

Pemurnian Fraksi Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit *Aspergillus salwaensis* DTO297C1

Purification of Ethyl Acetate Extract Fraction of Aspergillus salwaensis strain DTO297C1

Nadya Ambarwati^{1*}, Noor Erma Nasution²

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Sains Kesehatan, Universitas PGRI Adi Buana, Surabaya

² Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

*Korespondensi: nadyaambarwati@gmail.com

Abstract

Endophytic microbes is microbes that live in plant tissues without endangering their hosts. Endophytes produce some substances that have biological activity. Aspergillus salwaensis DTO297C1 is one of the endophytic fungi isolated from Chromolaena odorata. It is prove that 7 of 18 ethyl acetate fractions have an inhibiting activity of Staphylococcus aureus ATCC 6538, Escherichia coli ATCC 8739, and Candida albicans ATCC 10231. The objective of this study was to purify from fraction-5. Purification using column chromatography with silica gel 60 and n-hexane : ethyl acetate-methanol 20% gradient eluent. It is obtained 400 vial that combined and become 9 subfractions, 5.1 – 5.9. 5.1 and 5.6 subfractions was analyzed using Thin Layer Chromatography with silica gel 60 F254 as stationary phase and chloroform : methanol (9.5:0.5) as mobile phase. 5.1 and 5.6 subfractions have active compound in UV λ 254 scan, positive in H₂SO₄ anisaldehyde stain removal, and 5.1 subfraction positive in FeCl₃. from this research, the ethyl acetate extract of Aspergillus salwaensis strain DTO297C1 has several bioactive compounds of flavonoids, polyphenols, and terpenoids/steroids and has been successfully resolved using column Thin layer chromatography (TLC).

Keywords: *Aspergillus salwaensis, Chromolaena odorata, column chromatography, Endophytic microbes, TLC*

Abstrak

Mikroba endofit merupakan mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Mikroba endofit menghasilkan beberapa zat yang memiliki aktivitas biologis. *Aspergillus salwaensis* DTO297C1 merupakan salah satu jamur endofit yang diisolasi dari *Chromolaena odorata*. Terbukti bahwa 7 dari 18 fraksi etil asetat memiliki aktivitas penghambatan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, dan *Candida albicans* ATCC 10231. Penelitian ini bertujuan untuk memurnikan fraksi-5. Pemurnian menggunakan kromatografi kolom dengan silika gel 60 dan n-heksana : etil asetat-metanol 20 % gradien eluen. Didapatkan 400 vial yang digabungkan menjadi 9 subfraksi, 5.1 – 5.9. Subfraksi 5.1 dan 5.6 dianalisis menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dengan silika gel 60 F254 sebagai fase diam dan kloroform : metanol (9,5:0,5) sebagai fase gerak. Subfraksi 5.1 dan 5.6 memiliki senyawa aktif yang pada pemindaian UV λ 254, positif pada penghilangan noda H₂SO₄ anisaldehyda, dan subfraksi 5.1 positif pada FeCl₃. Kesimpulan dari penelitian ini, Fraksi-5 ekstrak etil asetat *Aspergillus salwaensis* strain DTO297C1 memiliki beberapa senyawa bioaktif flavonoid, polifenol dan terpenoid/steroid serta telah berhasil dilakukan pemurnian dengan menggunakan kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis (KLT).

Kata Kunci: *Aspergillus salwaensis, Chromolaena odorata, Jamur endofit, KLT, Kromatografi Kolom.*

PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotik yang tidak terkendali pada saat ini, menyebabkan terjadinya suatu masalah bagi masyarakat, adanya populasi bakteri yang tahan terhadap antibiotik atau resisten. Apabila kasus resistensi antibiotik semakin meningkat, dapat diperkirakan dunia akan kembali ke zaman tanpa pemakaian antibiotik (WHO, 2014). Menanggulangi hal tersebut, hingga kini para peneliti sedang melakukan upaya untuk menemukan penemuan sumber bahan antibiotik baru (WHO, 2014).

Tumbuhan merupakan salah satu bahan utama yang digunakan sebagai pengobatan sejak dulu hingga sekarang. Beberapa tumbuhan memiliki khasiat sebagai antimikroba contohnya tanaman sirih, sarang semut, jati, kunyit, mahkota dewa (Hanifah, 2014). Selain tumbuhan, mikroorganisme khususnya jamur merupakan sumber utama senyawa berkhasiat antimikroba seperti penicillin dan ampisilin. Di antara berbagai mikroba khususnya jamur endofit, saat ini mendapat perhatian dari para peneliti, beberapa dari jamur endofit terbukti dapat menghasilkan senyawa berkhasiat.

