

## Antibacterial Activity of Compound TL-4 IFATL-05 Isolate Endophytic Fungi from Tunjuk Langit Root (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook) Against Bacterial Gastrointestinal Tract Infection

Fatur Rahmansyah Yuridu<sup>1\*</sup>, Herwin<sup>1</sup>, Fitriana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, 90231, Indonesia

### Article info

Received: 22/06/2023

Available online: 30/09/2023

### Corresponding Author:

Fatur Rahmansyah Yuridu  
Department of Microbiology,  
Faculty of Pharmacy, Universitas  
Muslim Indonesia, Makassar, South  
Sulawesi, Indonesia  
email: [15020190245@umi.ac.id](mailto:15020190245@umi.ac.id)

### ABSTRACT

*Tunjuk Langit Plant (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook) contains a lot of secondary metabolite compounds, one of which is found in the root which contain the flavonoids ugonin and quercetin. The purpose of this study was to determine the antibacterial activity of compound 4 isolates IFATL-05 endophytic fungi from Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook) root against bacterial gastrointestinal tract infection. The results of purification of endophytic fungi with IFATL-05 code on macroscopic examination showed blackish-white fungus color, round with scalloped colony shapes, wavy edges and drop-like elevation angles. The process of separating the compounds using KLTP with n-hexane:ethyl acetate (1:1) as an eluent resulted in four bands of active compounds in UV lamps of 254 and 366 nm (TL-1, TL-2, TL-3 and TL-4). Test results for compound 4 isolates of IFATL-05 endophytic fungi from Tunjuk Langit root (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook) using the Bioautographic TLC method using n-hexane:ethyl acetate (6:1) as eluent on *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella dysenteriae* and *Vibrio cholerae* with Rf value = 0.90.*

Keyword:

*Antibacterial, Endophytic Fungi, Compound 4 Isolate IFATL-05, Helminthostachys zeylanica, Gastrointestinal Infection.*



Copyright ©2023 by Author

Journal Microbiology Science by Faculty of Pharmacy Universitas Muslim Indonesia is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

## PENDAHULUAN

Infeksi saluran pencernaan masih menjadi salah satu masalah kesehatan yang besar di Indonesia, terutama didaerah dengan tingkat sanitasi yang rendah dan jumlah populasi yang sangat padat. Infeksi saluran pencernaan disebabkan oleh mikroorganisme patogen salah satunya ialah bakteri. Penyakit ini seiring waktu semakin meningkat, dibuktikan dengan tingginya prevalensi penyakit diare.<sup>1</sup> Beberapa bakteri yang dapat menyebabkan

penyakit diare antara lain bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Clostridia perfringens*, dan *Staphylococcus aureus*.<sup>2</sup>

Dalam dua dekade terakhir fungi endofit menjadi salah satu sumber penghasil antibakteri. Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup didalam suatu jaringan tanaman dengan periode tertentu dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya.<sup>3</sup> Fungi endofit

memiliki kemampuan untuk memproduksi senyawa bioaktif, baik yang sama maupun tidak sama dengan inangnya tetapi seringkali memiliki aktivitas biologis yang serupa dengan senyawa bioaktif yang diproduksi inangnya. Hal ini menunjukkan senyawa bioaktif tidak hanya didapatkan pada kandungan tanaman obat saja. Bahkan senyawa yang dihasilkan oleh fungi endofit seringkali memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan aktivitas senyawa tumbuhan inangnya.<sup>4</sup> Isolasi fungi endofit dapat dilakukan dari tumbuhan yang potensial untuk dijadikan sebagai senyawa antibakteri salah satunya tumbuhan Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook).

