

IDENTIFIKASI STRUKTUR SENYAWA ANTIJAMUR DARI RUMPUT LAUT

Rahmawati

Dosen Program Studi Pendidikan Kimia, FKIP, Universitas Mataram

E-mail:-

ABSTRACT: Screening of plants antifungal compounds from Algae has been resulted. Screening was preceded by extraction of its fresh substance with benzene, methanol, and chloroform solvents and followed examination towards fungi *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus flavus*, and *Pythium* spp. The antifungal effects were tested by well methode in *potato dextrosa agar* (PDA) medium. Analysis compound of benzene extract with preparative TLC methode (n-hexene : ethyl acetate : methanol = 7 : 2 : 1) obtained 5 compounds. Antifungal activity test of the fractions was done by the disk diffution methode with PDA medium. Identification of active compounds with spectroscopy method (IR and NMR) indicated the benzene extract analogue with fungicide Metalaxyl with the benzene ring and substituens of ester, alkyl, and amide. Identification of fractions showed that the compounds analogue with fungicides belong to carboxamide with the main substituen of benzene ring and ester/aldehyds formed, alkyl, and amide.

Key words: screening, antifungal, *Eucheuma cottonii*, fungicides.

PENDAHULUAN

Pestisida termasuk sangat efektif membasmi hama penyakit dan mendatangkan keuntungan ekonomi yang besar, tetapi hakikatnya pestisida sendiri bersifat sebagai bahan racun pembunuh yang tidak cuma membasmi hama penyakit tetapi juga dapat membunuh organisme lain yang bukan hama penyakit di ekosistem, termasuk manusia sendiri.

Melihat akibat penggunaan pestisida bagi yang merugikan bagi manusia dan lingkungan, maka perlahan dunia pertanian dewasa ini mulai berusaha mencari fungisida yang ramah lingkungan, menggunakan bahan-bahan yang berasal dari tumbuhan sebagai fungisida, untuk menurunkan tingkat serangan hama penyakit. Jenis fungisida yang berasal dari tumbuhan ini biasa disebut dengan fungisida nabati atau botani (Untung, 2003).

Salah satu bahan alam tumbuh-tumbuhan yang dapat dimanfaatkan adalah rumput laut karena berpotensi sebagai agen pengendali penyakit yang diakibatkan oleh mikroorganisme. Rumput laut dari Indonesia telah diekspor ke Cina lebih dari satu abad silam dan akhir-akhir ini *Eucheuma* sp adalah jenis yang paling banyak dicari industri makanan, obat-obatan, pestisida, dan insektisida (Aslan, 1998).

Lewin (1962) melaporkan telah dilakukan sebuah penelitian terhadap rumput laut melalui kultur murni tentang

penggunaannya sebagai antibiotik untuk mengurangi kontaminasi oleh bakteri dan jamur. Lewin (1962) melaporkan telah dilakukan sebuah penelitian terhadap rumput laut melalui kultur murni tentang penggunaannya sebagai antibiotik untuk mengurangi kontaminasi oleh bakteri dan jamur.

METODE

Penyiapan Sampel. Sampel rumput laut yang sudah bersih kemudian dikeringanginkan dalam suhu ruangan tanpa sinar matahari. Sampel kering diblender kemudian dibuat ekstraksi sampel rumput laut jenis *Eucheuma cottonii* warna coklat dan hijau, dan *Eucheuma spinosum* dengan merendam ketiganya dalam pelarut metanol, kloroform, dan benzena. Sebanyak 250 g sampel yang sudah dikeringanginkan di blender kemudian ditempatkan di dalam gelas piala, lalu direndam dengan 600 mL pelarut. Rendaman dibiarkan selama 24 jam sambil sesekali dikocok/diaduk. Hasil rendaman disaring sehingga diperoleh ekstrak rumput laut. Ekstrak ini kemudian diuapkan dengan evaporator sampai volume mencapai 1/10 volume awal, lalu ekstrak diuapkan pada suhu kamar untuk mendapatkan ekstrak sampel yang bebas pelarut, kemudian dilakukan uji aktifitas. Ekstrak ini kemudian diuapkan dengan evaporator sampai volume mencapai 1/10 volume awal, lalu ekstrak diuapkan pada suhu

kamar untuk mendapatkan ekstrak sampel yang bebas pelarut, kemudian dilakukan uji aktifitas.

