

**POTENSI EKSTRAK *Lentinus cladopus* LC4 SEBAGAI PENGENDALI
PATOGEN BISUL BAKTERI PADA KEDELAI**

**POTENTIALITY OF *Lentinus cladopus* LC4 EXTRACT AS SOYBEAN
BACTERIAL PUSTULE PATOGEN CONTROL**

Iswati, R.¹⁾, L. I. Sudirman¹⁾, H. Adijuwana¹⁾ dan B. Tjahjono²⁾

¹⁾ PAU Ilmu Hayat IPB Bogor

²⁾ Faperta IPB Bogor

ABSTRACT

Exploiting mushrooms producing antimicrobial substances for controlling plant diseases is begin to be attended when the pollution issues by using chemical pesticides have been increased. In connecting with the issues, the ability of methanol crude extract isolated from mycelium and fruiting body of *Lentinus cladopus* LC4 against *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* had been tested by paper disc assay method. The activity of both extracts showed strong inhibition and for each of that is about 80 AU/ml and 40 AU/ml respectively. The crude extracts have high solubility in the polar solvents and still inhibit the bacterial growth after heating on 100°C for 10 minutes and non toxic to host plant after 8 times of dilution. According to bioautographic detection on silica gel thin-layer chromatograms with *Bacillus subtilis*, mycelial crude extract contains 3 active separated substances with the values of Rf are about 0.6, 0.72, and 0.83, but the crude extract of fruiting body contains 2 active separated substances with the values of Rf are about 0.63 and 0.86. The work is in progress on purification of the substances and activity test *in vitro* and *in vivo*.

Key words : *Lentinus cladopus*, mycelial extract, fruiting bodies extract, *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*

ABSTRAK

Pemanfaatan jamur penghasil senyawa antimikrob yang dapat menghambat pertumbuhan patogen tanaman mulai mendapat perhatian sejak meningkatnya isu pencemaran lingkungan akibat penggunaan pestisida sintetik. Sehubungan dengan itu kemampuan ekstrak kasar metanol dari miselium dan tubuh buah *Lentinus cladopus* LC4 telah diuji terhadap *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* dengan metode cakram kertas. Hasil uji aktivitas kedua macam ekstrak menunjukkan daya hambat yang kuat. Aktivitas ekstrak kasar miselium dan tubuh buah terhadap *X. campestris* pv. *glycines* masing-masing sebesar 80 AU/ml dan 40 AU/ml. Ekstrak kasar miselium maupun tubuh buah *L. cladopus* mempunyai kelarutan yang tinggi pada pelarut polar dan masih aktif menghambat pertumbuhan bakteri setelah dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit serta tidak bersifat toksik terhadap tanaman inang sampai pengenceran 8 kali. Berdasarkan uji bioautografi pada kromatografi lapis tipis silika gel terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, ekstrak kasar miselium mengandung 3 senyawa aktif yang terpisah dengan nilai Rf 0,6; 0,72 dan 0,83 sedangkan ekstrak kasar tubuh buah mengandung 2 senyawa aktif yang terpisah dengan nilai Rf 0,63 dan 0,86. Untuk selanjutnya sedang dilakukan purifikasi dan pengujian senyawa aktif baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

Kata kunci : *Lentinus cladopus*, ekstrak miselium, ekstrak tubuh buah, *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*

PENDAHULUAN

Kedelai merupakan komoditi penting sebagai sumber protein nabati utama di Indonesia. Kebutuhan kedelai semakin meningkat seiring dengan peningkatan kesadaran masyarakat tentang nilai gizi makanan serta meningkatnya diversitas makanan yang berbahan dasar kedelai. Namun kebutuhan tersebut belum dapat dipenuhi hanya dengan mengandalkan produksi kedelai dalam negeri yang masih rendah. Salah satu kendala produksi yang dihadapi adalah rendahnya produktivitas kedelai akibat serangan patogen penyebab penyakit busuk bakteri yaitu *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. Patogen tersebut dapat menurunkan hasil hingga 41% dan penurunan ini tergantung pada kondisi lingkungan (Prathuangwong dan Choochoa, 1988).

