

## 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<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

<sup>2</sup>Pusat 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, Kielselgel 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 (Trypton 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

media. Apabila terjadi hambatan pertumbuhan (*growth inhibition zones*) terhadap *B. subtilis*, maka akan terlihat zona bening pada tempat-tempat tertentu sepanjang ekstrak bermigrasi pada lempengan kromatogram yang menandakan adanya aktivitas dari senyawa-senyawa yang telah terpisah. Nilai  $R_f$  dari tiap zona hambatan pertumbuhan diukur dengan membagi antara jarak zona dengan jarak batas pelarut, yang diukur dari tempat ekstrak diteteskan atau titik awal.

**Deteksi Senyawa Aktif dengan Pereaksi Pembentuk Warna dan Sinar Ultraviolet.** Hasil bioautografi di atas kemudian dicocokkan dengan hasil pereaksi pembentuk warna dan dengan hasil penyinaran dengan sinar ultraviolet pada lempengan kromatogram yang lain. Untuk itu lempengan tersebut disemprot merata pada permukaannya dengan pereaksi diantaranya pereaksi vanillin-asam sulfat (Krebs *et al.* 1969). Lempengan dipanaskan pada oven bersuhu 120 °C hingga timbul warna yang jelas pada bercak yang mempunyai  $R_f$  yang sama dengan  $R_f$  zona bening dari hasil bioautografi. Penyinaran kromatogram dapat dilakukan pada lempengan yang sama tetapi sebelum disemprot pereaksi warna. Bercak tertentu akan berfluoresens

## HASIL

**Senyawa Aktif dari *Lentinus tropis*.** Berbagai jenis *Lentinus tropis* yang telah disebutkan terdahulu dan dianalisis dalam penelitian ini dengan *B. subtilis*, masing-masing paling sedikit menghasilkan lebih dari satu senyawa antimikrob yang diisolasi baik dari filtrat kultur maupun miselium. Bahkan dari satu sumber, seperti dari miselium saja dapat diperoleh lebih dari satu senyawa antimikrob (Tabel 1). Tidak semua sumber ekstrak dianalisis dengan bioautografi, seperti pada *L. squarrosulus* 55A, ekstrak miselium tidak dianalisis karena berdasarkan uji aktivitas dengan metode cakram kertas tidak memberikan hasil yang menjanjikan (hasil uji aktivitas tidak dipublikasikan).

**Bioautografi.** Lokasi senyawa-senyawa antimikrob pada kromatogram, dinyatakan dalam nilai  $R_f$ , berpencah dengan tiga variasi lokasi. Variasi pertama berkisar pada  $R_f$  0.73-0.83, variasi kedua 0.45-0.61 dan variasi ketiga 0.17. Sebagai contoh hasil bioautografi ekstrak kasar filtrat kultur *L. squarrosulus*

55A (Gambar 2 & 3a). Ekstrak ini menghasilkan tiga senyawa antimikrob yang berbeda, yaitu senyawa dengan  $R_f$  masing-masing 0.75, 0.50, dan 0.17. Apabila nilai  $R_f$  hasil bioautografi ini dibandingkan dengan nilai  $R_f$  hasil reaksi kimia dan dengan  $R_f$  hasil penyinaran kromatogram dengan sinar ultraviolet maka dapat diketahui langsung sifat senyawa aktif (Gambar 2).

Ketiga zona hambatan pertumbuhan tersebut mengandung senyawa yang bereaksi positif dengan vanillin-asam sulfat, yang memberikan warna ungu ( $R_f$  0.75) dan abu-abu ( $R_f$  0.50 dan  $R_f$  0.17) (Tabel 1).