Uji Aktifitas I. Pengujian aktivitas anti jamur dilakukan dengan metode campur (metode Well). Pembuatan media uji diawali dengan pembuatan larutan PDA, kentang dikupas dan dipotong-potong, direbus dengan aquadest dengan perbandingan 1 : 5 sampai didapat kaldu kentang. Setelah kaldu dingin tambahkan agar sebanyak 15 g/L kaldu dan dextrosa 20 g/L kaldu. Larutan PDA cair ditempatkan dalam erlenmeyer lalu disterilkan di autoklav selama 24 jam. Kemudian dikeluarkan dari autoklav dan dibiarkan hingga dingin. Pada waktu akan digunakan, PDA beku diencerkan dulu kemudian suhunya diatur pada kisaran 45°C-50°C lalu ditambahkan larutan antibiotik streptomycin (0,1 g bubuk dalam 75 mL aquadest steril) dengan takaran 1mL larutan dalam 10 mL media PDA. Aduk sampai larut dan media uji telah siap.

Pada media uji ditambahkan larutan sampel bahan aktif (0,1 g sampel dilarutkan dengan 75 ml DMSO) sebanyak 1mL dalam 10 mL media uji. Diaduk sampai homogen, kemudian dituang ke dalam *petridish* ukuran diameter 9 cm Pada media uji ditambahkan larutan sampel bahan aktif (0,1 g sampel dilarutkan dengan 75 ml DMSO) sebanyak 1mL dalam 10 mL media uji. Diaduk sampai homogen, kemudian dituang ke dalam *petridish* ukuran diameter 9 cm dengan volume 12-15 ml/*petridish*, lalu didinginkan. Setelah dingin isolat murni jamur uji diambil bersama medianya dengan silinder steril lalu ditanamkan di tengah-tengah media. Perlakuan: 9 ekstrak sampel diujikan terhadap 4 jenis jamur uji dengan 3x pengulangan, dan 3 ulangan untuk kontrol positif (perlakuan hanya dengan pelarut bahan aktif), 3 ulangan untuk kontrol negatif (tanpa perlakuan). Biarkan biakan dalam laminar hingga salah satu media perlakuan/kontrol dipenuhi oleh jamur. Dimulai pengamatan dengan mengukur diameter koloni jamur yang tumbuh, lalu diukur hambatannya untuk kemudian ditentukan mana sampel senyawa yang aktif sebagai antijamur.

Pemisahan. Senyawa yang positif sebagai antijamur lalu akan dipisahkan dengan metode TLC preparatif, menggunakan campuran eluen yang berbeda. Penentuan eluen dilakukan dengan TLC memakai metode "trial and error". Didapat hasil perbandingan eluen terbaik yang dapat memisahkan sampel dengan baik adalah komposisi n-heksana : etil asetat : metanol = 7 : 2 : 1. Kemudian dilakukan pemisahan dengan metode kolom kromatografi,

namun dilakukan berkali-kali tidak didapat hasil pemisahan yang baik karena Rf spot-spot pada kromatogram berdekatan sehingga pemisahan dilakukan dengan metode TLC preparatif. Disiapkan plate TLC aluminum sheets yang berukuran 10cm x 10cm, sampel ditotolkan di atas permukaan bawah plate TLC dengan jarak 1cm dari pinggir bawah plate. Kemudian plate dimasukkan ke dalam eluen yang telah dijenuhkan dalam bejana tertutup lalu dibiarkan sampai eluen mencapai batas atas dari plate. Plate kemudian diambil, dianginanginkan sampai kering, lalu spot dilihat dengan UV untuk dapat melihat letak spot-spot yang terbentuk. Kemudian spot-spot yang sudah ditandai dikeruk, lalu dilarutkan dengan pelarut etil asetat, kemudian disaring dan filtratnya ditampung. Filtrat yang didapat kemudian diuapkan untuk mendapatkan sampel yang bebas pelarut. Kemudian sampel-sampel dari pemisahan tersebut diuji aktivitas anti jamurnya dengan metode cakram.