Cara pengendalian yang paling banyak dipilih adalah menggunakan pestisida sintetik. Pengendalian penyakit tanaman dengan pestisida sintetik mempunyai beberapa keuntungan antara lain aplikasinya sangat mudah, hasil pengendalian cepat dapat dilihat, akan tetapi menyebabkan kerusakan lingkungan sebagai akibat residu yang ditinggalkan maupun sifat toksiknya yang kurang selektif. Berdasarkan alasan terakhir tersebut maka pengendalian alternatif dengan memanfaatkan bahan kimia yang merupakan produk alami sebagai biopestisida mulai banyak mendapat perhatian baik yang berasal dari tanaman tingkat tinggi maupun tingkat rendah.

Jamur atau cendawan dilaporkan dapat menghasilkan produk alami atau senyawa antimikrob yang mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain baik cendawan, bakteri maupun virus (Sinha, *et. al.*, 1988; Aoki, *et. al.* 1997).

Beberapa spesies *Lentinus* telah diketahui sebagai penghasil senyawa antimikrob yang diekskresikan baik secara ekstraseluler maupun intraseluler dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme penyebab penyakit pada manusia maupun tanaman (Sudirman, *et.al.*, 1997). Deteksi awal antagonisme ekstrak miselium *L. cladopus* terhadap beberapa patogen yakni *B. subtilis*, *E. coli*, *X. campestris* dan jamur *R. lignosus* telah dilaporkan oleh Wage (1998) sedangkan Dwiyana (1999) telah mengungkapkan daya hambat ekstrak tubuh buah jamur *L. sajor-caju* terhadap bakteri *B. subtilis* dan *E. coli* serta jamur *R. lignosus*. Ekstrak filtrat *L. squarosulus* juga dilaporkan dapat menghambat jamur tersebut di atas (Sudirman, *et.al.*, 1992)

Melihat potensi *Lentinus* tersebut dan dikaitkan dengan pencarian pengendali patogen tanaman yang bersifat ramah lingkungan maka penelitian terhadap *L. cladopus* di

lanjutkan. Untuk itu kemampuan ekstrak miselium dan tubuh buah *L. cladopus* diuji *in vitro* dan *in vivo* terhadap patogen bisul bakteri pada kedelai. Disamping itu dilakukan karakterisasi senyawa aktifnya.

BAHAN DAN METODE

Peremajaan Isolat Jamur dan Bakteri

Biakan jamur yang digunakan merupakan isolat *L. cladopus* LC4 yang merupakan koleksi Dr. Lisdar I. Sudirman, Laboratorium Biokimia dan Sumber Hayati PAU Ilmu Hayat IPB. Bakteri indikator yang digunakan adalah *B. subtilis* diperoleh dari laboratorium yang sama dan *X. campestris* pv. *glycines* isolat YR 32 merupakan koleksi Rukayadi, Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia PAU Bioteknologi IPB.

Isolat jamur *L. cladopus* LC4 diremajakan pada medium agar Ekstrak Malt Pepton (EMP) (Smith and Onions, 1994). Isolat murni bakteri *X. campestris* pv. *glycines* YR 32 diremajakan pada medium LA (DIFCO, 1997) dan *B. subtilis* pada medium TGY (Haynes, 1955). Jamur dan *B. subtilis* diinkubasi pada suhu 35° C sedangkan *X. campestris* pv. *glycines* pada suhu 28°C dalam keadaan gelap.

Produksi dan Ekstraksi Miselium dan Tubuh Buah *Lentinus cladopus* LC4

Lima buah inokulum berdiameter 3 mm dan berumur 5 hari yang merupakan hasil peremajaan, ditumbuhkan pada permukaan 500 ml medium Ekstrak Malt Cair yang mengandung pepton 0,5% (EMPC) dalam gelas Erlenmeyer 1000 ml. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 35°C dalam keadaan statik selama 30 hari. Miselium berumur 30 hari dipisahkan dari filtratnya kemudian dihaluskan dengan mortar dan diekstraksi dengan metanol teknis masing-masing sebanyak 100 ml. Larutan hasil ekstrak dipekatkan dengan rotary evaporator dalam kondisi vakum dengan suhu bak 40°C kemudian dikeringudarkan dengan kompresor. Ekstrak kering dari 20 kultur kemudian dilarutkan kembali dengan 3 ml metanol

Tubuh buah yang tumbuh pada medium serbuk gergaji (Rao, 1982) dipanen dan dikeringkan pada suhu 35°C, dihaluskan dengan alat *mild grinder*. 60 gr serbuk tubuh buah diekstraksi tiga kali dengan metanol dengan konsentrasi masing-masing 10%, selanjutnya sama seperti langkah kerja pada miselium.

Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Miselium dan Tubuh Buah dengan Metode Cakram Kertas

Uji aktivitas ekstrak kasar terhadap *X. campestris* pv. *glycines* dilakukan pada medium LA $\frac{1}{2}$ (Wage, 1998). Delapan puluh μ l suspensi berumur 48 jam pada media cair LA (LB) diinokulasi ke dalam 100 ml medium LA $\frac{1}{2}$ kemudian dituangkan ke dalam 10 cawan petri.

Ekstrak miselium maupun tubuh buah diteteskan pada cakram kertas berdiameter 13 mm sebanyak 100 μ l dan disterilisasi dengan sinar UV selama 15 menit. Sebagai kontrol, cakram kertas ditetesi metanol. Pada masing-masing cawan petri tersebut di atas diletakkan satu cakram kertas yang mengandung ekstrak dan satu kontrol. Sebelum diinkubasi pada suhu 28 $^{\circ}$ C selama 48 jam, cawan uji terlebih dahulu diinkubasi selama 3 sampai 4 jam pada suhu 10 $^{\circ}$ C. Hambatan pertumbuhan diukur dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk di sekitar cakram kemudian dikoreksi dengan diameter cakram kertas.

Uji Kelarutan

Ekstrak kasar miselium maupun tubuh buah sebanyak 100 μ l dikeringkan pada desikator selama 2 hari. Masing-masing dilarutkan kembali dengan beberapa pelarut mulai dari yang polar sampai non polar. Besarnya kelarutan diukur berdasarkan aktivitas senyawa aktif yang larut dan diuji dengan metode cakram kertas. Diameter zona hambatan menggambarkan kelarutan senyawa aktif.

Uji Toksisitas Ekstrak Terhadap Tanaman Kedelai

Uji ekstrak pada tanaman kedelai dilakukan pada tanaman pot di rumah kaca. Enam daun kedelai berumur 21 hari diolesi dengan ekstrak miselium atau tubuh buah dalam berbagai konsentrasi yang dilarutkan dalam air. Untuk itu ekstrak diencerkan mulai dari dua sampai delapan kali.

Uji Stabilitas terhadap Suhu

Sebanyak 100 μ l ekstrak miselium maupun tubuh buah dipanaskan pada suhu 100 $^{\circ}$ C selama 10 menit. Ekstrak dilarutkan kembali dengan metanol kemudian diuji dengan metode cakram kertas dan zona hambatan yang terbentuk diukur.

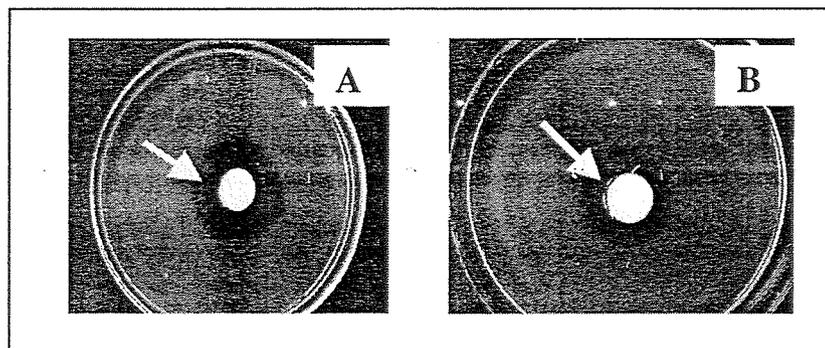
Uji Bioautografi

Uji bioautografi dilakukan untuk penentuan spot yang aktif (Sudirman, *et. al.*, 1994). Uji ini diawali dengan pembuatan kromatogram ekstrak miselium maupun tubuh buah pada plat silika gel (Merck 5715). Ekstrak kasar miselium atau tubuh buah sebanyak 10 μ l ditetaskan pada plat kemudian dielusi dengan menggunakan sistem pelarut butanol : asam asetat : air (3:1:1). Kromatogram ekstrak tubuh buah maupun miselium diinokulasi dengan *B. subtilis* yang sebelumnya telah diinokulasikan ke dalam medium TGY ½ (Sudirman, *et. al.*, 1994). Kultur kemudian diinkubasi selama 3-4 jam pada suhu 10°C sebelum dipindahkan pada suhu 35°C selama 24 jam. Spot aktif tampak sebagai zona bening yang kemudian ditentukan nilai Rfnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Ekstrak Metanol Miselium dan Tubuh Buah

