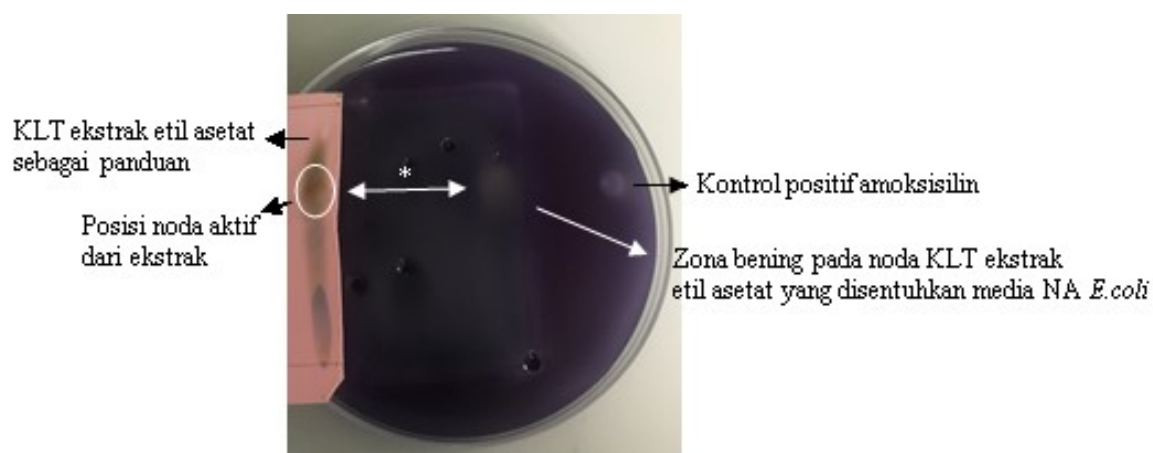
terpenoid dan fenolik dimungkinkan senyawa golongan tersebut menghambat pertumbuhan kelima mikroba patogen tersebut. Pada penelitian yang dilakukan Nurulita dkk. (2020), *Penicillium* sp. LBKURCC29 yang memproduksi senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan jamur *C. albicans*. Mekanisme kerja dari senyawa terpenoid diyakini bahwa senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan dengan mengganggu proses terbentuknya membran dan atau dinding sel, membran dan atau dinding sel tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna. Hal tersebut juga senada dengan pendapat Gunawan dkk. (2008), bahwa

senyawa terpenoid mempunyai kemampuan dalam menghambat bakteri. Mekanisme penghambatan senyawa terpenoid sebagai antibakteri ialah bereaksi dengan porin pada membran luar dinding sel bakteri dan membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin mengakibatkan masuknya senyawa yang akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri sehingga sel bakteri akan kekurangan nutrisi dan pertumbuhan bakteri terhambat atau mati.

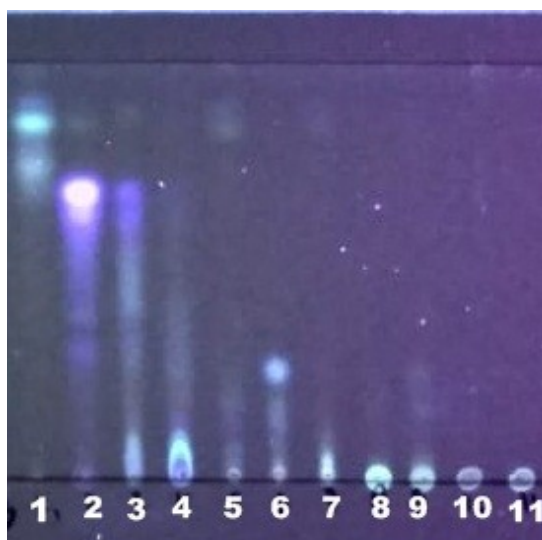
Untuk mengidentifikasi lebih lanjut senyawa aktif dalam ekstrak etil asetat isolat *Penicillium* sp. LBKURCC34 dilakukan uji KLT-Bioautografi seperti yang pernah dilakukan Owen *et al.* (2019). Metode KLT-Bioautografi umum digunakan karena efektif untuk mempelajari senyawa aktif dan memberikan informasi pendahuluan tentang aktivitas, lokasi aktivitas antimikroba, dan efikasi dari senyawa atau noda langsung pada KLT (Armengol *et al.* 2021;

Akin & Saki 2019). Metode ini cocok dan dapat diterima untuk penentuan *in situ* pada antimikroba farmasetikal (Nuthan *et al.* 2020). Jika terdapat aktivitas, zona inhibisi dilihat dari permukaan agar di mana senyawa antimikroba telah berdifusi dari plat KLT ke agar (Favre-Godal *et al.* 2013).