Mikroba endofit merupakan mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman seperti akar, batang, ranting, buah, daun dan biji. Pada periode tertentu mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya (Akmalasari *et al.*, 2013). Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder (Tan dan Zou, 2001).

Siklus hidup mikroba endofit yang lebih singkat dibanding siklus hidup tumbuhan inangnya, memungkinkan untuk mendapatkan senyawa yang dihasilkan inang tanpa menunggu waktu yang lama.

Kemungkinan yang lain, senyawa aktif yang diproduksi oleh jamur endofit dapat dihasilkan dengan jumlah besar melalui proses fermentasi (Noverita *et al.*, 2009).

Menurut Strobel dan Daisy (2003) ada beberapa kriteria tumbuhan inang yang dapat diisolasi mikroba endofitnya, yaitu tanaman yang berkhasiat yang diperoleh dari lingkungan unik, mempunyai sejarah etnobotani, tumbuh di daerah endemik, dan tumbuh di daerah yang mempunyai banyak biodiversitas/beriklim tropis. Salah satunya *Chromolaena odorata* yang memenuhi kriteria tersebut, karena terbukti memiliki khasiat sebagai obat tradisional.

Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya, aktivitas antibakteri dan antifungi dari ekstrak etil asetat *Aspergillus salwaensis* strain DTO297C1 yang diisolasi dari tanaman *Chromolaena odorata* menghasilkan nilai positif terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Ermawati, 2016) dan antifungi terhadap *Candida albicans* (Mahayu, 2016). Selanjutnya pada pengujian aktivitas antibakteri dan antifungi dari fraksi-fraksi ekstrak etil asetat jamur endofit *Aspergillus salwaensis* DTO297C1, hasil fraksinasi terbukti yang memiliki aktivitas antimikroba pada fraksi nomor 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9 (Rahma, 2017).

Berdasarkan uraian diatas perlu dilakukan pemurnian fraksi yang telah didapatkan dari ekstrak etil asetat jamur endofit *Aspergillus salwaensis* DTO297C1. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Rahma 2017, fraksi-5 ini memiliki aktivitas antimikroba dan memiliki berat fraksi yang lebih besar dibandingkan dengan fraksi lainnya sehingga perlu dilakukan pemurnian terhadap fraksi-5.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Plat KLT *silica gel* 60 F₂₅₄, *n*-heksan p.a, etil asetat p.a, metanol p.a. Deteksi noda anisaldehyd H₂SO₄ dan FeCl₃.

Alat

Timbangan analitik, kromatografi kolom (pyrex), chamber (CAMAG), kromatografi lapis tipis (KLT) (Merck), sonikator, vortex (D-Lab MX-S), alumunium, lampu UV λ 254nm (CAMAG), kertas saring dan alat gelas.

Metode

A. Kromatografi Kolom

Preparasi Kolom

Pemisahan dengan menggunakan kromatografi kolom diawali dengan pembuatan fase diam dan fase gerak, fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 *for column chromatography* dan fase gerak yang digunakan *n*-heksan p.a. Pembuatan kolom kromatografi dengan cara sebanyak 200g silika gel *for column chromatography* dicampur ke dalam 100 ml eluen di dalam labu Erlenmeyer, aduk hingga terbentuk bubuk silika. Silika gel yang telah basah dan terbentuk seperti bubuk dituangkan ke dalam kolom dengan cepat dan hati-hati, kemudian kolom diketuk secara perlahan agar diperoleh susunan yang rata di dalam kolom, kemudian bilas dengan pelarut *n*-heksan p.a sebanyak 250ml hingga mencapai setengah dari tinggi kolom. Kemudian kolom ditutup dengan alumunium selama 24 jam, untuk memastikan bahwa kolom tidak mengalami *cracking* ditambahkan eluen ke dalam kolom hingga mencapai 2 cm dari batas atas silika gel (Sarker *et al.*, 2006).

