

ANALISIS PROFIL METABOLIT SEKUNDER JAMUR ENDOFIT DARI BUNGA TAPAK DARAT (*Catharantus Roseus*) ASAL TIMOR-NTT

Theo M. da Cunha, Yoseph Sugi dan Yeremias Tefa
 Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknik Undana
 Email: opa_cece@yahoo.com

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang Analisis Profil Metabolit Sekunder Jamur Endofit dari Bunga Tapak Dara (*Catharantus roseus*). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi senyawa kimia dari tanaman tapak dara menggunakan jamur endofit, mengetahui kandungan jamur endofit menggunakan HPLC dan LC-MS, mengetahui aktivitas anti bakteri terhadap jamur endofit dari bunga tapak dara. Hasil HPLC menunjukkan adanya beberapa senyawa kimia di dalam ekstrak tapak dara. Jamur endofit yang diperoleh adalah jenis *penicillium*. Hasil LC-MS menunjukkan 5 senyawa kimia di dalam ekstrak yaitu senyawa Cissogenin, 3',4',5',5,7,8-Hexame-thoxy flavone, Fibleucin, Feralolide, Kansuiphorin D. Hasil uji aktivitas antibakteri pada bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* menunjukkan respon hambatan kuat dengan DDH sebesar 13,1 mm sedangkan pada bakteri gram negatif *Escherichia coli* menunjukkan respon hambatan yang sedang dengan DDH sebesar 10,3 mm.

Kata kunci: *Catharantus roseus* jamur endofit, *penicillium*, metabolit sekunder, aktivitas antibakteri, NTT

ABSTRACT

A research about secondary metabolites profile analysis of endophytic fungi from tapak dara flower (*Catharantus roseus*) using HPLC and LC-MS has been done. The method of these research are extraction method with maserating method that aims to bind chemical compounds, and paper disc method for antibacterial activity test. The result of HPLC spectrum shows that chemical compounds are exist in tapak dara extracts. The endophytic fungi found is a type of *penicillium*. The result of LC-MS spectrum show that there are 5 chemical compounds such as cissogenin, 3',4',5',5,7,8-hexame-thoxy flavone, fibleucin, feralolide, and fansuiphorin D. Bacterial activity test in positive gram of *Staphylococcus aureus* bacterial indicate a strong inhibition with DDH of 13,1 mm, whereas bacterial activity test in negative gram of *Staphylococcus aureus* bacterial indicate an inhibition with DDH of 10,3 mm.

Keywords: *Catharantus roseus*, endophytic fungi, *penicillium*, secondary metabolites, bacterial activity, NTT

PENDAHULUAN

Tapak Dara atau *Catharantus roseus* (L.) merupakan tumbuhan tropis yang berasal dari Madagaskar. Tumbuhan ini banyak dijumpai sebagai tanaman hias dengan bunga berwarna merah muda, putih atau ungu. Di berbagai negara tumbuhan ini dikenal dengan berbagai macam nama yaitu, Chang Chun Hua (china), Hoa Hai Dong (Vietnam), Tsitsirika (Filipina), Soldaten Bolem (Belanda), Rose Periwinkle (Inggris) dan Kemuting Cina (Malaysia). Sedangkan di Indonesia, masing-masing daerah memiliki julukannya sendiri, seperti Kembang Tembaga (Sunda), Kembang Tapak Dara (Jawa), Sindapor (Sulawesi) dan Bunga Pica Piring (Timor).

Masyarakat di wilayah Timor dan masyarakat tradisional lainnya sejak dulu banyak memanfaatkan tanaman ini sebagai obat herbal. Daun hingga bunganya dipercaya berkhasiat menyembuhkan berbagai macam penyakit. Umumnya, masyarakat membuat Obat herbal ini dengan cara, merebus daun atau bunganya untuk kemudian diminum. Khasiat yang diperoleh dari tanaman ini meliputi : mampu menyembuhkan demam, luka bakar, batuk, bisul/bengkak, radang perut/ disentri, Hipertensi (tekanan darah tinggi), malaria, demam berdarah, penyakit gula dan terkhusus aktivitasnya sebagai obat antikanker yang banyak menarik perhatian.