Untuk mendeteksi zona bening yang dihasilkan oleh ekstrak kasar sedikit sulit karena adanya latar dari KLT, maka perlu ditambahkan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromida), TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium klorida) atau INT (iodonitrotetrazolium klorida) (Wang *et al.* 2021). Dehidrogenase dari mikroba uji akan mengubah garam menjadi formazan berwarna, karena MTT, INT dan garam tetrazolium lainnya berwarna terang diubah menjadi senyawa berwarna gelap oleh metabolit bakteri, sehingga membentuk warna latar belakang, dan sebagai hasilnya, untuk MTT, zona



Gambar 5. Uji KLT-bioautografi antibakteri *Escherichia coli* dari ekstrak etil asetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34 dengan konsentrasi 500 µg/µl dan kontrol positif amoksisilin. *Rf noda aktif menunjukkan nilai 0,67.

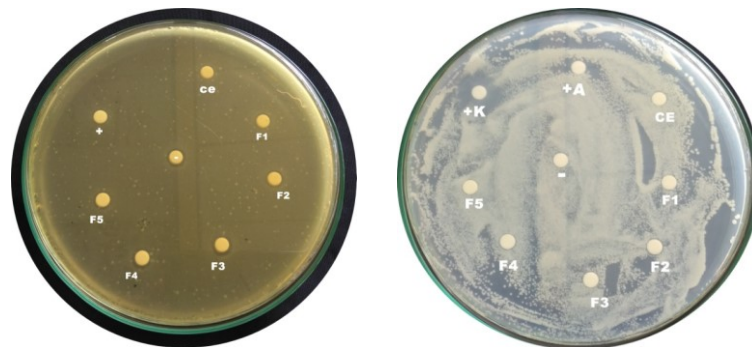


Gambar 6. Kromatogram fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom ekstrak etil asetat media pertumbuhan *Penicillium* sp. LBKURCC34

Tabel 3. Hasil uji antimikroba fraksi dari isolat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34 terhadap *E. coli* pada konsentrasi 3,8 mg/mL

Mikroba Patogen	Fraksi	Diameter Daya Hambat (mm)		Rata-rata
		1	2	
<i>E.coli</i> ATCC 35218	F1	7,08	8,41	7,74±0,94 ^{bcd}
	F2	7,4	10,4	8,90±2,10 ^b
	F3	8,48	9,55	9,01±0,75 ^b
	F4	9,08	7,86	8,47±0,86 ^b
	F5	7,96	8	7,98±0,06 ^{bc}
	+Amoxsan	6,42	6,55	6,48±0,09 ^{cd}
	-Metanol	8,63	8,81	8,72±0,13 ^b
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	F1	6,00	6,00	6,00±0,00 ^d
	F2	6,00	6,00	6,00±0,00 ^d
	F3	6,00	6,00	6,00±0,00 ^d
	F4	6,00	6,00	6,00±0,00 ^d
	F5	6,00	6,00	6,00±0,00 ^d
	+Ketokonazol	14,28	12,83	13,55±1,02 ^a
	-Metanol	6,00	6,00	6,00±0,00 ^d

Ukuran diameter kertas cakram 6 mm



Gambar 7. Uji antibakteri *Escherichia coli* dan antijamur *Candida albicans* dari ekstrak etil asetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34 dengan konsentrasi 3,8 mg/mL. (F1) Fraksi 1, (F2) Fraksi 2, (F3) Fraksi 3, (F4) Fraksi 4, (F5) Fraksi 5, (+A) kontrol positif amoksisilin, (+K) kontrol positif amoksisilin, (-) kontrol negatif metanol.

penghambatan kuning diamati pada latar belakang ungu (Lim *et al.* 2015). Intensitas dari warna ungu akan sama dengan konsentrasi dari sel yang hidup. Jika tidak adanya aktivitas mitokondria karena adanya sel yang lisis, maka garam tetrazolium tidak akan direduksi. Warna dari zona bening adalah putih-kekuningan di mana menandakan adanya aktivitas biologis dari senyawa yang aktif, senyawa aktif dilihat dari munculnya zona bening pada latar ungu sehingga dapat dihitung nilai Rf-nya (Dudoit *et al.* 2020). Pada penelitian ini didapat bahwa noda aktif pada ekstrak etil asetat dengan konsentrasi 200 mg/mL tersebut memiliki Rf 0,67 (Gambar 5). Penelitian Nuthan *et al.* (2020) dengan menggunakan metoda yang sama mendapatkan senyawa aktif pada

noda Rf 0,18 yang disetarakan dengan puncak HPLC pada t_R 3,119 menit. Hal ini menjadi acuan dalam penelusuran senyawa aktif pada isolasi senyawa.