Pelaksanaan kromatografi kolom

Fraksi-5 ekstrak etil asetat (FEA-5) *Aspergillus salwaensis* strain DTO297C1 dilarutkan dalam pelarut etil asetat, dan

ditambahkan 200gr silika gel 60 *for column chromatography* kering ke dalam larutan ekstrak, kemudian diaduk hingga homogen dan terbentuk ekstrak kering. Ekstrak kering yang telah di dapatkan dimasukkan dalam kolom. Menambahkan silika gel 60 *for column chromatography* dalam kolom dengan tinggi 2 cm diatas ekstrak kering, menuangkan eluen *n*-heksan: etil asetat, etil asetat 100%, etil asetat : metanol dan metanol 100 % secara gradient 20% ke dalam kolom sambil dilakukan penetes. Kecepatan penetes kolom diatur 10 tetes/menit. Tetesan ditampung dalam vial dengan volume 10ml. Masing-masing fraksi pada setiap 10 vial diuji dengan KLT untuk mengetahui botol vial yang memiliki noda yang sama. Fraksi yang menampakkan noda yang sama disatukan dalam 1 vial.

Monitoring hasil kromatografi kolom

Uji KLT dilakukan pada fraksi-5 yang telah difraksinasi kembali dengan kromatografi kolom. Uji KLT dilakukan pada tiap fraksi dengan kelipatan 10. Fraksi ditotolkan pada plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler kemudian dieluasi ke dalam chamber yang berisi eluen. Hasil plat KLT yang telah dieluasi diamati dibawah sinar UV λ 254 nm, kemudian plat KLT dideteksi dengan penampak noda anisaldehyd-asam sulfat. Apabila mendapat bentuk noda yang sama, maka kedua fraksi akan digabungkan menjadi satu, dan apabila didapatkan noda yang berbeda, dilakukan uji KLT pada fraksi diantaranya (bila noda fraksi nomor 25 dan nomor 30 berbeda, maka diuji fraksi nomor 25, 26,27,28,29, dan 30).

B. Pengujian dengan Kromatografi Lapis Tipis

Optimasi eluen

Pemilihan eluen dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis

(KLT). Ekstrak etil asetat jamur ditotolkan pada plat KLT dengan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄. Optimasi dilakukan dengan cara eluasi berbagai fase gerak. Hasil eluasi dimonitoring dengan lampu UV pada λ 254 nm dan dianalisis dengan menggunakan anisaldehyda asam-sulfat. Ditentukan nilai *R_f* dari masing-masing eluen yang digunakan. Eluen terpilih adalah eluen yang mempunyai kemampuan memisahkan senyawa yang paling baik (Rahmah, 2017).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses fraksinasi lanjutan fraksi-5 menggunakan kromatografi kolom dengan

fase diam silika gel 60 dan fase gerak *n*-heksan 100%, *n*-heksan : etil asetat, etil asetat 100%, etil asetat : metanol p.a, dan metanol 100% secara gradient 20%. Hasil fraksinasi diperoleh 400 vial, selanjutnya dilakukan pengelompokan melalui analisa dengan kromatografi lapis tipis terhadap tiap 10 vial. Fase gerak terpilih adalah *n*-heksan : etil asetat 1:3 dan 1:4 (v/v). Subfraksi dengan profil KLT yang menunjukkan noda yang sama digabungkan, dihasilkan 9 subfraksi yaitu 5.1 sampai dengan 5.9, seperti pada tabel 1.

Tabel 1. Penggabungan hasil subfraksi vial 1 - 400.