Uji Aktifitas II. Karena keterbatasan sampel yang didapat dari hasil isolasi maka untuk uji aktifitas kedua tidak dilakukan dengan metode campur tetapi dengan metode cakram. Persiapan media PDA sama dengan pada pengujian pertama, hanya saja bedanya sampel aktif tidak dicampurkan ke dalam media. Dibuat suspensi spora/miselium: dituang aquadest steril ke dalam *petridish* berisi penuh isolat murni jamur uji, kemudian gugurkan/rontokkan spora/miselium jamur dengan menggosok-gosokkan kuas steril secara perlahan agar media tidak turut terangkat. Suspensi spora/miselium yang didapat ditempatkan dalam tabung reaksi steril. Penanaman jamur dilakukan dengan menggunakan cara sebaran (*spread plate*) yakni dengan mengambil 0,1 mL suspensi spora/miselium tuang ke permukaan media PDA yang sudah siap, lalu ratakan suspensi di atas permukaan media dengan menggunakan gelas trigalsky steril. Diambil cakram kertas saring steril ukuran diameter 0,9 cm, celupkan dalam larutan sampel aktif dalam DMSO sampai jenuh, kemudian letakkan cakram ditengah-tengah permukaan media. Kemudian media uji ditempatkan dalam laminar selama 36 jam. Lalu lakukan pengukuran diameter zona hambat (daerah bening sekitar kertas cakram yang tidak ditumbuhi oleh jamur uji). Sampel-sampel hasil isolasi yang aktif terhadap jamur uji kemudian diidentifikasi jenis senyawa dan strukturnya dengan menggunakan instrumen IR dan proton NMR.

PEMBAHASAN

Ekstrak dari beberapa spesies rumput laut tersebut diperoleh ekstrak dengan kenampakan warna yang berbeda-beda. Ekstrak benzena dari *Eucheuma cottonii* hijau berwarna hijau bening, ekstrak kloroformnya berwarna kekuningan, dan warna hijau kecoklatan untuk ekstrak metanol. Ekstrak benzena *Eucheumacottonii* coklat berwarna coklat muda, ekstrak kloroformnya berwarna bening agak merah, dan warna coklat kemerahan untuk ekstrak metanol. Sedangkan ekstrak benzena

dari rumput laut *Echeuma spinosum* yang berwarna merah kecoklatan menghasilkan ekstrak yang berwarna merah tua, untuk ekstrak kloroformnya berwarna merah pekat, dan warna merah kehitaman untuk ekstrak metanol. Warna sampel setelah pelarut diuapkan menjadi hijau kehitaman sampai coklat tua sekali, dan sampel sudah berbebas dari pelarut.

Uji aktifitas sampel rumput laut terhadap beberapa jenis jamur uji memberikan hasil sebagai berikut :

Tabel 1. Hasil pengukuran uji keaktifan sampel terhadap jamur uji.

	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Pythium sp</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Sclerotium rolfsii</i>
Ec.Coklat. M	-	+	-	+
Ec. Coklat. Cl	-	-	-	-
Ec. Coklat. Bz	+++	0	+	+++
Ec. Hijau. M	+	+	+	+
Ec. Hijau. Cl	-	-	-	+
Ec. Hijau. Bz	+++	0	+	+++
Es. M	++	++	++	++
Es. Cl	-	+	-	+
Es. Bz	-	0	++	+++
Kontrol	-	-	-	-

Keterangan:

- (+++) sangat aktif, nilai H>75%
- (++) aktif, nilai H 51-75%
- (+) kurang aktif, nilai H 50-<51%
- (-) tidak aktif
- M : metanol Cl : kloroform Bz : benzena
- Ec : *Eucheuma cottonii* Es : *E. spinosum*

Keaktifan terbesar diberikan oleh ekstrak benzena dengan hambatan lebih dari 75%, ekstrak metanol aktif juga tetapi lebih rendah hanya mampu menghambat kurang dari setengah pertumbuhan jamur. Kecuali ekstrak metanol untuk semua sampel spesies *Eucheuma spinosum* aktif menghambat semua jamur uji, ekstrak benzenanya juga aktif kecuali terhadap jamur *Fusarium*.