Menurut laporan, khasiat yang dimiliki Tapak Dara berasal dari senyawa metabolit sekunder berupa senyawa alkaloid, yang berfungsi sebagai alat pertahanan diri terhadap radikal bebas, virus ataupun mikroba. Berbagai literatur menunjukkan bahwa tanaman ini mengandung bermacam-macam jenis alkaloid terpenoid indol (TIA) yang berbeda, dan beberapa diantaranya menunjukkan aktivitas farmakologi yang kuat (Van der Heijden, 2004). Senyawa alkaloid tersebut berupa senyawa vinblastine, reserpine, ajmalicine, serpenine dan vincristine. Sedangkan kandungan lain yang terdapat pada bagian daun berupa, catharanthine, vindoline, vindolidine, vindolicine, vindolinine, ibogaine, yohimbine, raubasine, leurosine, lochnerine dan pada bagian

akar mengandung Ajmalacine, serpentine, catharanthine, vindoline, leurosine, lochnerine, reserpine, alstonine, tabersonine, horhammericine, lochnericine, echitovenine (Tolambiya, 2016).

METODE PENELITIAN

Isolasi Jamur Endofit

Sampel daun tapak dara dipotong menjadi 4 bagian dengan masing-masing ukuran 0,5 cm x 0,5 cm. Potongan sampel kemudian direndam selama 30 detik secara bergantian dengan alkohol 70% dan aquades, sebanyak 3x untuk menghindari kontaminasi silang jamur epifit dan untuk menghilangkan zat-zat pengotor pada daun. Setelah itu potongan sampel ditiriskan dalam cawan petri berisi tissue, lalu dipindahkan menggunakan pinset steril dan diletakkan di atas media PDA pada cawan petri. Di setiap cawan petri diletakkan 4 potongan sampel dan disamping cawan petri diisolasi menggunakan parafilm kemudian diinkubasi. Proses ini dilakukan dalam laminar flow.

Pemurnian Jamur Endofit

Jamur endofit yang telah tumbuh pada media PDA, diamati secara mikroskopi. Koloni yang menunjukkan perbedaan dianggap sebagai isolat yang berbeda. Pemurnian jamur dilakukan dengan memotong jamur menjadi 3 bagian yaitu ujung, tengah dan depan sampel. Selanjutnya bagian dari jamur tersebut diambil menggunakan jarum ose yang sebelumnya dipijarkan terlebih dahulu diatas bunsen, kemudian diletakkan kedalam media PDA baru dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu ruangan.

Kultivasi DAN Ekstraksi Metabolit Sekunder

Sebanyak 50 gram beras cap nona kupang dimasukkan kedalam erlenmeyer 1000 ml, kemudian ditambahkan dengan 75 ml aquades. Setelah itu erlenmeyer ditutup dengan kapas steril dan aluminium foil, lalu diautoclave pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm dan waktu 30 menit.

Jamur endofit murni dimalt menjadi 5 bagian dan setiap bagian jamur dipotong kotak-kotak. Selanjutnya setiap bagian yang telah dipotong kotak-kotak dimasukkan kedalam masing-masing media beras yang telah diautoclave. Setelah itu erlenmeyer ditutup dengan kapas steril dan aluminium foil, lalu diisolasi dengan parafilm. Selanjutnya disimpan pada suhu ruangan (25°C) dan diamati pertumbuhan jamur 2-3 minggu.

Jamur hasil kultivasi yang telah tumbuh memenuhi media beras hingga bagian bawah erlenmeyer selanjutnya dimasukkan etil asetat sebanyak 100 ml lalu diaduk hingga tercampur sempurna. Kemudian didiamkan selama 1 malam dan disaring menggunakan kertas saring whatman. Filtrat yang diperoleh kemudian dievaporasi pada suhu 40°C untuk memisahkan antara ekstrak dan pelarutnya.

Identifikasi Hasil Isolasi

Ekstrak yang diperoleh dari hasil evaporasi kemudian dianalisis menggunakan LC-MS untuk mengetahui kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam senyawa metabolit sekunder jamur endofit dari daun tapak dara.

