Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi, Vol. 7, No. 1, 2002, 7 – 12
Akreditasi Dikti Depdiknas RI No. 69/DIKTI/Kep/2000

ISSN : 1410-0177

Fermentasi Senyawa Bioaktif dari Jamur *Trichoderma koningii* untuk Mendapatkan Bahan Baku Fungisida Alamiah Baru

Akmal Djamaan*
Jurusan Farmasi, FMIPA, Universitas Andalas, Padang

Diterima 21 Januari 2002 : Disetujui 28 Februari 2002

Abstract

The objective of this study is to produce bioactive component from *Trichoderma koningii* by fermentation process. The fermentation medium was used combination of corn water extract, sucrose, calcium carbonate, ferrosulphat, cobal chloride, and water up to 100%. The fermentation was conducted at pH 7.0, agitation 180 rpm, temperature 20-25°C for 5 days. Activity of metabolite that produced was determinated toward *Sclerotium rolfsii* every 24 hours period during the fermentation process. Product of fermentation was extracted by liquid-liquid extraction method using chloroform, aethyl acetate, n-butanol, and water respectively. Each fraction with concentration 0.1; 0.5 and 1.0% w/v were determined toward *S. rolfsii*. Result showed that the optimum time of fermentation occurred at 72 hours. The medium that produce highest activity is medium-A content of corn water extract 3%, sucrose 3%, calcium carbonate 0.5%, ferrosulphate 0.1% and water up to 100%. The n-butanol fraction refeal the highest activity toward *S. rolfsii*.

Keywords : fermentation, *Trichoderma koningii* and fungiside

Pendahuluan

Pemerintah Indonesia melalui Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) telah mencanangkan bahwa bioteknologi merupakan salah satu program unggulan dalam bidang riset dan teknologi di masa mendatang (BPPT, 1985). Dengan demikian, usaha menemukan fungisida baru dari alam, terutama yang dihasilkan oleh mikroorganisme merupakan riset bidang bioteknologi yang mempunyai prospek cerah untuk dikembangkan di Indonesia (Akmal, 1996a).

Usaha penemuan fungisida alamiah sampai sekarang terus dilakukan dengan memanfaatkan teknologi fermentasi menggunakan mikroba penghasil yang telah terbukti dapat menekan serangan hama penyakit tertentu pada tanaman. Dengan cara fermentasi mikroba tersebut dapat diinduksi pertumbuhannya agar menghasilkan metabolit sekunder dalam jumlah besar, kemudian diisolasi dan dikarakterisasi sebagai bahan baku fungisida alamiah (Akmal, 1996b; Akmal, 1996c; Imezawa, 1982). Penggunaan fungsida alamiah mempunyai banyak keuntungan dibandingkan dengan fungisida sintetis, antara lain : lebih selektif, mudah terurai, konsentrasi rendah dan tidak toksis pada manusia ataupun lingkungan (Habazar, 1993).

Trichoderma koningii merupakan salah satu jamur yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif merupa metabolit sekunder yang bersifat antibiosis dan telah terbukti efektif menghambat pertumbuhan patogen tanaman *T. koningii* secara *in-vitro* dan *in-planta* (Akmal, 1996a; Mario, 1995; Elad *et al*.,1980). Sedangkan *T. koningii* adalah patogen tanaman penyebab penyakit busuk pangkal batang pada beberapa tanaman budidaya yang telah menyebabkan kerugian yang sangat besar bagi petani selama ini. Pada tanaman Cabae dapat menyebabkan kehilangan hasil hingga 42% (Habazar, *et al*., 1996), pada tanaman kacang hijau dapat mencapai 70% dan pada tanaman kacang tanah mencapai 80% (Ayup, 1991).

Kendala yang ditemui bila menggunakan *T. koningii* ini sebagai agen biokontrol serangan *S. rolfsii* secara besar-besaran adalah dosis aplikasinya yang terlalu tinggi sehingga menimbulkan keengganan

*Penulis untuk korespondensi : Tel. 62-751-71682, Faks: 62-751-73118
E-mail : akmal64@telkom.net

para petani menggunakannya, karena membutuhkan pekerjaan tambahan dan makan waktu yang lama. Misalnya dalam bentuk substrat sekam/dedak padi dibutuhkan *T. koningii* sebanyak 9,4 ton/ha, dan bila dalam bentuk pellet dibutuhkan 4,2 ton/ha (Habazar, et al., 1996). Jadi walaupun penggunaan *T. koningii* sebagai agen pengendali hayati penyakit busuk pangkal batang tanaman cukup efektif, namun masih kurang efisien sehingga perlu dicari cara lain yang lebih sederhana dan mudah dalam penggunaannya.