Ketiga cara deteksi senyawa aktif yaitu metode bioautografi, reaksi kimia dan penyinaran dengan sinar ultraviolet akan memberikan hasil yang optimum apabila ekstrak yang dianalisis adalah ekstrak yang telah dimurnikan, seperti yang diperlihatkan oleh ekstrak filtrat kultur *L. squarrosulus* 55A pada Gambar 3b, c, dan d yang terdiri dari hanya dua senyawa ( $R_f$  0.75 dan  $R_f$  0.50) yang telah mengalami proses purifikasi (tahap purifikasi tidak dijelaskan). Kedua senyawa tersebut memberikan hasil reaksi yang positif terhadap pereaksi vanillin-asam sulfat (Gambar 3c), sama seperti hasil dari ekstrak kasarnya (Tabel 1) dan kedua senyawa tersebut berfluoresens di bawah sinar ultraviolet pada  $\lambda = 366$  nm dengan jelas (Gambar 3d). Pereaksi vanillin-asam sulfat merupakan pereaksi kimia umum. Senyawa-senyawa alkohol, fenol, steroid, dan minyak esensial bereaksi positif dengan pereaksi ini. Untuk mengetahui lebih lanjut sifat-sifat senyawa antimikrob tersebut maka dapat digunakan pereaksi kimia yang lebih spesifik.

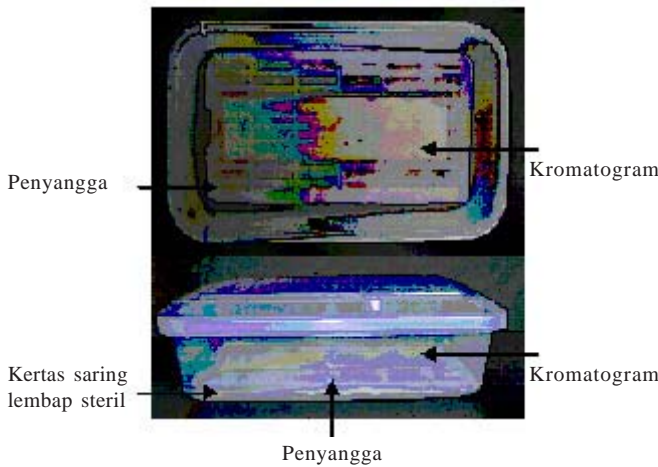
Kadangkala zona hambatan pertumbuhan pada kromatogram hasil bioautografi tidak cukup kontras dengan sekelilingnya. Oleh karena itu Begue dan Kline (1972) menyarankan penggunaan garam tetrazolium yang disemprotkan ke kromatogram yang telah diberi perlakuan bioautografi. Pada penelitian ini keadaan tersebut dapat diatasi dengan cara pengeringan kromatogram, seperti pada bioautografi ekstrak kasar miselium *L. cladopus* LC4 yang telah dikeringudarkan (Gambar 4). Lapisan agar-agar yang mengering menjadi lapisan tipis yang tetap menempel pada kromatogram. Ketiga zona hambatan pertumbuhan mempunyai nilai  $R_f$  masing-masing 0.83, 0.73, dan 0.60 (Tabel 1).

Tabel 1. Jumlah dan lokasi senyawa antimikrob dari berbagai jenis *Lentinus tropis* yang dianalisis dengan metode bioautografi dan metode kimia