Ekstrak etanol dari tumbuhan Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook) menunjukkan aktivitas penghambatan pada bakteri *Bacillus cereus* dengan diameter zona bening yang cukup besar sedangkan pada kontrol negatif tidak menunjukkan efek penghambatan. Analisis komponen menunjukkan bahwa ekstrak tumbuhan Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook) kaya akan flavonoid. Flavonoid bertanggung jawab atas aktivitas antimikroba dari beberapa ekstrak tanaman, dikarenakan senyawa ini dapat menghancurkan protein pada membran sel bakteri.<sup>5</sup> Chang Wu et al (2017) dalam penelitiannya menyatakan bahwa senyawa

flavonoid yang terdapat pada akar Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook) adalah ugonin dan kuersetin.<sup>6</sup>

Isolat fungi endofit akar Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook) berdasarkan hasil isolasi fungi endofitnya diperoleh 8 isolat dengan isolat yang paling aktif adalah isolat IFATL-05 dan hasil isolasi senyawa kimia aktif secara preparatif diperoleh 4 isolat yaitu isolat TL-1, TL-2, TL-3 dan TL-4. Hasil aktivitas antibakteri isolat TL-1, TL-2 dan TL-3 memberikan aktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae* dan *Salmonella typhi*.<sup>7</sup>

Berdasarkan uraian tersebut dilakukan penelitian untuk menguji aktivitas senyawa TL-4 isolat IFATL-05 fungi endofit dari akar Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook) yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap bakteri penyebab infeksi saluran pencernaan.

## METODE

### Alat yang digunakan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas, autoklaf (Smic<sup>®</sup>), batang pengaduk, cawan petri (Normax), corong pisah, gelas erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, inkubator (Memmert<sup>®</sup>), jarum ose, LAF (*Laminar Air Flow*), lampu spiritus, lampu UV 254 dan 366 nm (Philips), mikropipet dan tip, oven (Memmert<sup>®</sup>), pipa kapiler, shaker,

seperangkat alat KLT, tabung reaksi, timbangan analitik (Chyc<sup>®</sup>).

### **Bahan yang digunakan**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah aquadest, bakteri uji (*Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella dysenteriae* dan *Vibrio cholerae*), etanol 70%, etil asetat, Maltosa Yeast Broth (MYB), Nutrient Agar (NA), n-heksan, Potato Dextrosa Agar (PDA), dan sampel senyawa TL-4 dari isolat fungi endofit IFATL-05.

### **Pemeriksaan makroskopik**

Pemeriksaan makroskopik bertujuan untuk membedakan isolat fungi yang murni. Pemeriksaan makroskopiknya meliputi permukaan koloni, bentuk koloni, tepi, dan sudut evalensinya.<sup>8</sup>

### **Fermentasi dan ekstraksi sampel isolat aktif fungi endofit**

Diambil isolat aktif menggunakan ose bulat yang telah dipotong secara merata 1,5 cm x 1,5 cm lalu dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer yang berisi 1000 mL medium MYB (Maltosa Yeast Broth) yang dibagi rata kedalam dua erlenmeyer masing-masing 500 mL, selanjutnya dilakukan fermentasi menggunakan rotary shaker dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 25°C selama 3 minggu hingga diperoleh fermentat berupa supernatan dan miselia.<sup>9</sup> Fermentat supernatan yang diperoleh diekstraksi dengan ekstraksi cair-cair sebanyak 3 kali dengan 1 Liter etil asetat. Pelarut kemudian diuapkan dengan rotary

evaporator lalu dimasukkan kedalam cawan penguap yang sudah ditara, sampai diperoleh ekstrak kering.<sup>10</sup>

### **Identifikasi Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)**

Pelat KLTP sebelum digunakan diaktivasi terlebih dahulu dengan cara memanaskannya didalam oven pada suhu 100°C selama beberapa menit untuk menghilangkan kadar air/kelembapan. Ekstrak isolat supernatan IFATL-05 yang akan ditotolkan pada pelat KLTP terlebih dahulu dilarutkan kedalam sedikit pelarut etil asetat. Konsentrasi sampel yang digunakan sebaiknya hanya 5-10%. Sampel yang ditotolkan harus berbentuk pita yang sesempit mungkin pada lempeng KLTP berukuran 20 x 20 cm. Penotolan dilakukan dengan tangan menggunakan pipa kapiler, dapat juga menggunakan alat penotol otomatis. Kemudian dielus dengan menggunakan fase gerak n-heksan : etil asetat (1:1) dan lempeng dimasukkan kedalam chamber. Lempeng lalu dikeluarkan dan diangin-anginkan, selanjutnya diamati pada lampu UV 254 dan 366 nm. Pita senyawa TL-4 isolat IFATL-05 yang kedudukannya telah diketahui, dikerok dari pelat dan diekstraksi dengan pelarut etil asetat.<sup>11</sup>