Keaktifan terbesar diberikan oleh ekstrak benzena dengan hambatan lebih dari 75%, ekstrak metanol aktif juga tetapi lebih rendah, hanya mampu menghambat kurang dari setengah pertumbuhan jamur. Kecuali ekstrak metanol untuk semua sampel spesies *Eucheuma spinosum* aktif menghambat semua

jamur uji, ekstrak benzennya juga aktif kecuali terhadap jamur *Fusarium*. Keaktifan terbesar diberikan oleh ekstrak benzena dengan hambatan lebih dari 75%, ekstrak metanol aktif juga tetapi lebih rendah hanya mampu menghambat kurang dari setengah pertumbuhan jamur. Kecuali ekstrak metanol untuk semua sampel spesies *Eucheuma spinosum* aktif menghambat semua jamur uji, ekstrak benzennya juga aktif kecuali terhadap jamur *Fusarium*.

Hasil pengujian keaktifan kedua sampel-sampel hasil isolasi preparatif terhadap 4 jenis jamur uji, seperti pada pengujian pertama, memberikan hasil sebagai berikut:

Tabel 2. Hasil pengukuran diameter zona hambat sampel hasil fraksinasi

	<i>Fusarium oxysporum</i> (cm)	<i>Aspergillus flavus</i> (cm)	<i>Sclerotium rolfsii</i> (cm)
Fraksi 1	0,9	-	2,4
Fraksi 2	-	-	2,0
Fraksi 3	1,0	-	2,3
Fraksi 4	1,05	-	2,1
Fraksi 5	1,0	-	2,3
Kontrol (-)	-	-	-
Kontrol (+) 1	2,0	1,9	-
Kontrol (+) 2	1,6	1,7	-

Keterangan :

- Dosis digunakan dosis aplikasi fungisida di lapangan = 3 g/L.
- Pengujian dengan metode cakram, diameter cakram 0,9 cm.
- Kontrol (+) : PDA, antibiotik, larutan Dithan M-45 dalam DMSO
- Kontrol (+) : PDA, antibiotik, larutan Antracol dalam DMSO.
- Kontrol (-) : PDA, antibiotik, pelarut DMSO.

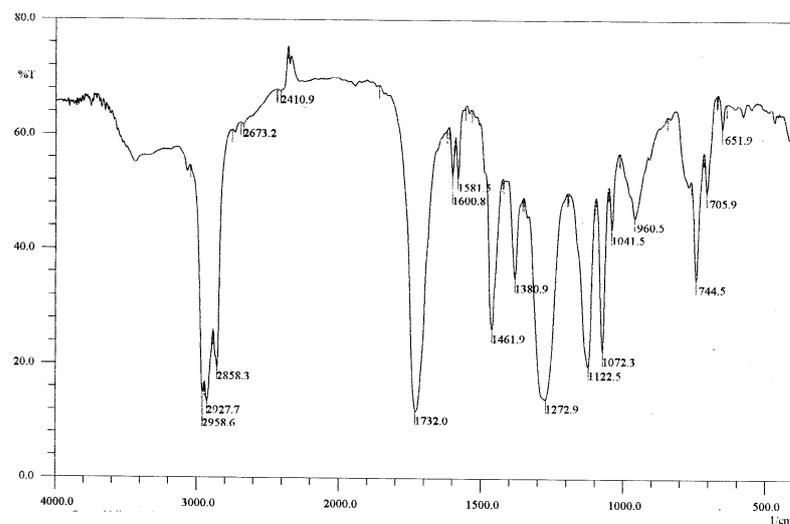
Secara umum fraksi-fraksi hasil pemisahan menunjukkan keaktifannya yang positif menghambat jamur uji *Sclerotium rolfsii* karena terbentuknya zona hambatan, sedangkan kontrol tidak menunjukkan penghambatan terhadap pertumbuhan jamur uji karena tidak terbentuk zona hambat. Terhadap jamur uji *Fusarium oxysporum*, keaktifan fraksi-fraksi masih dibawah kontrol karena diameter zona hambatannya lebih kecil daripada diameter zona hambat kontrol, akan tetapi dapat dikategorikan menghambat karena diameter zona hambatannya lebih besar dari diameter cakram.

Kontrol fungisida yang digunakan adalah fungisida non sistemik yang biasa digunakan petani di lapangan untuk memberantas serangan jamur patogen, jamur

parasit, dan jamur penyebab penyakit yang lainnya. Fenomena bahwa kedua fungisida tidak aktif terhadap *Sclerotium oxysprum* adalah karena pada label kemasannya, spesifikasi fungisida ini tidak terdapat keterangan untuk mengendalikan penyakit tanaman akibat serangan jamur tersebut. Sedangkan fraksi-fraksi tidak menunjukkan penghambatan pada jenis jamur *Aspergillus flavus* yang dihambat sangat positif oleh fungisida.