Ekstrak metanol dari miselium maupun tubuh buah *L. cladopus* LC4 menunjukkan aktivitas hambatan yang kuat baik terhadap *B. subtilis* (Sudirman, *et al.*, 1997) sebagai bakteri indikator sensitif maupun terhadap *X. campestris* pv. *glycines*, patogen pada tanaman kedelai. (Gambar 1.) Kemampuan kedua ekstrak tersebut memberikan petunjuk bahwa *L. cladopus* LC4 mampu menghasilkan senyawa antimikrob yang bersifat intraseluler selain yang bersifat ekstraseluler seperti yang telah dilaporkan sebelumnya oleh Sudirman, *et. al.* (1997).



Gambar 1. Aktivitas hambatan pertumbuhan ekstrak miselium (A) dan tubuh buah (B) *L. cladopus* LC4 terhadap bakteri *X. campestris* pv. *glycines*.

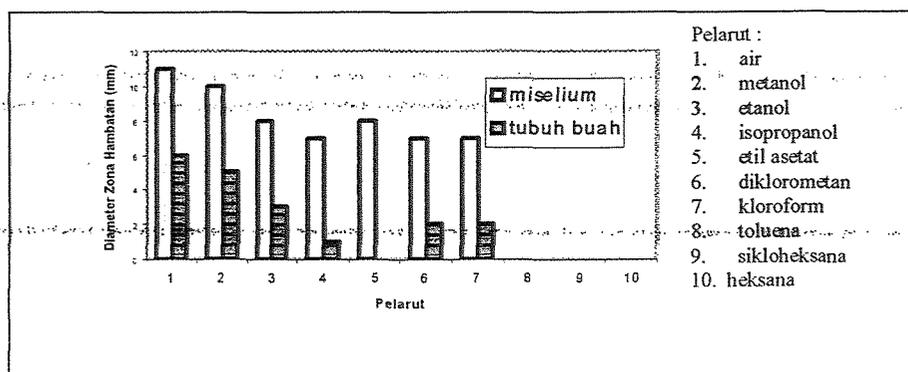
Pengujian ekstrak miselium sebanyak 100 μ l dengan pengenceran 8 kali masih menunjukkan aktivitas hambatan terhadap *X. campestris* pv. *glycines*. Hal ini berarti bahwa aktivitas antimikrob ekstrak miselium terhadap *X. campestris* pv. *glycines* adalah sebesar 80

AU/ml. Sedangkan ekstrak tubuh buah menunjukkan aktivitas hambatan sampai pengenceran 4 kali, dengan demikian aktivitas antimikrobnya sebesar 40 AU/ml terhadap bakteri yang sama. Perbedaan aktivitas hambatan kedua ekstrak tersebut bisa jadi karena kedua ekstrak mengandung senyawa aktif yang sama dalam konsentrasi yang berbeda atau bisa jadi karena perbedaan jenis senyawa aktifnya. Kenyataannya dilaporkan ada senyawa yang diproduksi oleh miselium tapi tidak diproduksi oleh tubuh buah, seperti yang dilaporkan oleh Nishitoba *et. al.* (1987) bahwa miselium dan tubuh buah *Ganoderma lucidum* sama-sama memproduksi senyawa aktif dari golongan triterpenoid namun jenisnya berbeda sehingga berpengaruh terhadap aktivitasnya.

Aktivitas antimikrob yang besar baik ekstrak miselium maupun tubuh buah terhadap bakteri patogen pada konsentrasi yang rendah menunjukkan bahwa kedua ekstrak tersebut memiliki potensi sebagai pengendali patogen tanaman.