### **Identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Lempeng kromatografi lapis tipis diaktifkan terlebih dahulu dengan

pemanasan menggunakan oven pada suhu 100°C selama 30 menit. Ekstrak etil asetat senyawa TL-4 isolat IFATL-05 hasil KLT Preparatif kemudian ditotolkan pada lempeng KLT berukuran 7x1 cm menggunakan pipa kapiler. Kemudian dielusi dengan menggunakan fase gerak n-heksan : etil asetat (6:1) dan lempeng dimasukkan kedalam chamber. Lempeng kemudian dikeluarkan dari chamber dan diangin-anginkan sehingga cairan pengelusnya menguap. Kromatogram yang diperoleh dilakukan pengamatan bercak pada sinar UV 254 nm dan 366 nm.<sup>9</sup>

#### Pengujian secara KLT-Bioautografi

Hasil identifikasi KLT menggunakan n-heksan : etil asetat dilanjutkan dengan uji KLT-Bioautografi dengan cara cawan petri dituang Nutrient Agar sebanyak 10 mL yang telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri uji sebanyak 0,2 mL lalu dihomogenkan, lempeng KLT yang telah dielusi diletakkan diatas permukaan medium agar yang telah diinokulasikan dengan mikroba uji kemudian dibiarkan selama 60 menit. Setelah itu lempeng diangkat dan dikeluarkan, selanjutnya

diinkubasi selama 1×24 jam pada suhu 37°C. Kemudian diamati bercak yang memberikan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri uji.<sup>12</sup>

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

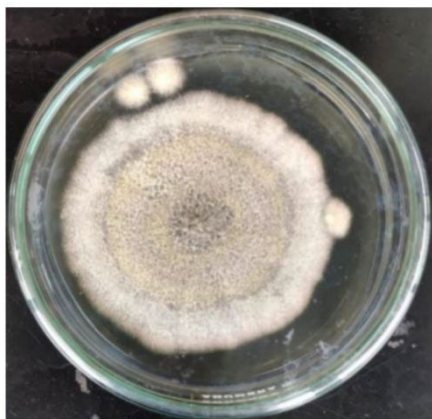
Fungi endofit tumbuh dan mengkolonisasi jaringan tumbuhan inangnya terutama di bagian akar, batang dan daun. Fungi endofit umumnya memproduksi metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologis dan bermanfaat misalnya sebagai senyawa antikanker, antivirus dan antibakteri.<sup>13</sup> Salah satu tumbuhan yang dapat digunakan sebagai sumber isolat fungi endofit yaitu akar Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook). Tumbuhan ini mengandung senyawa steroid, flavonoid, saponin serta polifenol.<sup>14</sup> dan pada bagian akarnya mengandung senyawa ugonin dan kuersetin.<sup>6</sup>

Proses awal penelitian ini dilakukan pemeriksaan makroskopik yang bertujuan untuk memperoleh warna, bentuk koloni, tepi dan sudut elevasinya.<sup>8</sup> Hasil pengamatan makroskopik dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 1.

**Tabel 1.** Hasil pengamatan makroskopik kode isolat IFATL-05

Kode Isolat	Pemeriksaan Makroskopik			
	Warna	Bentuk koloni	Tepi	Elevasi
IFATL-05	Putih kehitaman	<i>Round with scalloped margin</i>	<i>Wavy</i>	<i>Drop-like</i>

Keterangan: IFATL-05 = Isolat Fungi Akar Tunjuk Langit-05

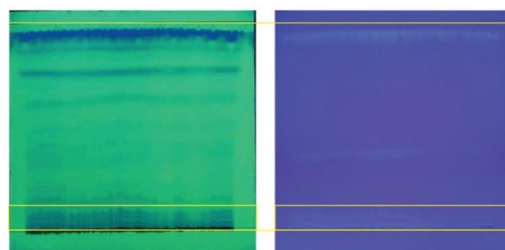


**Gambar 1.** Dokumentasi hasil pemurnian isolat fungi endofit dengan kode isolat IFATL-05 dari akar Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook).<sup>7</sup>

