

**ISOLASI FUNGI ENDOFIT PENGHASIL SENYAWA
ANTIMIKROBA DARI DAUN CABAI KATOKKON
(*Capsicum annum* L. var. *chinensis*)
DAN PROFIL KLT-BIOAUTOGRAFI**

**SOENDARIA INTAN
N111 09 006**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

**ISOLASI FUNGI ENDOFIT PENGHASIL SENYAWA
ANTIMIKROBA DARI DAUN CABAI KATOKKON
(*Capsicum annum* L. var. *chinensis*)
DAN PROFIL KLT-BIOAUTOGRAFI**

SKRIPSI

untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat – syarat untuk mencapai gelar sarjana

**SOENDARIA INTAN
N111 09 006**

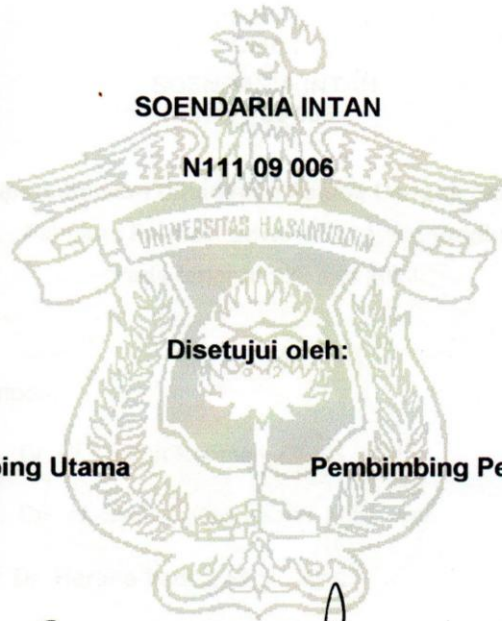
**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

PERSETUJUAN

**ISOLASI FUNGI ENDOFIT PENGHASIL SENYAWA ANTIMIKROBA DARI
DAUN CABAI KATOKKON (*Capsicum annum* L. var. *chinensis*)
DAN PROFIL KLT-BIOAUTOGRAFI**

SOENDARIA INTAN

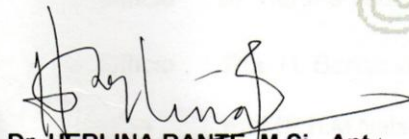
N111 09 006



Disetujui oleh:

Pembimbing Utama

Pembimbing Pertama


Dr. HERLINA RANTE, M.Si., Apt.
NIP. 19771125 200212 2 003


Drs. H. BURHANUDDIN TAEBE, M.Si., Apt.
NIP. 19480727 07903 1 001

Pada tanggal, 29 Mei 2013

PENGESAHAN

**ISOLASI FUNGI ENDOFIT PENGHASIL SENYAWA ANTIMIKROBA DARI
DAUN CABAI KATOKKON (*Capsicum annuum* L. var. *chinensis*)
DAN PROFIL KLT-BIOAUTOGRAFI**

Oleh :
SOENDARIA INTAN
N111 09 006

Dipertahankan Dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada tanggal : Mei 2013

Panitia Penguji Skripsi :

1. Ketua : Dr. Hj. Latifah Rahman, DESS., Apt.
2. Sekretaris : Drs. H. Syaharuddin Kasim, M.Si., Apt
3. Ex. Officio : Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt.
4. Ex. Officio : Drs. H. Burhanuddin Taebe, M.Si., Apt.
5. Anggota : Prof.Dr.H.M.Natsir Djide, MS., Apt



Mengetahui :

**Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin**



Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA, Apt.
NIP. 19560114 198601 2 001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini adalah karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, Mei 2013

Penyusun

Soendaria Intan

ABSTRAK

Fungi endofit kini banyak dieksplorasi sebagai alternatif senyawa bioaktif karena kemampuannya menghasilkan metabolit yang potensial untuk dikembangkan menjadi bahan baku obat. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat fungi endofit yang mampu menghasilkan senyawa antimikroba. Penelitian ini dilakukan dengan cara mengisolasi fungi endofit dari daun tanaman cabai katokkon (*Capsicum annuum* L.var.*chinensis*). Isolat yang diperoleh kemudian digunakan untuk produksi senyawa melalui proses fermentasi. Pada akhir proses fermentasi, media fermentasi diekstraksi dengan etil asetat. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya dianalisa profil KLTnya dan diuji aktivitas serta KLT-bioautografinya. Proses isolasi menghasilkan 2 isolat yang diberi kode DC-1 dan DC-2, hasil uji antagonis isolat DC-1 menunjukkan penghambatan yang paling tinggi. Hasil uji dengan metode difusi menunjukkan bahwa pada konsentrasi ekstrak 10 µL/disk mampu menghambat pertumbuhan *Eschericia coli* (29,50mm), *Staphylococcus aureus* (16,50mm) dan *Pseudomonas aeruginosa* (19,00mm). Hasil bioautografi *agar-overlay* menunjukkan bahwa senyawa aktif yang ada dalam ekstrak etil asetat media fermentasi memiliki Rf 0,54 cm aktif terhadap bakteri *Eschericia coli* (18,3mm) dengan perbandingan fase gerak heksan : etil asetat 1:5. Ekstrak etil asetat dari media fermentasi isolat DC-1 diduga merupakan golongan senyawa terpenoid dan alkaloid. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jamur endofit pada daun cabai katokkon mampu menghasilkan senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme.