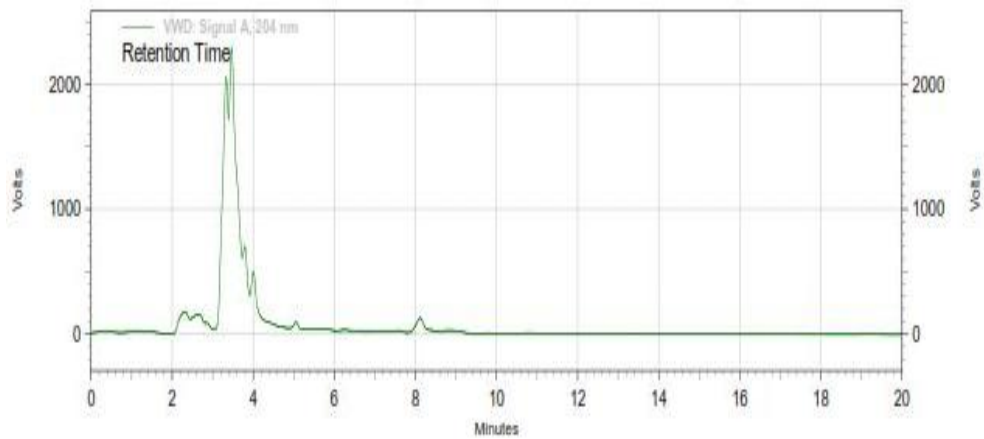
Pengujian aktivitas antibakteri

Kultur taburan (*S.aureus* dan *E.coli*) dibuat pada media nutrisi agar. Kemudian dengan pinset yang steril, diambil potongan kertas saring yang berbentuk cakram dengan diameter 0.66 cm diletakkan di permukaan kultur taburan, selanjutnya diteteskan ekstrak etil asetat jamur endofit konsentrasi 1 mg/ml dan aquades dengan mikro pipet, dan diinkubasi lagi pada suhu 37^o selama 24 jam. Kemudian diamati adanya penghambatan oleh daya antagonisme. Daya penghambatan terlihat adanya zona jernih di sekitar kertas saring.

HASIL DAN PEMBAHASAN

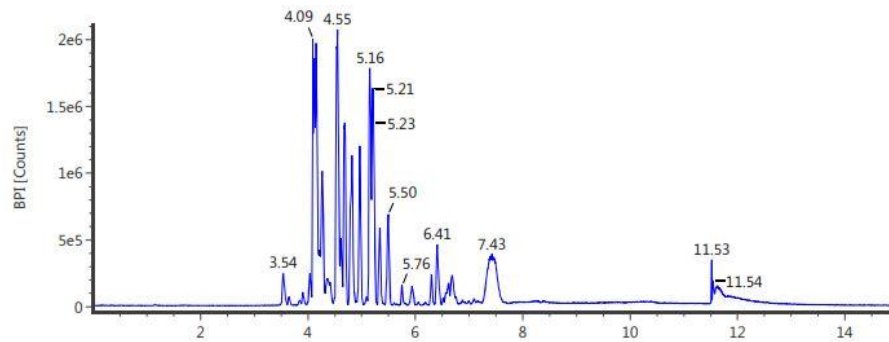
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Gambar 1. Hasil identifikasi dengan HPLC menunjukkan adanya beberapa peak yang menandakan bahwa jamur endofit memiliki beberapa senyawa kimia.



Gambar 1. Hasil HPLC

Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy (LC-MS)



Gambar 2. Hasil analisis instrumen LC-MS

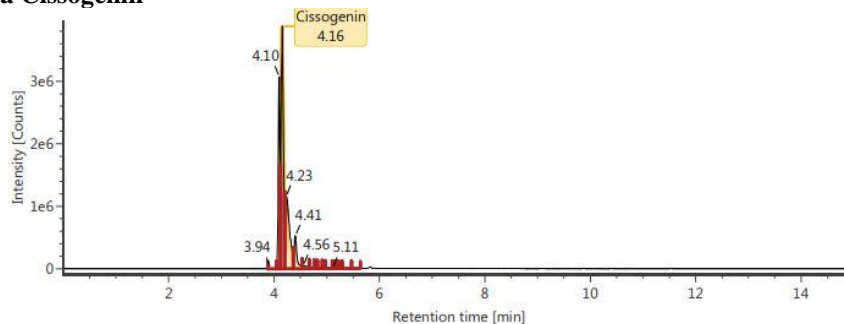
Identifikasi dengan menggunakan LC-MS ini lebih spesifik daripada HPLC karena LC-MS tidak hanya mengamati waktu retensi tapi juga pemisahan ion senyawa (Turnipseed et al. 2008, Lutter et al. 2011). Hasil uji di laboratorium menunjukkan bahwa terdapat 5 senyawa di dalam sampel tersebut, yaitu 3', 4', 5', 5, 7, 8 – hexame – thoxy flavone, cissogenin, feralolide, fibleucin, kansuiphorin D. Variasi ini tersaji pada tabel berikut :