Hasil pemeriksaan makroskopik pada tabel 1 menunjukkan fungi endofit dengan kode IFATL-05 memiliki warna jamur putih kehitaman dengan bentuk koloni *round with scalloped*, tepi *wavy* dan sudut elevasi *drop-like*. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Herwin et al (2022).<sup>7</sup> Selanjutnya isolat dengan kode IFATL-05 dilakukan proses fermentasi dalam media Maltosa Yeast Broth (MYB). Penggunaan media MYB dikarenakan media ini merupakan media cair yang terdiri dari ekstrak yeast sebagai sumber protein, maltosa dan dekstrosa sebagai sumber karbon dan pepton sebagai sumber asam amino yang dibutuhkan dalam pertumbuhan, sintesis sel dan sebagai energi dalam metabolisme mikroorganisme. Fermentat supernatan yang diperoleh selanjutnya di partisi cair-cair dengan etil asetat menggunakan corong

pisah hingga diperoleh ekstrak etil asetat isolat supernatan IFATL-05.

Ekstrak etil asetat IFATL-05 yang diperoleh dilakukan pemisahan senyawa dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) yang bertujuan untuk memisahkan senyawa dan mengambil senyawa tunggal pada fraksi etil asetat, pelarut yang dipilih yaitu n-heksan : etil asetat (1:1) karena pelarut ini cocok sebagai fase gerak sehingga dapat menurunkan senyawa murni. Hasil KLTP diperoleh 4 pita senyawa isolat yang aktif pada lampu UV 254 nm dan 366 nm. Pita senyawa TL-4 isolat IFATL-05 yang kedudukannya telah diketahui kemudian dikerok dari pelat dan diekstraksi dengan pelarut etil asetat. Hasil pengujian KLT Preparatif pada lampu UV 254 dan 366 nm dapat dilihat pada gambar 2.



**Gambar 2.** Hasil uji KLT Preparatif senyawa TL-4 isolat IFATL-05 fungi endofit dari akar Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook).

**Tabel 2.** Hasil pengujian aktivitas antibakteri senyawa TL-4 isolat IFATL-05 dengan KLT-Bioautografi

No.	Rf	Warna pada penampak bercak		Bakteri uji
		UV 254 nm	UV 366 nm	
1.	0,90	Hijau	Ungu	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella thypi</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Vibrio cholerae</i>

Senyawa isolat pita 4 yang diperoleh dari fungi endofit akar Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook) dengan kode isolat IFATL-05 dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dengan KLT-Bioautografi metode bioautografi kontak. Tujuannya agar senyawa yang telah ditotolkan pada lempeng KLT berpindah ke medium agar yang telah diinokulasikan bakteri uji secara merata dan melakukan kontak langsung.<sup>12</sup> Penotolan larutan sampel menggunakan pipa kapiler karena dalam Kromatografi Lapis Tipis penotolan yang baik diusahakan sekecil mungkin untuk menghindari pelebaran noda karena dapat mengganggu nilai Rf.<sup>15</sup> Adapun eluen yang digunakan untuk mengelusi yaitu eluen n-heksan : etil asetat (6:1) yang terlebih dahulu dijenuhkan hingga batas tanda. Penggunaan n-heksan : etil asetat (6:1) sebagai eluen karena merupakan hasil eluen yang paling baik diantara eluen yang lainnya. Penjenuhan eluen bertujuan untuk mengoptimalkan naiknya eluen dimana fase gerak terdistribusi merata pada seluruh bagian chamber sehingga proses pergerakan spot pada fase diam

berlangsung optimal.<sup>15</sup> Hasil positif pada pengujian ini ditandai dengan adanya zona bening pada bagian medium, dimana zona bening atau zona hambat merupakan parameter adanya aktivitas antibakteri.<sup>12</sup>