Kata Kunci : Fungi endofit, Cabai katokkon, antimikroba

ABSTRACT

Endophytic fungi had been widely explored as an alternative source of bioactive compound because its ability to produce metabolites that have potency to be developed as drug materials. The aim of this study was to acquire endophytic fungi isolate that had ability to produce antimicrobial compounds. This study was conducted by isolating endophytic fungi from “cabai katokkon” (*Capsicum annum* L.var.*chinensis*) leaf. Then, isolates were used to produce active compounds through fermentation process. In the end of the process, fermentation media was extracted with ethyl acetate. After that, acquired extracts were analyzed to find out its TLC profile. Its activity and TLC-bioautography were also tested. two isolates were acquired and one of them shows highest inhibition score, which is isolate DC-1. The result of diffusion method test shows that in concentration of 10 μ L/disk could inhibit *Escherichia coli* (29,50mm), *Staphylococcus aureus* (16,50mm) and *Pseudomonas aeruginosa* (19,00mm) growth. Agar-overlay bioautography result shows that the active compound in ethyl acetate extract of fermentation media had an Rf value of 0,54 cm which is active against *Escherichia coli* (18,3 mm) with eluen hecsan :ethyl acetate 1:5. The ethyl acetate extract of fermentation media of isolate DC-1 maybe from terpenoid and alkaloid group. The result of this study shows that endophytic fungi from “cabai katokkon” leaf could produce active compound that had ability to inhibit microbial growth.

Keywords: Endophytic fungi, katokkon leaf, antimicrobial activity

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, puji syukur penulis kekhadirat Allah Yang Maha Kuasa dan Maha Penyayang karena berkat dan izin-Nya sehingga penulis berhasil menyelesaikan skripsi ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Shalawat dan salam kepada junjungan Nabi Besar Muhammad SAW.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini banyak rintangan dan hambatan yang dihadapi, namun dengan doa dan bantuan dari berbagai pihak, skripsi ini dapat terselesaikan. Oleh karena itu, perkenankanlah penulis mengungkapkan rasa terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada ayahanda Ir.Yustan Intan dan ibunda tersayang Indo Upe yang telah banyak memberikan pengorbanan baik moril maupun materil yang tidak akan mampu penulis balas sampai akhir hayat, di dalam doa yang senantiasa dipanjatkan. Penulis juga menyampaikan rasa terima kasih kepada adik tercinta Muhammad Imam Shobri Nur intan yang selalu memberikan rasa kasih dan sayangnya, begitupula dengan seluruh sanak famili yang tak dapat penulis sebutkan satu persatu yang senantiasa memberikan dorongan dalam dunia perkuliahan.

Tiada kata yang dapat penulis ucapkan selain terima kasih yang sebesar-besarnya kepada ibu Dr.Herlina Rante M.Si, Apt selaku Pembimbing Utama dan bapak Drs. H. Burhanuddin M.Si, Apt selaku Pembimbing Pertama dan Penasehat Akademik Penulis yang telah meluangkan waktu selama ini untuk memberi petunjuk, membagi ilmu dan menyumbangkan

fikiran dalam membimbing penulis selama melakukan penelitian hingga selesainya skripsi ini.

Pada kesempatan kali ini pula, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dekan, Wakil Dekan, Ibu Dr. Hj. Latifah Rahman, DESS., Apt. , Bapak Drs. H. Syaharuddin Kasim, M.Si., Apt dan Bapak Prof.Dr.H.M.Natsir Djide, MS., Apt selaku penguji penulis serta seluruh dosen dan staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas bantuannya dalam penyelesaian skripsi ini
2. Saudara Suhermawan, Nasriah, Ayu Asyhari, Riskah Mathar, Khairul Amry dan Pratiwi Syarifuddin atas segala waktu, dan bantuan yang diberikan kepada penulis dalam dunia perkuliahan
3. Saudari lin Fitriana Pakata selaku teman Penelitian Cabai Katokkon
4. Saudara-saudara Asisten Laboratorium Farmasetika.
5. Saudara-saudara selaku rekan penelitian Fungi Endofit.
6. Saudara-saudara seangkatan Ginkgo 2009.
7. Haslia S.Si. selaku Laboran Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Hasanuddin
8. Arti selaku Laboran Laboratorium Fitokimia Farmasi Universitas Hasanuddin
9. Sumiati S.Si. selaku Laboran Laboratorium Farmasetika Farmasi Universitas Hasanuddin

10. Semua pihak yang tidak disebutkan namanya atas bantuan dan kerjasamanya kepada penulis selama penelitian dan menjalani penelitian

Penulis menyadari skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Maka dari itu saran dan kritik sangat penulis harapkan guna menambah wawasan agar dalam pengerjaan penelitian selanjutnya dapat lebih baik.