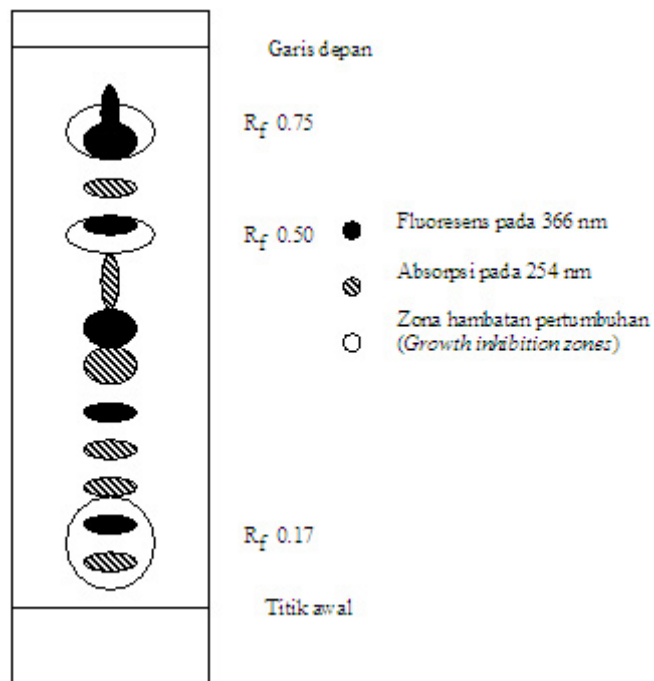
| Jenis <i>Lentinus</i>      | Bahan ekstrak | Jumlah zona hambatan pertumbuhan<br>( <i>Growth inhibition zones</i> ) | $R_f$ zona hambatan pertumbuhan<br>( <i>Growth inhibition zones</i> ) | Pereaksi pembentuk warna<br>Vanillin-asam sulfat |                   |
|----------------------------|---------------|--|---|--|-------------------|
| <i>L. squarrosulus</i> 55A | Filtrat       | 3  | 0.75  | Positif (ungu)                                   |                   |
|                            |               |  | 0.50  | Positif (abu-abu)                                |                   |
|                            |               |  | 0.17  | Positif (abu-abu)                                |                   |
| <i>L. sajor-caju</i> LSC8  | Miselium      | 2  | 0.77  | Positif (ungu muda)                              |                   |
|                            |               |  | 0.54  | Negatif  |                   |
| <i>L. torulosus</i> LU3    | Miselium      | 2  | 0.77  | Positif (abu-abu)                                |                   |
|                            |               |  | 0.48  | Negatif  |                   |
| <i>L. cladopus</i> LC6     | Filtrat       | 1  | 0.76  | Positif (abu-abu)                                |                   |
|                            |               |  | Miselium  | 0.79   | Positif (abu-abu) |
|                            |               |  |   | 0.54   | Negatif           |
| <i>L. cladopus</i> LC4     | Filtrat       | 3  | 0.75  | Positif (abu-abu)                                |                   |
|                            |               |  | 0.61  | Positif (abu-abu)                                |                   |
|                            |               |  | 0.45  | Positif (abu-abu muda)                           |                   |
|                            | Miselium      | 3  | 0.83  | Positif (biru kehitaman)                         |                   |
|                            |               |  | 0.73  | Negatif  |                   |
|                            |               |  | 0.60  | Negatif  |                   |

**PEMBAHASAN**

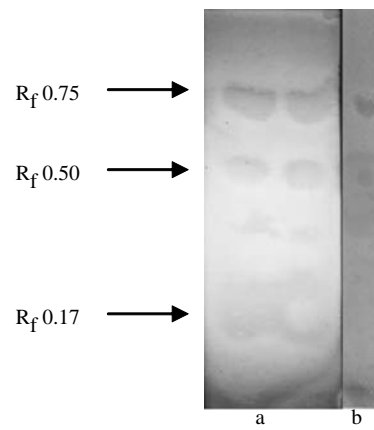
*Lentinus tropis* berdasarkan analisis bioautografi dan uji aktivitas dengan metode cakram kertas (Sudirman *et al.* 1996) ternyata berpotensi sebagai sumber penghasil senyawa antimikrob. Senyawa antimikrob dari *Lentinus* dapat diisolasi dari filtrat kultur, sel (miselium), dan dari tubuh buah (Sudirman & Adijuwana 2000). Penelitian potensi *Lentinus* spesies tropis baik sebagai penghasil senyawa antimikrob maupun sebagai penghasil metabolit penting lainnya masih belum banyak dilakukan. Di alam, *Lentinus* ternyata tidak mudah ditemukan kecuali *L. squarrosulus* dan *L. sajor-caju*.



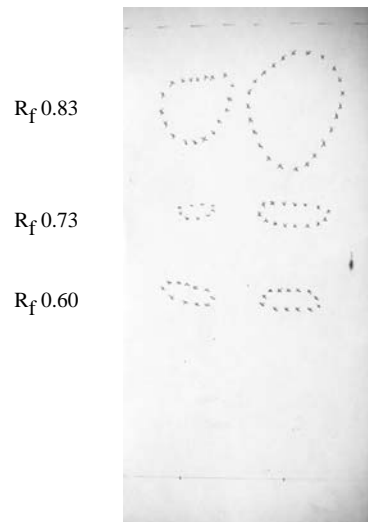
Gambar 1. Metode bioautografi. Kotak digunakan untuk menginkubasi kromatogram yang telah dilapisi dengan media yang mengandung mikroba uji.