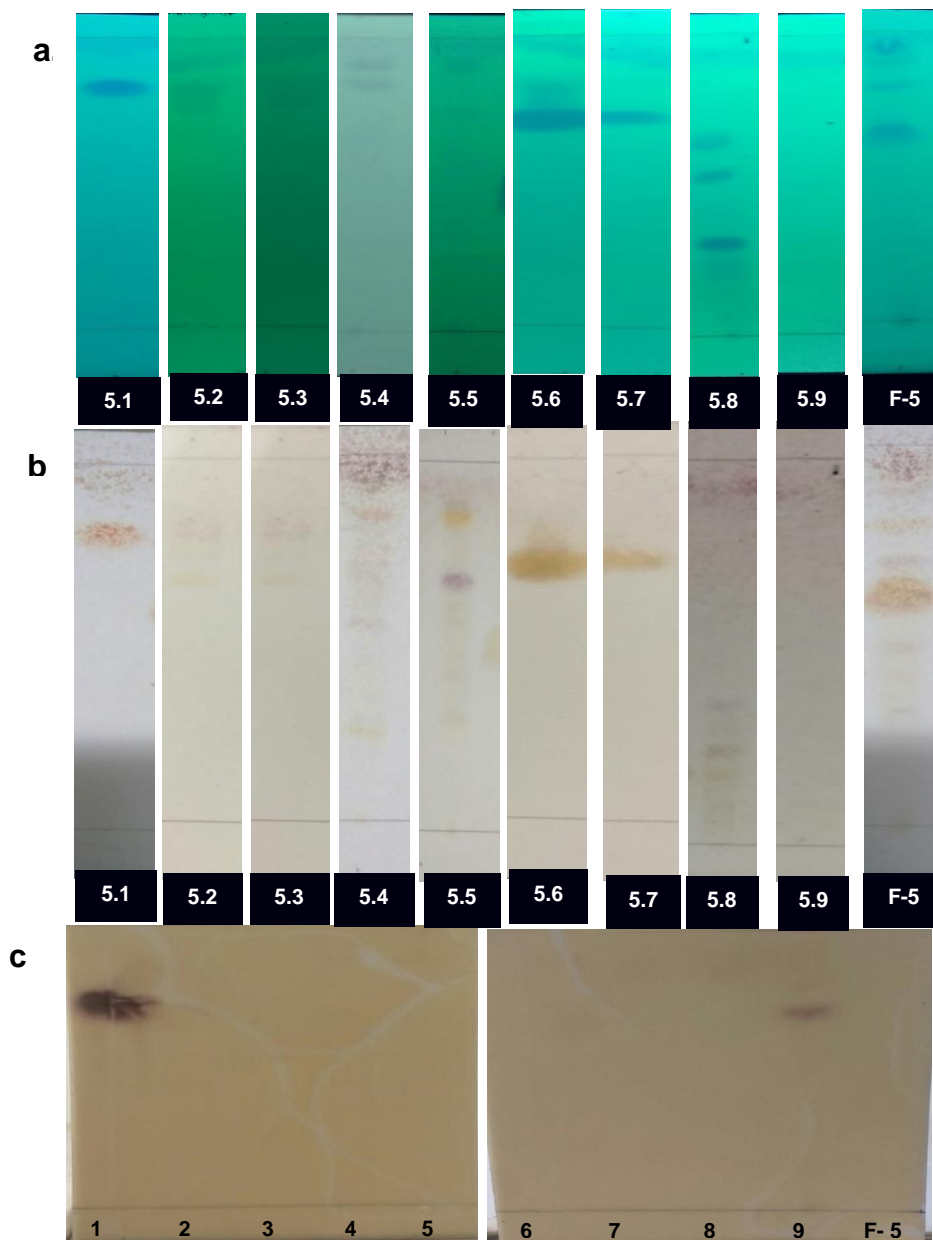
No fraksi	Vial ke-	Berat zat (g)
	1-79 (tidak ada noda)	
5.1	80-90	0,2842
5.2	91-110	0,0741
5.3	111-115	0,0438
5.4	116-124	0,0198
5.5	125-142	0,0709
5.6	143-159	0,4380
5.7	160-190	0,1082
5.8	191-249	0,0834
5.9	250-300	0,0680
	301-400 (tidak ada noda)	

Analisis KLT subfraksi 5.1 sampai dengan 5.9 dan Fraksi-5

Analisa menggunakan KLT dengan fase diam *silica* gel 60 GF₂₅₄, dengan fase gerak kloroform:metanol 9,5:0,5 (v/v) dengan dipayar sinar UV λ 254nm, penampak noda anisaldehyd dan FeCl₃, hasil analisis KLT terlihat pada Gambar 1.

Hasil penggabungan dapat dilihat pada (Gambar 1a) didapatkan 9 subfraksi (5.1 -5.9). Subfraksi 5.1 sampai dengan 5.8

positif aktif UV-Vis pada λ 254nm yang menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki inti aromatis dan ikatan rangkap terkonjugasi atau disebut dengan kromofor dan memiliki gugus auksokrom pada strukturnya (Alen *et al.*, 2017). Subfraksi 5.1 sampai dengan 5.9 diuji dengan penampak noda anisaldehyd H₂SO₄, subfraksi 5.1 menunjukkan warna orange (Gambar 1b).