Uji Kelarutan

Sepuluh macam pelarut berdasarkan deret eleotropi digunakan untuk melarutkan masing-masing ekstrak. Kelarutan kedua macam ekstrak semakin meningkat dengan meningkatnya kepolaran pelarut yang diukur berdasarkan besarnya zona hambatan pada cawan uji dengan metoda cakram kertas. Grafik di bawah ini menunjukkan tingkat kelarutan ekstrak pada masing-masing pelarut.



Grafik 1. Kelarutan ekstrak miselium dan tubuh buah *L. cladopus* LC4 pada beberapa macam pelarut

Pada grafik di atas tampak bahwa baik ekstrak miselium maupun tubuh buah menunjukkan zona hambatan terbesar pada pelarut air. Hal ini berarti bahwa kedua ekstrak tersebut memiliki kelarutan tertinggi pada air sebagai pelarut polar kemudian diikuti oleh pelarut yang kurang polar di bawahnya seperti metanol. Sifat tersebut sangat berarti untuk

penanganan lebih lanjut baik dalam metode formulasi yang lebih murah maupun kemudahan dalam aplikasinya ke tanaman (Cremllyn, 1991). Sifat ini akan memudahkan penetrasinya ke dalam jaringan daun dengan adanya sifat permeabilitas jaringan daun terhadap air. Semakin mudah berdifusi ke dalam jaringan tanaman akan semakin menguntungkan karena senyawa antimikrob atau antibiotik biasanya bersifat preventif terhadap patogen tanaman.

Uji Toksisitas Ekstrak Terhadap Tanaman Kedelai

Sifat toksik ditunjukkan dengan kelayuan pada daun kedelai setelah 24 sampai 48 jam perlakuan tanpa ada gejala fisiologis lain pada daun maupun bagian lain tanaman. Ekstrak miselium dengan pengenceran 8 kali dan tubuh buah pada pengenceran 4 kali tidak menunjukkan kelayuan pada daun. Dari kejadian ini menarik untuk diungkapkan bahwa kemungkinan besar sifat toksik ekstrak terhadap tanaman inang semata-mata karena konsentrasi ekstrak yang hipertonis terhadap cairan sel sehingga menimbulkan gejala kelayuan akibat dari isi sel yang keluar. Dugaan ini dikuatkan oleh pendapat Burr, *et. al.* (1990) bahwa pada dasarnya sifat toksisitas sebuah antibiotik sangat kecil apabila digunakan dalam pengendalian penyakit tanaman

Meskipun menurut Cremllyn (1991) bahwa umumnya senyawa antimikrob yang diaplikasikan sebagai pengendali patogen tanaman bekerja secara sistemik dan cara kerja tersebut menjadi masalah apabila dikaitkan dengan sifat toksisitasnya terhadap tanaman inang.

Uji Stabilitas Terhadap Suhu

Aktivitas senyawa antimikrob dari kedua ekstrak yang diuji tetap stabil setelah dipanaskan pada suhu 100⁰C selama 10 menit dengan diameter zona hambatan yang terbentuk sebesar 14 mm untuk ekstrak miselium dan 20 mm untuk ekstrak tubuh buah. Sifat termostabil senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak kasar di atas sangat menguntungkan dalam penanganan selanjutnya terutama dalam proses isolasi atau purifikasi maupun aplikasi di lapangan.

Uji Bioautografi

Hasil pengujian bioautografi pada kromatogram silika gel dengan *B. subtilis* memperlihatkan bahwa ekstrak kasar miselium terpisah menjadi tiga zona bening yang merupakan senyawa aktif dengan nilai Rf masing-masing 0,6; 0,72; dan 0,83 sedangkan ekstrak tubuh buah terpisah menjadi 2 senyawa aktif dengan nilai Rf sebesar 0,63 and 0,86.

Nilai Rf merupakan parameter yang berharga untuk mengetahui senyawa yang aktif tersebut merupakan senyawa baru dan menjadi sarana terpenting dalam membedakan senyawa yang satu dengan yang lain (Harborne, 1996). Dengan demikian adanya tiga nilai Rf pada ekstrak miselium dan dua pada ekstrak tubuh buah dapat memberikan gambaran sedikitnya terdapat tiga atau dua senyawa berbeda dan aktif sebagai antimikrob. Hal ini menjadi dasar untuk melakukan purifikasi senyawa-senyawa tersebut dan menguji kembali keaktifan masing-masing secara terpisah baik *in vitro* maupun *in vivo*.