Dari hasil fraksinasi KK untuk pemisahan lebih lanjut ekstrak etil asetat media pertumbuhan *Penicillium* sp. LBKURCC34 didapat 11 fraksi dengan pola noda seperti pada Gambar 6. Rf noda dan rendemen setiap fraksi bervariasi. Konsentrasi fraksi dan antibiotik yang digunakan dalam uji antibakteri metode difusi cakram Kirby-Bauer ini yaitu 3,8 mg/mL. Terbatasnya konsentrasi yang digunakan dikarenakan keterbatasan rendemen ekstrak yang ada. Penggunaan konsentrasi yang sama dengan antibiotik amoksisilin dan ketokonazol

sebagai kontrol positif dengan konsentrasi yang sama yaitu 3,8 mg/mL.

Untuk uji antimikroba fraksi dilakukan terhadap fraksi 1-5 berdasarkan kemungkinan adanya kandungan senyawa dengan Rf 0,67 (berdasarkan uji KLT-Bioautografi). Metode uji aktivitas fraksi ini masih menggunakan metode difusi cakram Kirby-Bauer. Sayangnya, uji aktivitas fraksi-fraksi 1-5 tidak menunjukkan aktivitas terhadap *E. coli* dan *C. albicans* berarti. Walaupun pada *E. coli* terdapat zona bening di luar diameter kertas cakram (6 mm) akan tetapi nilai ini masih di bawah kontrol negatif metanol. Uji aktivitas fraksi hasil KK dengan konsentrasi yang sama dengan uji aktivitas ekstrak kasar, memungkinkan kadar senyawa aktif di fraksi memiliki konsentrasi lebih tinggi. Akan tetapi konsentrasi tersebut masih belum cukup untuk menunjukkan aktivitas anti *E. coli* dan *C. albicans*.

Penelitian identifikasi senyawa aktif dari fermentasi cair ekstrak etil asetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC34 belum berhasil mengisolasi dan identifikasi lebih lanjut hingga ke struktur senyawa aktif. Hal tersebut disebabkan keterbatasan rendemen yang dihasilkan. Diperlukan produksi dalam jumlah volume yang lebih besar. Penelitian bahan alam sekresi mikroba cenderung mendapatkan rendemen yang lebih sedikit dibandingkan penelitian bahan alam dari tanaman.

KESIMPULAN

Produksi tiga liter media menghasilkan 0,4 gram (0,0133% b/v) ekstrak etil asetat yang diidentifikasi sebagai terpenoid dan fenolat; dan mengandung senyawa semipolar berdasarkan uji KLT dan HPLC. Hasil KLT setelah disemprot dengan *p*-anisaldehid 0,5% menunjukkan adanya senyawa peptaibol. Ekstrak etil asetat dapat menghambat pertumbuhan kelima mikroba patogen yang diuji namun hanya 11-45% dibandingkan dengan kontrol positif. Uji bioautografi terhadap *E. coli* menunjukkan noda aktif zona bening pada Rf sebesar 0,67. Sayangnya, dari Fraksi 1-5 yang terdapat noda dengan Rf 0,67 masih belum menunjukkan aktivitas berarti. Penyelidikan lebih lanjut untuk mengisolasi dengan volume produksi lebih besar diperlukan untuk mengidentifikasi senyawa aktif dari isolat lokal ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung dari Dana Penelitian DIPA LPPM Universitas Riau, Skema Penelitian Unggulan Universitas No. 689/UN.19.5.1.3/PP/2018 a.n. Yuana Nurulita.

DAFTAR PUSTAKA

Aftab, A., Muhammad, S.T.F., Akbar, N., Sajjad, A., Kakar, M.A. & Khaliq, S. (2021). Pigment production in *Penicillium*: Different methods of optimizations in submerged fermentation. *Pak-Euro Journal of Medical and Life Sciences*. **4(Sp I)**: S77-S95.