Untuk itu, pada penelitian ini dicoba melakukan pendekatan lain yang belum pernah dilaporkan sebelumnya, yaitu memproduksi senyawa bioaktif dari *T. koningii* secara fermentasi penuh di laboratorium. Senyawa bioaktif yang terbentuk dapat dikembangkan dan diformulasi lebih lanjut sebagai bahan baku fungisida untuk memberantas penyakit busuk pangkal batang tanaman budidaya

Metode Penelitian

Peremajaan Jamur T. koningii

Isolat murni jamur *T. koningii* yang digunakan diperoleh dari koleksi Laboratorium Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang. Isolat ini dipindahkan ke dalam cawan Petri dan agar miring berisi medium Potato Dextrose Agar (PDA) dan diinkubasi pada suhu 25-30°C selama 5 hari. Mikroba hasil peremajaan ini digunakan untuk aktifasi dan pembuatan starter fermentasi.

Aktifasi Pertumbuhan T. koningii untuk Starter

Jamur *T. koningii* diaktifasi pertumbuhannya dalam media cair yang mengandung Ekstrak Kentang 3,0%; Pati Beras 2,5%; Kalsium Karbonat 0,1%; Air Suling 100%. Aktifasi dilakukan dalam labu erlenmeyer volume 250 ml dan diinkubasi selama 5 hari pada suhu 25-30°C. Selama inkubasi pengocokan dilakukan dengan bantuan *rotary-shaker*. Mikroba penghasil hasil aktifasi ini, akan digunakan sebagai starter pada proses fermentasi selanjutnya.

Penentuan kondisi optimum proses fermentasi T. koningii

Digunakan variasi komposisi medium fermentasi sebagai berikut : Media-1 : Air rendaman jagung 3,0%; Sukrosa 3,0%; Kalsium Karbonat 0,5%; Ferro Sulfat 0,1%; Air suling hingga 100%. Media-2 : Air rendaman jagung 3,0%; Sukrosa 3,0%; Kalsium Karbonat 0,5%; Ferro Sulfat 0,1%; Seng Sulfat 0,01%; Kobal Klorida 0,01%; Air suling hingga 100%. Fermentasi dilakukan dalam labu erlenmeyer 250 ml dan 500 ml. Starter dibuat dengan konsentrasi 3% dari volume total. Pengocokan dengan shaker dengan kecepatan pengocokan 180 rpm. pH larutan fermentasi diatur sedemikian rupa sehingga tetap 7,0. Waktu fermentasi dilakukan sampai 5 hari (120 jam). Setiap rentang waktu 24 jam selama proses fermentasi berlangsung, diambil cuplikan sebanyak 2 ml dengan tabung Eppendorf steril dari cairan fermentasi. Cairan ini dipusingkan dengan kecepatan 10.000 rpm dan filtratnya diuji aktifitasnya terhadap hambatan pertumbuhan *S. rolfsii* secara *in-vitro* dalam cawan petri. Sedangkan masa selnya dikeringkan dalam oven suhu 100°C dan ditimbang sebagai berat biomassa (Stanburry, 1984).

Pemisahan dan Fraksinasi Senyawa Bioaktif Hasil Fermentasi

Mula-mula dilakukan fermentasi ulang *T.koningii* dengan volume 1 liter, menggunakan kondisi optimum yang telah diperoleh pada percobaan sebelumnya. Fermentasi dihentikan pada saat kondisi optimum fermentasi tercapai. Sel dan filtratnya dipisahkan dengan bantuan penyaringan atau pemusingan (Nisbet, 1982). Filtrat dikocok kuat dan diekstraksi berturut-turut dengan pelarut organik kloroform, etil asetat dan n-butanol. Masing-masing diekstraksi dengan volume pelarut 300 ml dengan tiga kali pengulangan. Masing-masing fraksi senyawa bioaktif, dipekatkan dengan bantuan *vacuum evaporator*. Diperoleh 4 macam serbuk senyawa bioaktif hasil fraksinasi yaitu : fraksi kloroform, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol dan fraksi air (fraksi sisa). Ke empat senyawa ini dipakai untuk pengujian aktifitas selanjutnya dalam menentukan fraksi mana yang paling aktif terhadap *S. rolfsii* Sacc.