Gambar 2. Gambar skematik kromatografi lapis tipis gel silika ekstrak kasar filtrat kultur *Lentinus squarrosulus* 55A, bioautografi dan penyinaran kromatogram dengan  $\lambda=366$  nm dan 254 nm. Pelarut: *n*-butanol-asam asetat-air (3:1:1).



Gambar 3. Bioautografi ekstrak kasar (a) dari filtrat kultur *Lentinus squarrosulus* 55A dengan *Bacillus subtilis* menghasilkan tiga zona hambatan pertumbuhan (ZHP), zona dengan R<sub>f</sub> 0.75, R<sub>f</sub> 0.50, dan R<sub>f</sub> 0.17. Bioautografi ekstrak yang telah dimurnikan (b) menghasilkan dua ZHP, zona dengan R<sub>f</sub> 0.75 dan R<sub>f</sub> 0.50 serta penampakan ke dua senyawa tersebut dengan pereaksi vanillin-asam sulfat (c) dan sinar ultraviolet pada  $\lambda=366$  nm (d).



Gambar 4. Bioautografi ekstrak miselium *Lentinus cladopus* LC4 dengan *Bacillus subtilis* memperlihatkan tiga zona hambatan pertumbuhan (ZHP). Kromatogram dikeringanginkan dan ZHP diberi tanda dengan pena.

Bercak-bercak yang timbul pada kromatogram dengan R<sub>f</sub> yang berbeda dapat terdiri dari senyawa antimikrob dan senyawa pengotor. Bioautografi yang dilakukan terhadap kromatogram tersebut bertujuan untuk mengetahui bercak mana yang merupakan senyawa antimikrob. Bercak yang menimbulkan zona hambatan pertumbuhan terhadap *B. subtilis*, merupakan senyawa antimikrob sedangkan bercak yang tidak menimbulkan zona hambatan pertumbuhan merupakan senyawa pengotor atau senyawa aktif yang tidak terdeteksi dengan *B. subtilis*. Pada penelitian ini setiap ekstrak dari *Lentinus tropis* baik ekstrak dari miselium maupun ekstrak dari filtrat kultur, menghasilkan banyak bercak yang menimbulkan zona hambatan pertumbuhan terhadap *B. subtilis*. Jadi secara langsung melalui metode bioautografi



dapat diketahui berapa banyak senyawa aktif yang dapat diisolasi dari setiap isolat *Lentinus* tropis. Pada umumnya satu mikroba dapat menghasilkan banyak senyawa aktif, seperti cendawan *Tolypocladium niveum* dapat menghasilkan lima senyawa antibiotik peptida, efrapeptin C, D, E, F, dan G (Nagaraj *et al.* 2001), demikian juga cendawan serangga *Beauveria brongniartii* dapat menghasilkan senyawa antibiotik *beauvericin* dan *oosporine* (Strasser *et al.* 2000). Bahkan *Streptomyces hygrosopicus* dapat menghasilkan 58 antibiotik yang berbeda (Breton *et al.* 1989).