Ekstrak kasar *Eucheuma cottonii* yang sangat aktif menghambat jamur *Fusarium oxysporum* dan jamur *Sclerotium rolfsii* coba dianalisis struktur senyawanya menggunakan instrumen IR dan proton NMR.

Hasil analisis IR ekstrak kasar ini disajikan pada gambar berikut :

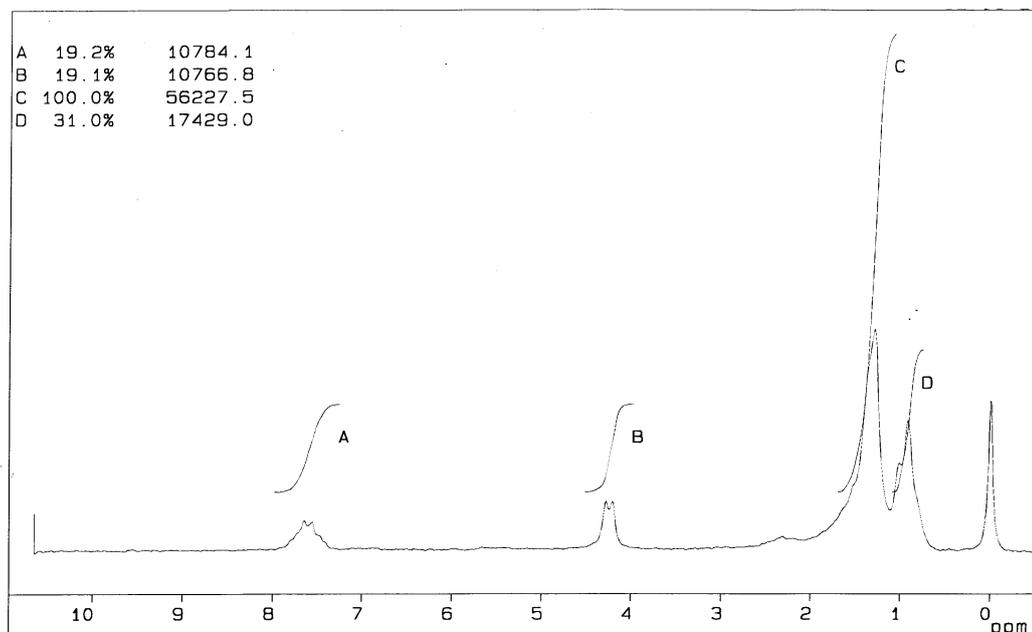


Gambar 1. Spektra IR ekstrak kasar *Eucheuma cottonii*.

Dari hasil spektrometer IR dapat dianalisis lebih jauh gugus fungsi dari senyawa ekstrak kasar rumput laut tersebut. Spektrum yang dihasilkan cukup bagus karena munculnya pita-pita yang sangat tajam pada hasil spektra. Kesimpulannya senyawa ini mengandung cincin benzen tersubstitusi, gugus

ester, gugus amina, dan gugus alkil dan metilen dalam jumlah yang cukup banyak.

Untuk dapat menentukan struktur senyawa tersebut hasil spektra proton NMR akan dapat membantu menganalisis bagaimana kira-kira struktur senyawanya yang mungkin.



Gambar 2. Spektra proton NMR ekstrak kasar *Eucheuma cottonii*.

Tabel 3. Hasil identifikasi spektrum proton NMR ekstrak kasar tersebut.

Sinyal/Jenis proton	Pergeseran kimia δ (ppm)	Integrasi	Kenampakan	Keterangan
Proton A	7,38 – 7,6	21 mm (2H)	Multiplet	Benzena
Proton B	4,25	21 mm (2H)	Doblet	Alkil CH ₂
Proton C	1,15	108 mm (12H)	Singlet	Metilen
Proton D	0,8	34 mm (4H)	Singlet	Metilen

Berdasarkan data-data dari spektra IR dan proton NMR di atas kita dapat memberi gambaran dan melakukan pendekatan bagaimana struktur senyawa dari sampel aktif ekstrak kasar rumput laut tersebut. Analisis spektroskopi massa dari senyawa tersebut tidak dapat diperoleh sehingga struktur pastinya tidak dapat diberikan, hanya dapat didekati berdasarkan spektra IR dan proton NMR nya saja. Tetapi sebelum mengemukakan perkiraan strukturnya terlebih dahulu pendekatan dilakukan dengan penggolongan beberapa fungsida yang ada yang sudah diketahui strukturnya.