Pengujian Aktifitas Senyawa Bioaktif Hasil Fraksinasi Terhadap Hambatan Pertumbuhan S. rolfsii Sacc.

Pengujian dilakukan secara *in-vitro* menggunakan ke empat senyawa hasil fraksinasi yang telah diperoleh dari percobaan-4. Sebagai medium pembenihan digunakan PDA. Konsentrasi larutan uji dibuat dengan beberapa variasi konsentrasi dengan air suling steril. Jamur *S. rolfsii* sebagai mikroba uji ditanamkan pada media-agar dalam cawan petri. Ke dalam masing-masing larutan uji dicelupkan kertas cakram steril, kemudian diletakan di atas permukaan media agar yang telah diinokulasikan dengan *S. rolfsii*. Inkubasi dilakukan pada suhu 25-30^{0}C selama 3 hari (Arret, 1971). Setelah masa inkubasi, diamati aktifitas hambatan pertumbuhan *S. rolfsii* yang terbentuk dan diukur diameternya dengan bantuan jangka sorong. Dari percobaan ini akan diketahui, dari ke empat senyawa uji, fraksi mana yang memberikan aktifitas tertinggi dalam menghambat pertumbuhan *S. rolfsii*.

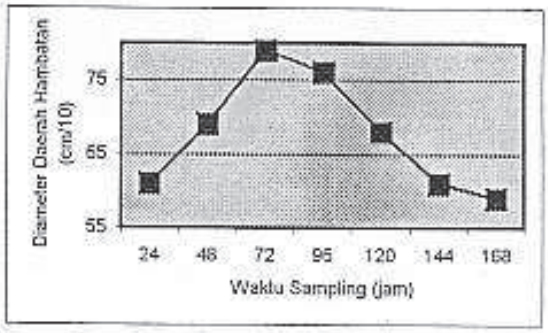
Analisis Data

Data yang diperoleh ditabulasikan dan dibuat profil aktifitas yang dihasilkan pada berbagai waktu sampling dan pada berbagai konsentrasi larutan uji hasil fraksinasi.

Hasil dan Pembahasan

Jamur *T. koningii* yang berpotensi menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang aktif menghambat pertumbuhan *S. rolfsii* Sacc., sebelum digunakan diremajakan terlebih dahulu dalam media agar miring PDA, kemudian baru diaktifasi dalam medium cair yang berguna sebagai starter (inokulum). Sebagai media cair untuk starter digunakan ekstrak kentang, pati terlarut dan kalsium karbonat. Tujuannya adalah untuk mendapatkan starter yang aktif pertumbuhannya bila dipindahkan ke medium fermentasi. Pada proses fermentasi yang dilakukan digunakan jumlah starter sebanyak 10% dari volume total medium. Hal ini merupakan jumlah terbaik yang dilaporkan pada proses fermentasi antibiotika lainnya (Wibowo, 1993).

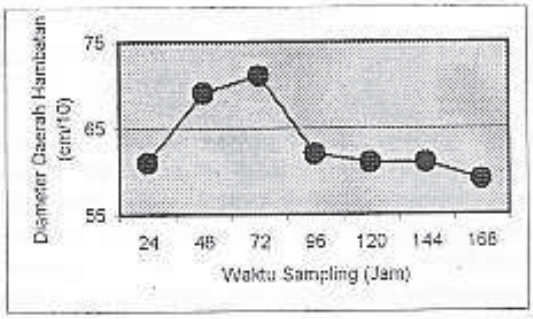
Sebagai media fermentasi digunakan komposisi yang mengandung air rendaman jagung, sukrosa dan beberapa logam mineral seperti kalsium karbonat, ferrosulfat, magensium klorida, seng sulfat dan kobal klorida. Komposisi media fermentasi ini sangat berpengaruh terhadap jumlah produk metabolit yang dihasilkan (Akmal, 1995). Pada percobaan ini, pengocokan (agitasi) dilakukan dengan bantuan *rotary shaker* dengan kecepatan 180 rpm dan inkubasi pada suhu 25-30^{0}C. Hasil percobaan menunjukkan bahwa kedua komposisi media (Media A dan B) menghasilkan produk metabolit sekunder yang aktif terhadap pertumbuhan *S. rolfsii* Sacc. Dari kedua media fermentasi ini, ternyata media A menghasilkan aktifitas antibiotika yang lebih baik dibandingkan dengan media B (Gambar 1 dan 2). Hal ini dapat dilihat dari besarnya diameter hambatan pertumbuhan *S. rolfsii* Sacc. Yang diperlihatkan. Aktivitas tertinggi dicapai setelah 72 jam fermentasi dengan diameter hambatan pertumbuhan sebesar 80 cm/10. Dari percobaan ini juga diketahui bahwa ternyata penambahan logam seng sulfat dan kobal klorida masing-masing sebanyak 0,1% (media B) tidak meningkatkan produk antibiotikanya.