Pencarian senyawa antimikrob baru biasanya didahului dengan penapisan tahap pertama, yaitu uji antagonis isolat-isolat terhadap mikroba uji dengan metode konfrontasi di media agar-agar di cawan Petri. Isolat yang berpotensi kemudian diuji lebih lanjut dengan menumbuhkan isolat pada media cair. Pada tahap ini sumber ekstrak dapat berasal dari filtrat kultur atau sel. Filtrat kultur dapat diuji langsung pada media agar-agar di cawan Petri dengan metode sumur atau dapat diekstrak terlebih dahulu, demikian juga dengan sel yang harus diekstrak terlebih dahulu sebelum diuji dengan metode cakram kertas. Penapisan tahap ketiga ialah untuk mengetahui sifat-sifat awal dari senyawa-senyawa antimikrob tersebut. Untuk itu perlu dilakukan purifikasi atau pemisahan senyawa aktif dari senyawa aktif yang lain atau dari senyawa pengotor yang ada. Pada tahap inilah metode deteksi senyawa antimikrob, yaitu bioautografi, reaksi pembentuk warna dan penyinaran dengan sinar ultraviolet digunakan sebagai pelacak. Ketiga metode deteksi tersebut sangat berperan dalam setiap tahap purifikasi, selain untuk mengetahui tingkat kemurnian senyawa-senyawa yang ingin dipisahkan, juga untuk mengetahui keberadaannya yang mungkin karena proses purifikasi mengalami perubahan sehingga menjadi tidak aktif. Metode bioautografi selain dapat digunakan untuk mengetahui perkiraan jumlah senyawa antimikrob yang terkandung dalam ekstrak kasar yang diuji, metode ini juga berguna untuk melihat hasil pemisahan dua senyawa antimikrob yang mempunyai sifat kepolaran yang sangat dekat sehingga sangat sulit dipisahkan (Sudirman 1992). Metode bioautografi sebenarnya telah dilakukan oleh banyak peneliti sebelumnya dengan cara yang berbeda tetapi dengan prinsip yang sama (Mackeen *et al.* 2001; Pessini *et al.* 2003). Suwandhi (1993) menggunakan gel hasil elektroforesis sebagai kromatogram yang akan dibioautografi. Gel diletakkan di cawan Petri yang selanjutnya dilapisi dengan media agar-agar yang mengandung mikroba uji. Metode bioautografi juga dapat dilakukan pada kromatografi kertas (Betina 1973; Rosner & Aviv 1980) atau pada kromatografi lapis tipis dengan penjerap yang berbeda, seperti aluminium, poliamid dan lain-lain (Billow & Speaker 1972).

Metode bioautografi sebenarnya dapat menggunakan mikroba lain selain *B. subtilis* yang sensitif. Metode bioautografi dengan khamir *Rhodotorula mucilaginosa* pernah dilakukan terhadap ekstrak kasar filtrat kultur *L. squarrosulus* 55A dan ternyata zona hambatan pertumbuhan hanya terdapat pada senyawa dengan  $R_f = 0.17$ , sedangkan pada bercak dengan  $R_f 0.75$  dan  $R_f 0.50$  tidak terbentuk zona hambatan pertumbuhan terhadap *R. mucilaginosa*, akan tetapi

terbentuk zona hambatan pertumbuhan terhadap *B. subtilis* (Sudirman 1992). Hal yang sama juga dilakukan terhadap ekstrak kasar miselium dari *L. cladopus* LC4 yang dibioautografi dengan *Xanthomonas campestris*. Percobaan yang terakhir ini tidak berhasil, artinya tidak ditemukan zona hambatan pertumbuhan pada kromatogram, bahkan bakteri tersebut tidak tumbuh, kecuali pada kromatogram kontrol. Hal ini disebabkan antara lain karena aktivitas ekstrak miselium dari *L. cladopus* LC4 ini sangat kuat pada uji dengan metode cakram kertas, yaitu menghasilkan besar zona hambatan pertumbuhan yang hampir seluas cawan Petri (Sudirman 2003). Sedangkan metode bioautografi lebih sensitif dibandingkan metode uji aktivitas lainnya (Rosner & Aviv 1980). Bioautografi juga dapat dilakukan dengan menggunakan zoospora cendawan *Phytophthora capsici*, *P. megasperma*, dan *Pythium aphanidermatum* yang telah menjadi sista sebagai mikroba uji (Lazarovits *et al.* 1982).