Ajizah, A., Thihana, T. & Mirhanuddin, M. (2007). Potensi ekstrak kayu ulin (*Eusideroxylon zwageri* T et B) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. *Bioscientiae*. **4(1)**: 37-42

Akin, M. & Saki, N. (2019). Antimicrobial, DPPH scavenging and tyrosinase inhibitory activities of *Thymus vulgaris*, *Helichrysum arenarium* and *Rosa damascena* mill. ethanol extracts by using TLC bioautography and chemical screening methods. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **42(7-8)**: 204-216.

Armengol, E.S., Harmanci, M. & Laffleur, F. (2021). Current strategies to determine antifungal and antimicrobial activity of natural compounds. *Microbiological Research*. **252**: 126867.

Aw, Y., Ong, K.S., Lee, L.H., Cheow, Y.L., Yule, C.M. & Lee, S.M. (2016). Newly isolated *Paenibacillus tyrfis* sp. nov., from Malaysian tropical peat swamp soil with broad spectrum antimicrobial activity. *Frontiers in Microbiology*. **7**: 1-9.

Bai, M., Zheng, C.J. & Chen, G.Y. (2021). Austins-type meroterpenoids from a mangrove-derived *Penicillium* sp. *Journal of Natural Products*. **84(8)**: 2104-2110.

Bai, M., Zheng, C.J., Huang, G.L., Mei, R.Q., Wang, B., Luo, Y.P., Zheng, C., Niu, Z.G. & Chen, G.Y. (2019). Bioactive meroterpenoids and isocoumarins from the mangrove-derived fungus *Penicillium* sp. TGM112. *Journal of Natural Products*. **82(5)**: 1155-1164.

Bianco, A., Budroni, M., Zara, S., Mannazzu, I., Fancello, F. & Zara, G. (2020). The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **104**: 8661-8678.

Brooks, G.F., Bute, J.S. & Morse, S.A. (2012). *Mikrobiologi Kedokteran*. Salemba Medika. Jakarta.

Chang, J.L., Xu, H.Z., Zhou, J., Zhou, M., Zhang, X., Guo, Y. & Ruan, H.L., (2020). Antimicrobial furancarboxylic acids from a *Penicillium* sp. *Journal of Natural Products*. **83(12)**: 3606-3613.

Chutrakul, C., Alcocer, M., Bailey, K. & Peberdy, J.F. (2008). The production and characterisation of trichotoxin peptaibols, by *Trichoderma asperellum*. *Chemistry and Biodiversity*. **5(9)**: 1694-1706.

Dudoit, A., Mertz, C., Chillet, M., Cardinault, N. & Brat, P. (2020). Antifungal activity of Brazilian red propolis extract and isolation of bioactive fractions by thin-layer chromatography-bioautography. *Food Chemistry*. **327**: 1 - 9.

Favre-Godal, Q., Queiroz, E.F. & Wolfender, J-L. (2013). Latest development in assessing antifungal activity using TLC-Bioautography:

- A review. *Journal of AOAC International*. **96(6)**: 1175 – 1188.
- Fernandes, L.D.S., Amorim, Y.M., da Silva, E.L., Silva, S.C., Santos, A.J.A., Peixoto, F.N., Neves Pires, L.M., Sakamoto, R.Y., Horta Pinto, F.D.C., Scarpa, M.V.C. & Araújo, M.G.D.F. (2018). Formulation, stability study and preclinical evaluation of a vaginal cream containing curcumin in a rat model of vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*. **61(10)**: 723-730.
- Gunawan, I.W.G., Bawa, I.G.A.G. & Sutrisnayanti, N.L. (2008). Isolasi dan identifikasi senyawa terpenoid yang aktif antibakteri pada herba mimran (*Phyllanthus niruri* Linn). *Jurnal Kimia*. **2(1)**: 31-39.
- Hutter, R. (1982). Design of culture media capable of provoking wide gene expression. In: Bullock J.D., Nisbet, L.J., Winstanley, D.J. (eds) *Bioactive Microbial Products, Search and Discovery*. Academic Press. London. Pp. 37-50.
- Joshi, H., Somduttand, C.P. & Mundra, S.L. (2019). Role of effective microorganisms (EM) in sustainable agriculture. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. **8(3)**: 172-181.
- Lee, H.J., Lee, J.H., Hwang, B.Y., Kim, H.S. & Lee, J.J. (2001). Antioangiogenic activities of gliotoxin and its methylthioderivative, fungal metabolites. *Archives of Pharmacol Research*. **24(5)**: 397 – 401.
- Lim, S.W., Loh, H.S., Ting, K.N., Bradshaw, T.D. & Allaudin, Z.N. (2015). Reduction of MTT to purple formazan by vitamin E isomers in the absence of cells. *Tropical Life Sciences Research*. **26(1)**: 111–120.
- Merlin, J.N., Christudas, I.V.S.N., Kumar, P.P. & Agastian, P. (2013). Optimization of growth and bioactive metabolite production: *Fusarium solani*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. **6(3)**: 98-103.
- Noaman, N.H., Fattah, A., Khaleafa, M. & Zaky, S.H. (2004). Factors affecting antimicrobial activity of *Synechococcus leopoliensis*. *Microbiological Research*, **159(4)**: 395-402.
- Nurulita, Y., Yuharmen, Y., Nenci, N., Mellani, A.O. & Nugroho, T.T. (2020). Metabolit sekunder sekresi jamur *Penicillium* spp. isolat tanah gambut Riau sebagai antijamur *Candida albicans*. *Chimica et Natura Acta*. **8(3)**: 133-143.
- Nuthan, B.R., Rakshith, D., Marulasiddaswamy, K.M., Rao, H.Y., Ramesha, K.P., Mohana, N.C., Siddappa, S., Darshan, D., Kumara, K.K.S. & Satish, S. (2020). Application of optimized and validated agar overlay TLC–bioautography assay for detecting the antimicrobial metabolites of pharmaceutical interest. *Journal of Chromatographic Science*. **58(8)**: 737-746.
- Ong, K.S., Aw, Y.K., Lee, L.H., Yule, C.M., Cheow, Y.L. & Lee, S.M. (2016). *Burkholderia paludis* sp. nov., an antibiotic-siderophore producing novel *Burkholderia cepacia* complex species, isolated from Malaysian tropical peat swamp soil. *Frontiers in Microbiology*. **7**: 2046.
- Owen, L., White, A.W. & Laird, K. (2019). Characterisation and screening of antimicrobial essential oil components against clinically important antibiotic-resistant bacteria using thin layer chromatography-direct bioautography hyphenated with GC-MS, LC-MS and NMR. *Phytochemical Analysis*. **30(2)**: 121-131.
- Pan, C., Shi, Y., Auckloo, B.N., Hassan, S., Akhter, N., Wang, K., Ye, Y., Chen, C.T., Tao, X. & Wu, B. (2017). Isolation and antibiotic screening of fungi from a hydrothermal vent site and characterization of secondary metabolites from a *Penicillium* isolate. *Marine Biotechnology*. **8(1)**: 1-11.
- Patel, A., Karageorgou, D., Rova, E., Katapodis, P., Rova, U., Christakopoulos, P. & Matsakas, L. (2020). An overview of potential oleaginous microorganisms and their role in biodiesel and omega-3 fatty acid-based industries. *Microorganisms*. **8(3)**: 434.
- Pessôa, M.G., Vespermann, K.A., Paulino, B.N., Barcelos, M.C., Pastore, G.M. & Molina, G. (2019). Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. *Biotechnology Advances*. **37(2)**: 319-339.
- Saputra, H., Puspita, F. & Nugroho, T.T. (2013). Production of an antibacterial compound against the plant pathogen *Erwinia carotovora* subs. Carotovora by the biocontrol strain *Gliocladium* sp. TN.C73. *Journal of Agircultural Technology*. **9(5)**: 1157-1165.
- Tang, J.W., Kong, L.M., Zu, W.Y., Hu, K., Li, X.N., Yan, B.C., Wang, W.G., Sun, H.D., Li, Y. & Puno, P.T. (2019). Isopenicins A–C: two types of antitumor meroterpenoids from the plant endophytic fungus *Penicillium* sp. sh18. *Organic Letters*. **21(3)**: 771-775.
- Tate, R.L. (2020). Microorganisms, ecosystem disturbance and soil-formation processes. In Tate, R.L. & Klein, D.A. (eds). *Soil Reclamation Processes*. CRC Press. Boca Raton. pp. 1-33
- Toghueo, R.M.K. & Boyom, F.F. (2020). Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. *3 Biotech*. **10(3)**: 107.
- Turner, W.B. (1971). *Fungal Metabolites*. Academic Press London.
- Wang, M., Zhang, Y., Wang, R., Wang, Z., Yang, B. & Kuang, H. (2021). An evolving technology that integrates classical methods with continuous technological developments: Thin-layer chromatography bioautography. *Molecules*. **26(15)**: 4647.