Gambar 1. Profil Aktifitas Antibiotika yang Dihasilkan selama Fermentasi *T. koningii* Menggunakan Media Fermentasi A

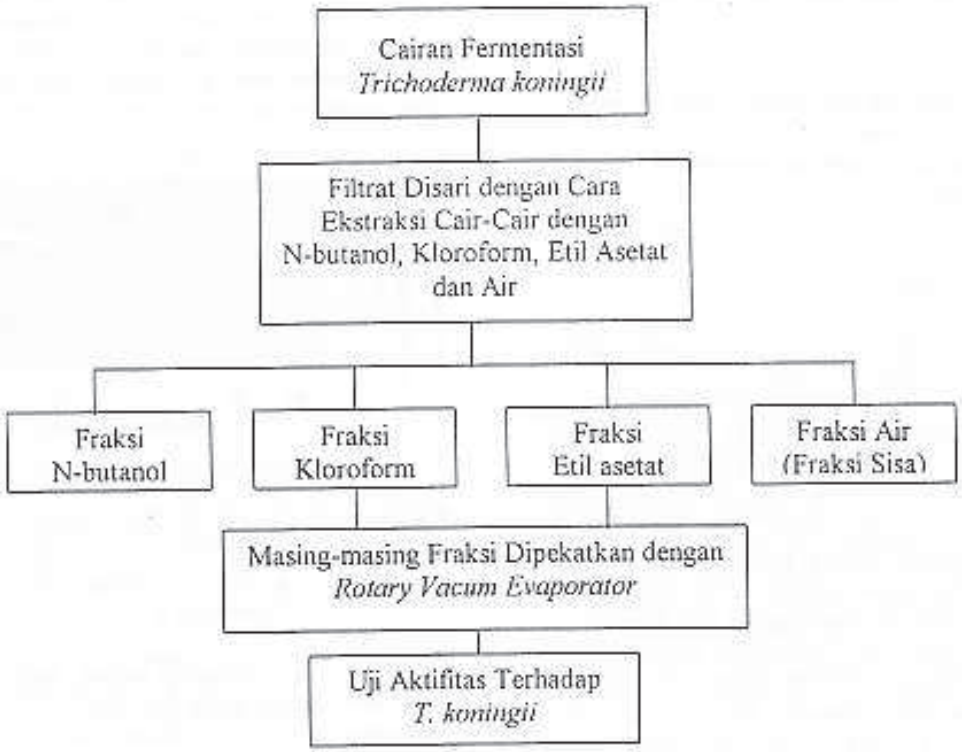
Dari data di atas diketahui bahwa waktu optimum fermentasi dicapai pada hari ke-3 (72 jam), baik menggunakan media A ataupun media B. Kondisi optimum fermentasi tersebut digunakan untuk fermentasi ulang metabolit sekunder *T. koningii* menggunakan media terbaik (media A). Fermentasi

ulang dilakukan dengan jumlah yang lebih banyak untuk mendapatkan metabolit yang lebih besar, untuk diteliti lebih lanjut.