Berdasarkan hasil penelitian ini dan hasil uji aktivitas yang dilakukan sebelumnya maka *L. cladopus* LC4 dipilih untuk diteliti lebih lanjut, karena lebih berpotensi dibandingkan isolat *Lentinus* tropis lainnya yang diuji pada penelitian ini. Walaupun demikian, isolat-isolat tersebut masih berpeluang untuk dikembangkan selain sebagai sumber senyawa antimikrob, juga dapat dikembangkan untuk penghasil enzim karena memiliki sifat lignolitik. Ekstrak miselium *L. cladopus* LC4 selanjutnya dimurnikan dengan metode kromatografi lapis tipis preparatif. Pita penjerap yang dikerok adalah pita yang sesuai dengan nilai  $R_f$  dari hasil bioautografi sebelumnya. Pemurnian dapat dilakukan beberapa kali dengan metode yang sama atau dengan metode lain, seperti kromatografi kolom atau kromatografi cair kinerja tinggi. Apabila senyawa murni telah diperoleh cukup banyak maka senyawa tersebut dapat dianalisis lebih lanjut sehingga dapat ditentukan sifat dan struktur molekulnya melalui metode spektroskopi antara lain spektroskopi ultraviolet dan spektrum tampak, infra merah, massa, dan resonansi magnet inti (Harbone 1987).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, Dirjen DIKTI yang telah memberi dana dan kesempatan melalui Proyek Hibah Bersaing IV. Penulis ucapkan terima kasih juga kepada Iwa sebagai teknisi Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia, Pusat Studi Ilmu Hayati, Institut Pertanian Bogor yang membantu dalam penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abraham W, Abate D. 1995. Chromanones from *Lentinus crinitus* (Basidiomycetes). *Z Naturforsch* 50:748-750.
- Anchel M, Hervey A, Kavanagh F, Polatnick J, Robbins WJ. 1948. Antibiotic substances from Basidiomycetes III. *Caprinus similis* and *Lentinus degener*. *Proc Nat Acad Sc USA* 34:498-502.
- Begue WJ, Kline RM. 1972. The use of tetrazolium salts in bioautographic procedures. *J Chromatogr* 64:182-184.
- Betina V. 1964. Bioautographic detection of antibiotics in preparative thin-layer chromatography. *J Antibiot* 17:127-128.