Tabel 1. Data analisis LC-MS

	Waktu retensi	Berat molekul	Nama senyawa
1	4.12	367.2405	Cissogenin
2	4.55	403.1418	3',4',5',5,7,8-Hexame-thoxy flavones
3	4.97	357.1372	Fibleucin
4	5.16	345.0997	Feralolide
5	6.42	479.2423	Kansuiphorin D

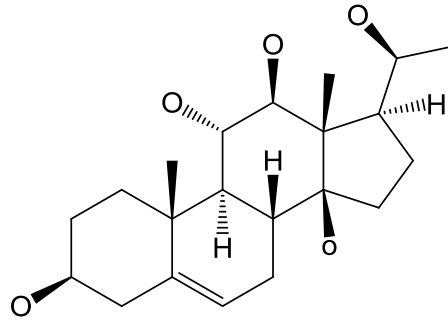
Berdasarkan data diatas diketahui bahwa pada sampel terdapat 5 puncak berbeda diantaranya:

1. Senyawa Cissogenin



Gambar 3. Senyawa Cissogenin

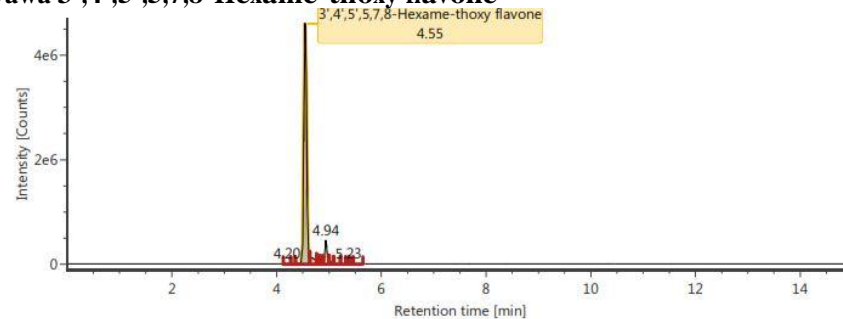
Kromatogram diatas menunjukkan bahwa senyawa cissogenin memiliki waktu retensi 4.12 menit. Senyawa ini diperkirakan memiliki ion molekul massa dengan m/z 367.2045($M+H=366.2045, M+Na=389$). Senyawa ini memiliki rumus senyawa $C_{21}H_{34}O_5$. Struktur dari senyawa cissogenin dapat dilihat pada gambar berikut :



Cissogenin

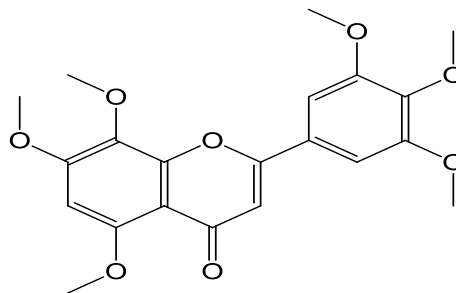
Gambar 4. Struktur senyawa cissogenin

2. Senyawa 3',4',5',5,7,8-Hexame-thoxy flavone



Gambar 5. Senyawa 3',4',5',5,7,8-Hexame-thoxy flavone

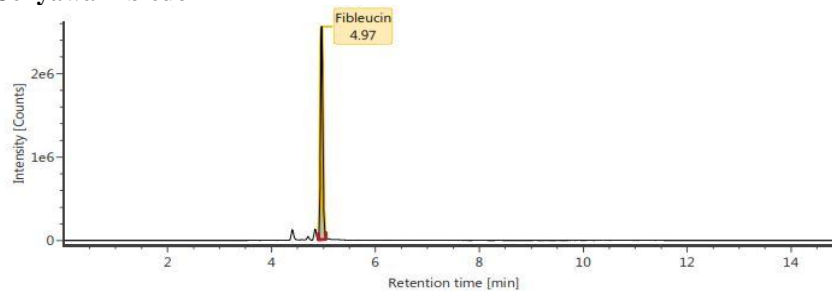
Hasil kromatogram diatas menunjukkan bahwa senyawa 3',4',5',5,7,8-Hexame-thoxy flavone memiliki waktu retensi 4,55. Senyawa ini memiliki ion molekul dengan massa m/z 402,141 ($M+H=403.1418, m+Na= 827,25021$) dengan rumus molekul $C_{21}H_{22}O_8$. Struktur dari senyawa ini dapat dilihat pada gambar berikut:



3',4',5',5,7,8-Hexame-thoxy flavone

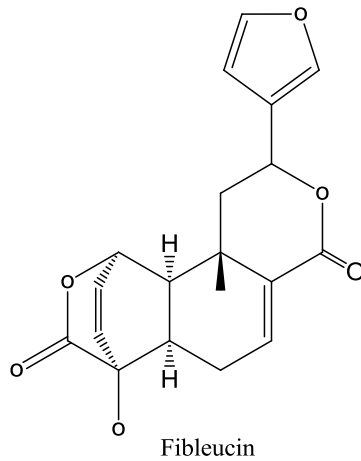
Gambar 6. Struktur senyawa 3',4',5',5,7,8-Hexame-thoxy flavone

3. Senyawa Fibleucin



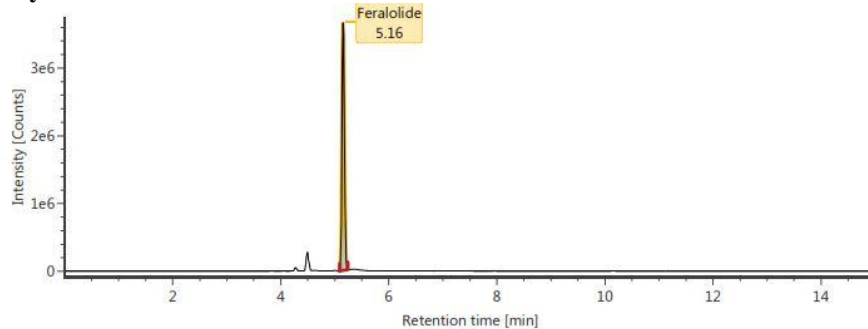
Gambar 7. Senyawa fibleucin

Kromatogram diatas menunjukkan bahwa senyawa fibleucin memiliki waktu retensi 4.97 menit. Senyawa ini diperkirakan memiliki ion molekul massa dengan m/z 357.1372 dengan rumus molekul $C_{20}H_{20}O_6$. Senyawa ini memiliki struktur kimia sebagai berikut :



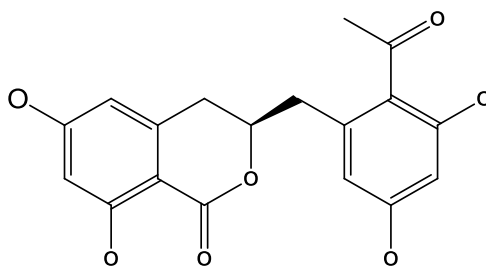
Gambar 8. Struktur Senyawa Fibleucin

4. Senyawa Feralolide



Gambar 9. Senyawa feralolide

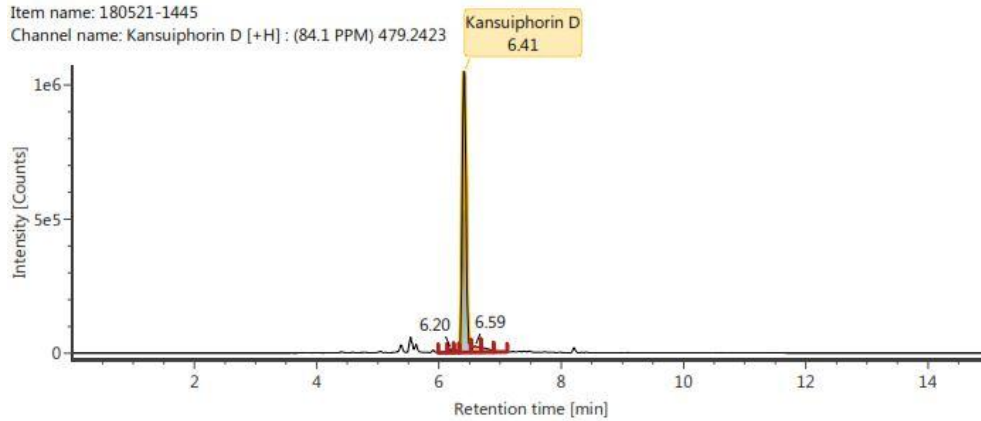
Kromatogram diatas menunjukkan bahwa senyawa feralolide memiliki waktu retensi 5.16 menit. Senyawa ini diperkirakan memiliki ion molekul massa dengan m/z 345.0997. Senyawa ini memiliki rumus molekul $C_{18}H_{16}O_7$ dengan struktur senyawa sebagai berikut:



Feralolide

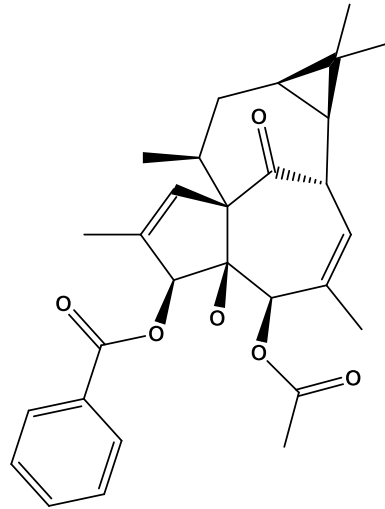
Gambar 10. Struktur senyawa feralolide

5. Kansuiphorin D



Gambar 11. Grafik kansuiphorin D

Hasil kromatogram diatas menunjukkan bahwa senyawa kansuiphorin D memiliki waktu retensi 6.41 menit. Senyawa ini diperkirakan memiliki ion molekul massa dengan m/z 478.2423($M+H=479.2423$). Senyawa ini memiliki rumus molekul $C_{29}H_{34}O_6$. Struktur kimia dari senyawa ini dapat dilihat pada gambar berikut:



Kansuiphorin D

Gambar 12. Struktur senyawa kansuiphorin D

Aktivitas Antibakteri

. Hasil uji aktivitas antibakteri oleh ekstrak bunga tapak dara dapat dilihat pada tabel 2 .

Tabel 2 . Tabel diameter daerah hambatan pertumbuhan bakteri oleh ekstrak bunga tapak dara

No	Jenis Bakteri	Diameter Daerah Hambat (mm)		
		Ekstrak Sampel tapak dara (10 μ L)	Tetrasiklin (kontrol positif) (30 μ g)	Akuades (kontrol negatif) (10 μ L)
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	13,1 mm	25,4 mm	6,0 mm
2	<i>Escherichia coli</i>	10,3 mm	28,1 mm	6,0 mm

KESIMPULAN

Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam jamur endofit dari daun tapak dara (*Catharanthus roseus (L.)*) ada 5,yaitu : 3',4',5',5',7,8-Hexa methoxy flavone, Cissogenin, Feralolide, Fibleucin, Kansuiphorin D. Jamur endofit dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