Gambar 1. Gambar 1. Hasil KLT subfraksi 5.1-5.9 dan fraksi 5 menggunakan fase diam silica gel 60F₂₅₄, dan fase gerak kloroform:metanol 9,5:0,5 yang di payar sinar UV λ 254nm (a), dengan penampak noda anisaldehyd H₂SO₄ (b), dengan penampak noda FeCl₃ (c).

Menurut Harborne (1998) anisaldehyd dapat mengidentifikasi senyawa terpenoid dan steroid dengan memberi warna biru, merah ungu, ungu, dan orange. Subfraksi 5.1-5.9 diujikan juga dengan penampak noda FeCl₃, hanya subfraksi 5.1 menunjukkan warna ungu kehitaman (Gambar 1c). FeCl₃ dapat mendeteksi senyawa fenol dan fenolik yang bila positif akan menghasilkan warna biru gelap atau hitam (Spangenberg *et al.*,

2011). Hal ini menunjukkan bahwa adanya senyawa-senyawa bioaktif seperti flavonoid, polifenol dan terpenoid/steroid dan hasil uji KLTnya didapat 3 noda yang terpisah baik, dengan anisaldehyd H₂SO₄ menunjukkan warna hijau kebiruan, orange, dan ungu, 1 noda yang positif dengan pereaksi FeCl₃ menunjukkan warna hitam.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pada fraksi-5 ekstrak etil asetat *Aspergillus salwaensis* strain DTO297C1 terdapat beberapa senyawa-senyawa bioaktif seperti flavonoid, polifenol dan terpenoid/steroid dan hasil uji KLTnya didapat 3 noda yang terpisah baik, dengan anisaldehyd H_2SO_4 yang menunjukkan warna hijau kebiruan, orange, dan ungu, 1 noda yang positif dengan pereaksi $FeCl_3$ menunjukkan warna hitam, penelitian ini telah berhasil dilakukan pemurnian dengan menggunakan kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis (KLT).

DAFTAR PUSTAKA.

- Alen, Y., Agresa, F.L. and Yuliandra, Y., 2017. *Thin layer chromatography (TLC) analysis and antihyperuricemic activity of bamboo shoots extract (Schizostachyum brachycladum Kurz (Kurz)) in male white mice. Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*, Vol. 3 No. 2, pp.146-152.
- Akmalasari, I., Purwati, E.S. and Dewi, R.S. 2013. Isolasi dan Identifikasi Jamur Endofit Tanaman Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *A Scientific Journal*, Vol. 30 No. 2, pp.82-89.
- Ermawati, Desy. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Jamur Endofit *Aspergillus salwaensis* strain DTO297C1 yang Diisolasi dari Tumbuhan *Chromolaena odorata*. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. **Skripsi**, pp.48-55.
- Harborne, J.B., 1998. *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Chapman & Hall*, Vol. 3 No. 1, pp.58.
- Hanifah, Salma. 2014. Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Daun *Angiopteris palmiformis* (Cav.) C. Chr. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Syarif Hidayatullah. **Skripsi**, pp. 7-11
- Mahayu, Aisa A. 2016. Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit *Aspergillus salwaensis* strain DTO297C1 yang Diisolasi dari *Chromolaena odorata* Terhadap *Candida albicans*. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. **Skripsi**, pp. 50-56.
- Noverita., Fitria., & Sinaga, Ernawati. 2009. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit dari Daun dan Rimpang *Zingiber ottensii* Val. *Jurnal Farmasi Indonesia* Vol. 4, No. 4, pp. 171-176
- Rahmah. 2017. Uji Aktivitas Antimikroba Fraksi-Fraksi Dari Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit *Aspergillus salwaensis* strain DTO297C1 yang Diisolasi dari *Chromolaena odorata*. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. **Skripsi**, pp. 1-36
- Sarker, S.D. and Latf, Z. 2006. **Natural Products Isolation Second Edition**. New Jersey: **Humana Press Inc**, pp.117-157.
- Spangenberg, B., Poole, C.F., Weins, Ch. 2011. *Quantitative Thin Layer Chromatography*, **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, pp.167-189.
- Strobel, G., Daisy B. 2003. *Bioprospecting for Microbial Endophyte and Their Natural Products. Microbiology and Molecular Biology Review*, Vol. 67 No. 4, pp. 491-502.
- Tan, R.X., Zou, W.X. 2001. *Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites*. Cambridge: **Advance Article**, Vol. 18, No.2 pp.448-459.
- WHO. 2014. *Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance*. France: **WHO Library**