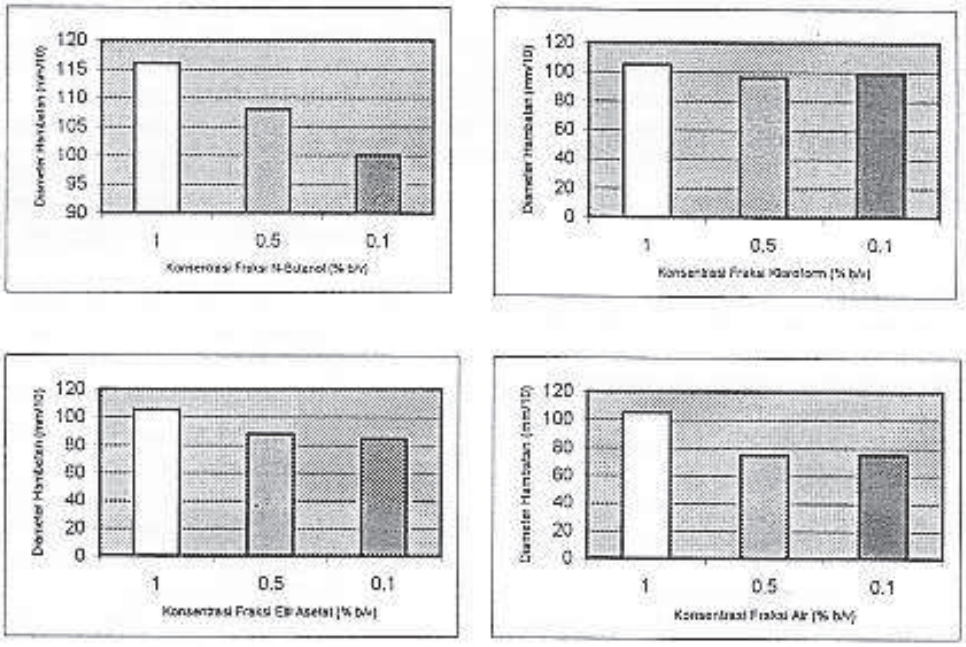
Gambar 2. Profil Aktifitas Antibiotika yang Dihasilkan selama Fermentasi *T. koningii* Menggunakan Media Fermentasi-B

Cairan hasil fermentasi disaring untuk memisahkan sel-sel mikrobanya. Kemudian filtrat yang terbentuk diisolasi dan difraksinasi dengan beberapa pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya, yaitu n-butanol, kloroform, etil asetat dan air (sisa) (Gambar 3). Ekstraksi dilakukan dengan teknik ekstraksi cair-cair (ECC) menggunakan corong pisah. Masing-masing fraksi dipekatkan dan diuapkan pelarutnya dengan bantuan *rotary evaporator* pada suhu tidak lebih dari 40°C. Pemisahan berdasarkan teknik ekstraksi cair-cair ini paling banyak digunakan dalam berbagai proses isolasi dari bahan alam ataupun dari produk fermentasi. Prinsipnya yaitu berdasarkan kelarutan zat yang akan diisolasi dari berbagai pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya. Secara teoritis, senyawa yang bersifat polar akan larut ke dalam pelarut yang juga bersifat polar, begitu juga sebaliknya senyawa yang berisfat non-polar juga akan larut ke dalam pelarut yang bersifat non-polar juga.



Gambar 3. Skema Isolasi dan Fraksinasi Cairan Hasil Fermentasi *T. kongingii*

Untuk pengujian aktifitas antibiosis terhadap *T. koningii*, masing-masing fraksi dibuat 3 macam konsentrasi larutan uji dengan air suling, yaitu 1% (b/b), 0,5% (b/b) dan 0,1% (b/b). Ternyata ke empat fraksi senyawa metabolit memperlihatkan aktifitas menghambat pertumbuhan *S. rolfsii* (Gambar 4). Dari keempat fraksi tersebut, terlihat bahwa fraksi n-butanol memperlihatkan aktifitas tertinggi dan fraksi air (sisa) memperlihatkan aktifitas terendah. Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa yang terdapat dalam cairan fermentasi tersebut terdiri dari beberapa komponen yang berkhasiat sebagai antibiosis yang mampu menghambat pertumbuhan *S. rolfsii*. Diperkirakan kelarutannya lebih besar dalam pelarut n-butanol sehingga aktifitasnyapun lebih besar dibandingkan dengan ketiga fraksi lainnya.



Gambar 4. Aktifitas Senyawa Hasil Fraksinasi Cairan Fermentasi *T. koningii* terhadap pertumbuhan *S. rolfsii* Sacc.

Penelitian ini merupakan tahapan dalam upaya mencari bahan aktif fungisida alami. Penelitian ini masih perlu dilanjutkan yaitu karakterisasi dan identifikasi metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *T. koningii*. Pada tahap ini fermentasi perlu diulangi untuk mendapatkan metabolit yang jumlahnya relatif banyak untuk dapat dianalisis selanjutnya, antara lain pemisahan dengan kromatografi lapisan tipis preparatif, purifikasi dan penentuanb spektroskopi untuk elusidasi strukturnya. Kemudian juga perlu diteliti penggunaan senyawa bioaktif tersebut langsung pada tanaman uji (*in-planta*) sehingga dapat diketahui dosis efektif penggunaannya. Aplikasinya dapat diberikan dalam bentuk tablet atau pelet sehingga dosis pemakaiannya dapat dikontrol dengan lebih tepat.