KESIMPULAN

1. Ekstrak miselium maupun tubuh buah *L. cladopus* LC4 memiliki aktivitas hambatan pertumbuhan yang kuat dan kedua ekstrak tersebut masih aktif menghambat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi rendah. Kedua ekstrak mempunyai kelarutan yang tinggi pada pelarut polar, tidak bersifat toksik terhadap tanaman inang, dan stabil terhadap suhu tinggi sehingga kedua ekstrak ini berpotensi sebagai pengendali patogen tanaman kedelai.
2. Ekstrak miselium mengandung tiga senyawa aktif dengan nilai Rf 0,6; 0,72; dan 0,83 sedangkan ekstrak tubuh buah mengandung 2 senyawa aktif dengan nilai Rf sebesar 0,63 dan 0,86.

DAFTAR PUSTAKA

- Aoki, M., M. Tan, A. Fukushima, T. Hieda, S. Kubo, M. Takabayashi, K. Ono, and Y. Mikami. 1993. Antiviral Substances with Systemic Effects Produced by Basidiomycetes Such as *Fomes fermentarius*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(2):278-282.
- Burr, T.J. and J.L. Norelli. 1990. Antibiotics. P. 327-331. In Z. Klement, K. Rudolph, D.C. Sand. *Methods in Phytobacteriology*. Akademi Kiado. Budapest.
- Cremllyn, R. J. 1991. *Agrochemicals : Preparation and Mode of Action*. Jhon Wiley & Sons. Chishester. P. 1-28.
- DIFCO Laboratories, 1997. 1996/1997 Product Catalog for Microbiology. DIFCO Laboratories. Wisconsin.
- Dwiyana, B. I. 1999. Deteksi awal aktivitas antimikrob dari ekstrak tubuh buah *Lentinus sajor-cajo* LSC8 dan *L. squarrosulus* LP9. Skripsi. FMIPA, IPB. Bogor.
- Harborne, J. B. 1996. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerbit ITB Bandung. P. 8-19.

- Haynes, W. K. 1955. Maintenance of Cultures of Industrially Important Microorganisms. *Appl. Microbiol.* 3:361-368.
- Nishitoba, T. H. Sato, S. Shirasu, and S. Sakamura. 1987. Novel triterpenoids from the mycelial mat at the previous stage of fruiting of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* 51 (2) 619-622.
- Prathuangwong, S. and C. Choochoa, 1988. Detection and Seed Transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* causing Bacterial pustule of soybean. Proceeding of the 26th National Conference. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
- Rao, S. 1982. *Advances in Agricultural Microbiology*. Butterworths. P. 486.
- Sinha, A. P., K. Singh, A. N. Mukhopadhyay. 1988. *Soil Fungicides*. Vol. II. CRC Press Inc. United State. P. 88-93.
- Smith, D. and A. H. S. Onions. 1994. *The Preservation and Maintenance of Living Fungi*. 2th ed. International Mycological Institut. Wallingford.
- Sudirman, L. I., A. I. I. Housseini, G. Lefebvre, E. Kiffer, and B. Botton. 1992. Screening of some Basidiomycetes for Biocontrol of *Rigidoporus lignosus*, a parasite of The Rubber Tree *Hevea brasiliensis*. *Mycol Res.* 96 (8): 621-625.
- Sudirman, L. I., G. Lefebvre, E. Kiffer, and B. Botton. 1994. Purification of Antibiotics Produced by *Lentinus squarosulus* and Preliminary characterization of a Compound Active Against *Rigidoporus lignosus*. *Curr. Microbiol.* 29:1-6.
- Sudirman, L. I., H. Adijuwana, F. Hazra. 1997. Antimicrobial activity and Physiological Study of *Lentinus* spp. Native to Indonesia. 61 st Annual Meeting of the Mycological Society of America (MSA). Montreal, Canada. August 3-7.
- Wage, S., 1998. Spektrum Aktivitas *Lentinus* spp. terhadap Beberapa Mikrob Patogen Tanaman dan Manusia. Skripsi FMIPA, IPB. Bogor.