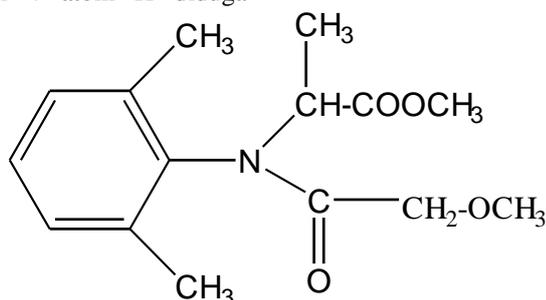
Kesimpulan awal, bahwa senyawa aktif ini yang mengandung gugus benzena dapat digolongkan ke dalam golongan senyawa aromatik. Hal ini didukung oleh spektra IR yang muncul akibat vibrasi C=C aromatik pada

frekuensi 1581,5 – 1600,8 cm⁻¹ dengan intensitas yang sedang-lemah (Sastrohamidjojo, 1991).

Pada proton NMR, sinyal A mengadakan perpecahan menjadi multiplet dengan daerah pergeseran kimia $\delta = 7,38$ ppm dan hasil integrasi setara dengan 2 atom H diduga berasal dari 2 atom hidrogen yang terikat pada cincin benzen. Sinyal B doublet dengan pergeseran kimia $\delta = 4,25$ ppm dengan hasil integrasi setara dengan 2 atom H menunjukkan bahwa satu gugus metilen yang dekat dengan gugus ester. Sinyal C, singlet pada pergeseran kimia $\delta = 1,15$ ppm dengan hasil integrasi setara dengan 12 atom H menunjukkan semua atom H tersebut identik dan berasal dari beberapa gugus metil dan tidak terpengaruh oleh proton yang berdekatan. Sinyal D dengan kenampakan pemecahan yang

kurang jelas dapat dinyatakan singlet dengan pergeseran kimia $\delta = 0,8$ ppm dan hasil integrasi setara dengan 4 atom H diduga

berasal dari atom hidrogen yang terikat pada gugus metilen.



SIMPULAN

Identifikasi senyawa-senyawa aktif tersebut dengan spektroskopi (IR dan proton NMR) diduga mempunyai struktur karboksamida dengan kerangka cincin benzena dengan gugus-gugus hidrokarbon alifatik, gugus amida, gugus ester, dan gugus aldehyd.

Untung, K., 2001. **Pengantar Pengelolaan Hama Terpadu. 1-3.** Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

DAFTAR RUJUKAN

- Amanupunjo, H.R.D., 1997, Pengaruh Bubuk Cengkeh Dalam Menekan Pertumbuhan Jamur *Sclerotium rolfsii* Penyebab Penyakit Layu Pada Kedelai, **Tesis**, Program Pascasarjana UGM, Yogyakarta. 56.
- Aslan, L.M., 1998, **Budidaya Rumput Laut. 13-24**, Penerbit Kanisius, Jakarta.
- Dahuri, R; 2003. **Keanekaragaman Hayati Laut** (aset pembangunan berkelanjutan Indonesia). PT. Gremedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Dinas Perikanan dan Kelautan Pemerintah Propinsi NTB, 2003, **Booklet**, Data & Informasi Pokok Sumberdaya Perikanan dan Kelautan NTB.
- Lewin, R.A., 1962, **Phydiology and Biochemistry**, John Willey & Sons, New York.
- Oka, I.N., 1993, **Pengantar Epidemiologi Penyakit Tanaman**, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Rismunandar, 1981, **Penyakit Tanaman Pangan & Pembasmiannya**, 54, CV, Sinar Baru, Bandung.
- Sugiarto, S.S., 1997. Inventarisasi Jamur Antagonis Terhadap *Phytophthora palmivora* pada Kakao. **Tesis**. Program Pascasarjana UGM. Yogyakarta. 18.
- Sastrohamidjojo, H., 2001. Spektroskopi. Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Tjahyadi, N., 1989, **Hama Penyakit Tanaman**, 45-46, Penerbit Kanisius, Jakarta.