Berdasarkan pada tabel 2 hasil pengujian aktivitas antibakteri secara KLT-Bioautografi menggunakan eluen n-heksan : etil asetat (6:1) diperoleh nilai Rf 0,90 memberikan aktivitas antibakteri pada bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella dysenteriae* dan *Vibrio cholerae* yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitaran medium tempat lempeng berdifusi sebagaimana ditunjukkan pada gambar 3, 4, 5 dan 6. Zona bening terbentuk karena adanya senyawa kimia aktif yang terdapat pada senyawa TL-4 isolat IFATL-05 dan menghambat pertumbuhan bakteri penyebab infeksi saluran pencernaan. Hal ini membuktikan bahwa senyawa TL-4 isolat IFATL-05 dari akar Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook) berpotensi sebagai penghasil antibakteri.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa hasil pengujian KLT-Bioautografi senyawa TL-4 isolat IFATL-05 fungi endofit dari akar Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook) memiliki aktivitas sebagai antibakteri karena dapat menghambat bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella dysenteriae* dan *Vibrio cholera* dengan nilai Rf 0,90.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Cahyani NME. Daun Kemangi (*Ocinum cannum*) Sebagai Alternatif Pembuatan Handsanitizier. *J Kesehat Masy*. 2014; 9(2):136–142
2. Astriani NK, Chusniasih D, Marcellia S. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hytrix*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Ilmu Kedokt dan Kesehat*. 2021; 8(3):6
3. Rollando. *Senyawa Antibakteri Dari Fungi Endofit*. Edisi Pert. Malang, Jawa Timur: CV. Seribu Bintang. 2019
4. Fitriana F, Nurshitya E. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Isolat Fungi Endofit dari Akar Mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume) Secara KLT Bioautografi. *J Ilm As-Syifaa*. 2017; 9(1):27–36
5. Yenn TW et al. Chemical Composition and Antimicrobial Efficacy of *Helminthostachys zeylanica* Against Foodborne *Bacillus cereus*. 2018; 24(1):66–70
6. Wu KC, Kao CP, Ho YL, Chang YS. *Quality Control of the Root and Rhizome of Helminthostachys zeylanica* (Daodi-Ugon) by HPLC Ucing Quercetin and Ugonins as Markers. *Molecules*. 2018; 22(7):1115
7. Herwin H, Baits M, Nurung AH, Kosman R. Analisis Senyawa Bioaktif Isolat IFATL-05 Endofit Dari Akar Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica* Linn.) Terhadap Bakteri Infeksi Saluran Pencernaan. *J Exp Biol Agric*. 2022; :40–55
8. Asnita, Kosman R, Herwin, Nurung AH. Isolasi Dan Identifikasi Fungi Endofit Batang Sesuru (*Euphorbia antiquorum* L.) Sebagai Penghasil Antibakteri Dengan Metode KLT-Bioautografi. *As-Syifaa J Farm*. 2020; 12(2):144–149
9. Herwin H. Isolasi Fungi Endofit Penghasil Antibiotika pada Alga Merah Jenis *Gracilaria verrucosa* Secara KLT-Bioautografi. *As-Syifaa J Farm*. 2018; 10(1):83–91
10. Nurung, A. H. F dan H. Penentuan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Isolat Fungi Endofit dari Daun Galing-Galing (*Cayratia trifolia* L.). *As-Syifaa J Farm*. 2022; 14(1):11–17
11. Kristanti AN, Aminah NS, Tanjung M, Kurniadi B. *Buku Ajar Fitokimia*. 2019.
12. Deponda RA, Fitriana F, Nuryanti S, Herwin H. Isolasi Fungi Endofit Kulit Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) yang Berpotensi sebagai Antibakteri Secara Metode KLT-Bioautografi. *J Ilm As-Syifaa*. 2019; 11(2):147–153
13. Hasiani VV, Ahmad I, Rijai L. Isolasi Jamur Endofit dan Produksi Metabolit Sekunder Antioksidan Dari Daun Pacar (*Lawsonia inermis* L.). *J Sains dan Kesehat*. 2015; 1(4):146–153

14. Hartini S. Keanekaragaman Jenis Tumbuhan Paku (*Pteridophyta*) Di Kawasan Hutan Tumbang Manggu, Kecamatan Sanaman Mantikei, Kabupaten Katingan, Kalimantan Tengah. *Ekologia*. 2020; 20(1):1–13
15. Samosir AS, Bialangi N, Iyabu H. Analisis Kandungan Rhodamin B pada Saos Tomat yang Beredar di Pasar Sentral Kota Gorontalo Dengan Menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis ( KLT ). *J Entropi*. 2018; 13(1):4