Kesimpulan dan Saran

Waktu optimum produksi metabolit sekunder dari *T. koningii* menggunakan media cair dengan

komposisi air rendaman jagung 3%, sukrosa 3%, kalsium karbonat 0,5%, ferrosulfat 0,1% dan air suling hingga 100%, adalah 3 hari (72 jam) setelah pengkulturan, pada suhu 25-30°C dan kecepatan pengocokan 180 rpm. Hasil pengujian aktifitas metabolit sekunder yang terbentuk, memperlihatkan bahwa semua senyawa hasil fraksinasi (n-butanol, kloroform, etil asetat dan air) mempunytai aktifitas antibiosis terhadap pertumbuhan *T. koningii* secara *in-vitro*. Aktifitas tertinggi diperlihatkan oleh senyawa dari fraksi n-butanol dan terendah dari fraksi air (fraksi sisa).

Disarankan untuk melanjutkan penelitian ini ke tahap selanjutnya, yaitu karakterisasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *T. koningii*, sehingga dapat digunakan lebih lanjut sebagai bahan bioaktif fungisida alami.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Depdiknas RI yang telah membiayai penelitian ini melalui Dana Penelitian Dosen Muda, Tahun Anggaran 1996/1997.

Daftar Pustaka

Akmal D, 1996a, Efek Antibiosis Biakan Jamur *Trichoderma harzianum* Terhadap *Sclerotium rolfsii* Secara *In-Vitro*, Laporan Penelitian Fakultas MIPA, Unand, Padang.

Akmal D, 1996b, Pengaruh Komposisi Media Fermentasi Terhadap Aktifitas Antibiosis dari Metabolit Sekunder yang Dihasilkan oleh Jamur *Trichoderma harzianum*, Laporan Penelitian Fakultas MIPA, Unand, Padang.

Akmal D, 1996c, Isolasi Metabolit Sekunder yang Dihasilkan oleh *Trichoderma koningii* dan Uji Aktifitasnya Terhadap *Sclerotium rolfsii* Sacc Penyebab Penyakit Busuk Pangkat Batang Tanaman Cabae, laporan Penelitian SPP/DPP Unand, Padang.

Akmal D., 1995, Produksi Garamisin Secara Fermentasi, *Jurnal Penelitian Andalas*, 18, 58-65.

Arret, B., 1971, Outline of Details for Micobiological Assays of Antibiotics, *J. Pharm. Sci.*, 60 : 11, 1689-1694.

Ayub, A., 1991, Inventarisasi Penyakit pada Tanaman Cabae dan Cara Pengendaliannya oleh Petani di Kodya Padang, Laporan Pusat Penelitian Unand, Padang.

Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, 1985, Rancangan Kebijakan Dasar Pengembangan Produksi Bahan Baku Obat di Indonesia Sampai Tahun 2000, BPPT, Jakarta.

Elad, Y., I. Chet, dan J. Katan, 1980, *Trichoderma harzianum*, A Biocontrol Agent Effective Against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*, *J. Phytopathology*, 70, 119-121.

Habazar, T, 1993, Bioteknologi dalam Menunjang Pengendalian Hama Penyakit Terpadu, *Makalah Seminar Forum Komunikasi Hasil Penelitian Bidang Bioteknologi*,Cisarua,Bogor.

Habazar,T.,A.Ayup,S.Mahyuddin,Darnetty,M. Hayati, Emariza dan Mario, 1996, Pemanfaatan Bahan Organik sebagai Substrat Pembiakan 2 Jenis *Trichoderma* dan Aplikasinya dalam Pengendalian Patogen Tanah pada Tanaman Cabae, *Makalah Seminar Hasil Penelitian*, Fakultas Pertanian Unand, Padang.

Imezawa, H., 1982, Trend in Antibiotics Research. *J.A.R.A.*, 89-101.

Mario, 1995, Pemberian Dua Jenis *Trichoderma* ke dalam Tanah untuk Menekan Serangan *Sclerotium rolfsii* Penyakit Busuk Pangkal Batang pada Dua Varietas Cabae, *Skripsi Sarjana S-1*, Fakultas Pertanian Unand.

Nisbet, L.J., 1982, Current Strategies in Research Bioactive Microbial Metabolites, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, Vol. 32, 251-270.

Stanbury,P.F. dan Whitaker,1984, Principle of Fermentation Technology, Pergamon Press, Oxford.

Wibowo, D., 1993, Teknologi Fermentasi, PAU Bioterknologi UGM, Yogyakarta.