PUSTAKA

- Agoes, G. 2007. *Teknologi Bahan Alam*. ITB Press. Bandung.
- Ahara. 2011. *Tumbuhan lengka Indonesia*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi. LIPI. Balai Penelitian Botani. Herbarium Bogoriense. Bogor. Indonesia.
- Anonim, 2009. *Biologi dan Kimia Jamur Endofit*. ITB Press. Bandung.
- Ardrey, E.R. 2003. *Liquid Chromatography- Mass Spectrometry: An Introduction*. John Wiley & Sons Ltd.
- Arifuddin M, mahfuzun Bone, Iswahyudi, Arsyik Ibrahim, La Ode Rijai. 2017. *Isolasi dan karakterisasi fungi endofit tanaman tapak dara (catharanthus roseus)*. J.Trop.Pharm. Chem. **Vol 4**. No 1. Samarinda
- Banwart, G.J. 1981. *Basic Food Microbiology*. AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut. 519 p.
- Dalimartha, W. 2007. *Senyawa bioaktif Fungi Endofit Akar kuning (Fibraurea chloroleuca Miers) sebagai senyawa antimikroba*. Tesis. Sekolah Pascasarjana UGM.
- Dewi, T. 2009. *Aneka Jamur Unggulan yang Menembus pasar*. PT.Gramedia : Jakarta.
- Dwidjosepturo. 1990. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan : Surabaya.
- Eichhorn, P. and Knepper, T.P. 2001. *Electrospray ionization mass spectrometric studies on the amphoteric surfactant cocamidopropylbetaine*. *J. Mass Spectrometry*, 36: 677-684.
- Guo, B.; Li, H.; Zhang, L. 1997. *Isolation of a fungus producing vinblastine*. *J. Yunnan Univ. (Natural Science Edition)*. **20**. 214-215.
- Hara, E. 1993. *Herbal Indonesia Berkhasiat*. Trubus Info Kit Vol 8. Harbone J.
- Harborne, N.J. 1987. *Struktur Elucidation of Bioactive Compounds Isolated from Endophytes of Alstonia Scholaris and Acmena Graveolens*. Thesis Department of Chemistry and Biochemistry. Brigham Young University.
- Ivorra, L. 1989. *Mikrobiologi Umum*. UMM Press : Malang.
- Katzung, Bertram, G. 1994. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Ed ke-6, San Fransisco : A Publishing Division of Prentice Hall.
- Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J. 2007. *Basic & Clinical Pharmacologi*, 10th Ed. New York : McGraw-Hill.
- Kemp, T. 2003. *Microbioogy Dasar*. Edisi Kelima. Jilid 1. Penerbit Erlangga : Jakarta.
- Khopkar, 2007. *Analisis Instrumen*. Pusat antar Universitas Gajah Mada.
- Kim and Sura. 1994. *The Fungi*. Academic Press. London.
- Liang, A, et al., 2004. *In vitro antioxidant studies of annona squamosa L. Leaves*. *J. Ethnopharmacol.* 91 : 171 - 175. Diakses dari <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np0704957>. Tanggal 7 Juli 2010.
- Nammi. 2003. *Budidaya Tanaman Tapak Dara*. Kanisi : Yogyakarta.
- Ola, A. R. B., Amal, H. A., Ilka, Z., Alexandra, H., Attila, M., Matthias, K., Heike, B. O., Tibor, K., Peter, Proksch., Abdessamad, D., 2014, *Absolute Configuration and Antibiotic Activity of Neosartorin from the Endophytic Fungus Aspergillus Fumigatiaffinis*, *Tetrahedron Letters.*, 55, 1020- 1023
- Petrini, J.; Jacobs, D.I.; Snoeijer, W.; Hallard, D.; Verpoorte, R. 1992. *The Cantharantus Alkaloid Pharmacognosy and biotechnology*. *Current Medicinal. Chemistry* **11**.1241-1253.
- Radji, J. 2005. *Budidaya Srikaya*. Kanisius : Yogyakarta.
- Sari, D. K. 2008. *Penapisan Antibakteri dan Inhibitor Topoisomerase I dari Xylocarpus granatum*. Tesis. Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Schmelzer, B. 2007. *Ocimum sanctum L : A Review of Phytochemical and Pharmacological Profile*. Islamic University : Bangladesh
- Silverstein, R.M., Webster, F.X. and Kiemle, D.J. 2005. *Spectrometric Identification Of Organic Compounds*. 7th Edition. State University of New York. John Wiley & Sons, Inc.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, J.F. and Crouch, S.R. 2013. *Fundamental of Analytical Chemistry*. 9th Edition. Nelson Education, Ltd.
- Strobel G., Daisy B. 2003. *Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4):491-502.
- Tjay, T. H., dan Rahardja, K. 2007. *Obat-obat Penting Khasiat, Penggunaan, dan*

- Efek-Efek Sampingnya*. Edisi ke VI. PT Elex Media Komputindo, hal. 193 : Jakarta.
- Tolambiya P., and Mathur S. 2016. *A Study on Potential Phytopharmaceuticals Assets in Catharanthus Roseus L. (Alba)*. International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research. **Vol. 5**. No. 1.
- Verpoorte., Atria Martina., Rodesia Mustika Roza. 2000. *Isolasi dan Karakterisasi Fungi Endofit Dari kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana L) Sebagai Anti Mikroba Terhadap Candida albicans, Staphylococcus aureus dan Escherichia coli*. Binawidya Pekanbaru. Indonesia.
- Yin, H.; Sun, Y.H. 2011. *Vincamine-producing endophytic fungus isolated from vinca minor*. Phytomedicine. **18**. 802-805.
- Zaifblo, C. 2009. What are endophytes, in: B. Schulz, et al.(Eds.), Soil Biology: *Microbial Root Endophytes*. Berlin : Springer-Verlag, pp. 1-13.
- Zhang, L.; Guo, B.; Li, H.; Zeng, S.; Shao, H.; Gu, S.; Wei, R. 2000. *Preliminary Study on the isolation of endophytic fungus of Catharanthus roseus and its fermentation to products of therapeutic value*. Chinese traditional and herbal and Drugs. **31**. 805-807.