- Betina V. 1973. Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J Chromatogr* 78:41-51.
- Billow J, Speaker TJ. 1972. Bioautography of antibiotic compounds: a simplification and improvement. *J Chromatogr* 67:191-192.
- Breton A, Theilleux J, Sanglier JJ. 1989. Organismes producteurs: biologie, taxonomie et ecologie. Di dalam: Larpent JP, Sanglier JJ (ed). *Biotechnologie des Antibiotiques*. Paris: Masson. hlm 33-70.
- Delmas J. 1989. *Les Champignons et Leur Culture*. Paris: La Maison Rustique.
- Espenshade MA, Griffith EW. 1966. Tumor-inhibiting Basidiomycetes and cultivation in the laboratory. *Mycologia* 58:511-517.
- Gross B, Asther M. 1989. Aromas from Basidiomycetes: characteristics, analysis, and production. *Sci Aliments* 9:427-454.
- Harbone JB. 1987. *Metode Fitokimia*. Padmawinata K, Soediro I (penerjemah). Bandung: Penerbit ITB.
- Ikekawa T, Iwami F, Akita E, Umezawa H. 1963. Application of thin layer chromatography for separation and identification of antibiotics. *J Antibiot* 16:56-57.
- Jassbi AR, Zamanizadehnajari S, Azar PA, Tahara S. 2002. Antibacterial diterpenoids from *Astragalus brachystachys*. *Z Naturforsch* 57c: 1016-1021.
- Krebs KG, Heusser D, Wimmer H. 1969. Spray Reagents. Di dalam: Stahl E (ed). *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*. Berlin: Springer-Verlaag. hlm 855-911.
- Lauer U, Anke T, Hansske F. 1991. Antibiotics from basidiomycetes XXXVIII. 2-Methoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone, a thromboxane-A2 receptor-antagonist from *Lentinus adhaerens*-antiaggregant production by fermentation. *J Antibiot* 44:59-65.
- Lazarovits G, Brammall RA, Ward EWB. 1982. Bioassay of fungitoxic compounds on thin-layer chromatograms with *Pythium* and *Phytophthora* species. *Phytopathology* 72:61-63.
- Lopes MN, Oliveira AC, Young MCM, Bolzani VS. 2004. Flavonoids from *Braquiata* (Rubiaceae). *J Braz Chem Soc* 15:468-471.
- Mackeen MM et al. 2001. Antifungal garcinia acid esters from the fruits of *Garcinia atroviridis*. *Z Naturforsch* 57c:291-295.
- Moreira IC, Lago JHG, Young MCM, Roque NF. 2003. Antifungal aromadendrane sesquiterpenoids from the leaves of *Xylopi brasiliensis*. *J Braz Chem Soc* 14:828-831.
- Nagaraj G, Uma MV, Shivayogi MS, Balaram H. 2001. Antimalarial activities of peptide antibiotics isolated from fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 45:145-149.
- Ohta A, Shimada M, Hattori T, Higuchi T, Takakhasi M. 1990. Production of secondary metabolites including a new metabolites p-methoxyphenylpropanol by the brown-rot fungus *Lentinus lepideus*. *Mokuzai Gakkaishi* 36:225-231.
- Pegler DN. 1983. *The Genus Lentinus: A World Monograph*. London: HMSO.
- Pereira AS, Bicalho B, Neto FRA. 2003. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie* 34:291-298.
- Pessini GL, Filho BPD, Nakamura CV, Cortez DAG. 2003. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:1115-1120.
- Rosner A, Aviv H. 1980. Gentamicin bioautography assay vs. the microbiological disk test. *J Antibiot* 33:600-603.
- Strasser H, Abendstein D, Stuppner H, Butt TM. 2000. Monitoring the distribution of secondary metabolites produced by the entomogenous fungus *Beauveria brongniartii* with particular reference to oosporein. *Mycol Res* 104:1227-1233.
- Sudirman LI. 1992. Purification et recherche de la structure d'antibiotiques de *Lentinus squarrosulus* actifs contre *Rigidoporus lignosus*, a parasite de l'hevea [Disertasi]. Prancis: Faculte de Science, Universite de Nancy I.
- Sudirman LI. 2000. Medicinal and edible mushrooms from the mining area of west Papua in Indonesia. *Abstract Asian Mycological Congress*; Hong Kong SAR, 9-13 Jul 2000. hlm 112.
- Sudirman LI. 2003. Potentiality of mycelial extract of *Lentinus cladopus* LC4 in plant diseases suppression. Di dalam: *Proceedings of the 2nd International Conference on Medicinal Mushroom and the International Conference on Biodiversity and Bioactive Compounds*. Pattaya, 17-19 Jul 2003. hlm 375-382.
- Sudirman LI, Adijuwana H. 2000. Tropical *Lentinus* as a source of antimicrobial compounds. *Abstract Asian Mycological Congress*; Hong Kong SAR, 9-13 Jul 2000. hlm 27.
- Sudirman LI, Iraqi Housseini AI, Lefebvre G, Kiffer E, Botton B. 1992. Screening of some basidiomycetes for biocontrol of *Rigidoporus lignosus*, a parasite of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Mycol Res* 96:621-625.
- Sudirman LI, Lefebvre G, Kiffer E, Botton B. 1994. Purification of antibiotics produced by *Lentinus squarrosulus* and preliminary characterization of a compound active against *Rigidoporus lignosus*. *Curr Microbiol* 29:1-6.
- Sudirman LI, Setiawati D, Adijuwana H, Hazra F. 1996. Prospects of *Lentinus* spp native to Indonesia for the production of antimicrobial compounds. *Abstract Asian International Mycological Congress '96*; Chiba, 3-5 Jul 1996. hlm 65.
- Suwandhi IS. 1993. Etude des bacteriocines a activite anti-*Listeria*, produites par *Leuconostoc mesenteroides* var. *mesenteroides* FR52 et *Lactobacillus curvatus* SB13 [Disertasi]. Prancis: Ecole Nationale Superieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Wallhauser KH. 1969. *Antibiotics*. Di dalam: Stahl E (ed). *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*. Berlin: Springer-Verlaag. hlm 566-577.