Akhirnya semoga karya ini memberikan manfaat bagi keilmuan Farmasi dan kepada masyarakat.

Makassar, Mei 2013

Soendaria Intan

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT.....	vii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	viii
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
PENDAHULUAN.....	1
TINJAUAN PUSTAKA.....	5
II.1 Uraian Tanaman	5
II.1.1 Morfologi	5
II.1.2 Klasifikasi.....	5
II.2 Fungi Endofit.....	6
II.3 Antimikroba.....	9
II.4 Isolasi Fungi Endofit	12
II.5 Uji Aktivitas Antimikroba dengan Metode Difusi Agar ...	14
II. 6 Metabolit Sekunder dari Fungi Endofit.....	16
II.7 Produksi Metabolit Sekunder	18
II.8 Metode KLT-Bioautografi	23

II.8.1 Kromatografi Lapis Tipis.....	23
II.8.2 Bioautografi	25
II.9 Mikroba Uji	27
METODE PENELITIAN.....	31
III.1 Alat dan Bahan yang digunakan	31
III.1.1 Alat.....	31
III.1.2 Bahan.....	31
III.2 Prosedur Penelitian.....	31
III.2.1 Sterilisasi alat	31
III.2.2 Pengambilan dan Penyiapan Sampel Penelitian.....	32
III.2.2.1 Pengambilan Sampel	32
III.2.2.2 Pengolahan Sampel	32
III.3 Penyiapan mikroba uji.....	32
III.4 Pembuatan Medium	33
III.4.1 Pembuatan Potato Dekstrosa Agar (PDA)	33
III.4.2 Pembuatan Potato Dekstrosa Yeast (PDY).....	33
III.4.3 Pembuatan Potato Dekstrosa Broth (PDB)	33
III.4.4 Pembuatan Nutrien Agar (NA)	33
III.5 Isolasi Mikroba Endofit	34
III.6 Pemurnian Fungi Endofit.....	34
III.7 Uji Aktivitas Fungi Endofit.....	35
III.7.1 Uji Aktivitas Antimikroba Fungi Endofit.....	35
III.7.2 Fermentasi Isolat.....	35

III.7.3 Ekstraksi Isolat	36
III.7.4 Uji Aktivitas terhadap <i>Malassezia furfur</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
III.8 Pengujian KLT-Bioautografi	37
III.9 Pengukuran Zona Hambat	37
III.10 Pengumpulan dan Analisis Data	38
III.11 Penarikan Kesimpulan	38
HASIL DAN PEMBAHASAN	39
IV.1 Hasil Isolasi Fungi Endofit.....	39
IV.2 Hasil Uji Antagonis Fungi Endofit.....	40
IV.3 Hasil Fermentasi Fungi Endofit.....	42
IV.4 Ekstraksi Metabolit Sekunder Fungi Endofit	44
IV.5 Uji KLT Bioautografi Ekstrak Etil Asetat dari Isolat A .	46
KESIMPULAN DAN SARAN	49
V.1 Kesimpulan	49
V.2 Saran	49
DAFTAR PUSTAKA.....	50
Lampiran.....	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Koloni murni fungi endofit daun cabai katokkon.....	39
Gambar 2. Uji Antagonis fungi endofit isolat daun cabai katokkon .	41
Gambar 3. Kurva diameter hambatan fermentat fungi endofit isolat DC-1 terhadap lama fermentasi	44
Gambar 4. Ekstrak fungi endofit Isolat DC-1 daun cabai katokkon	46
Gambar 5. Uji KLT-Bioautografi fungi endofit Ekstrak Isolat DC-1 daun cabai katokkon	48
Gambar 6. Tanaman cabai katokkon	60
Gambar 7. Produksi dan Fermentasi Fungi Endofit Isolat DC-1 daun cabai katokkon	60
Gambar 8. Kromatogram Ekstrak Isolat DC-1 daun cabai katokkon	60
Gambar 9. Identifikasi Ekstrak Isolat DC-1 daun cabai katokkon...	61
Gambar 10. Uji KLT-Bioautografi Ekstrak Isolat DC-1 daun cabai katokkon terhadap bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
Gambar 11. Uji KLT-Bioautografi Ekstrak Isolat DC-1 daun cabai katokkon terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	61

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Karakterisasi makroskopik isolat fungi endofit	40
Tabel 2. Hasil pengujian aktivitas antimikroba	41
Tabel 3. Hasil pengujian aktivitas antimikroba fermentat fungi endofit isolat DC-1	43
Tabel 4. Hasil pengujian aktivitas antimikroba ekstrak isolat DC-1 .	45

BAB I

PENDAHULUAN

Antimikroba merupakan suatu produk atau bahan metabolit yang dihasilkan oleh satu jenis mikroorganisme yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme lainnya. Bahan metabolit yang dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme disebut antibiotika dan cara kerjanya disebut antibiosis. Antibiotika tersebar di alam bebas, tetapi hanya beberapa yang tidak toksik dipakai dalam pengobatan dan kebanyakan diperoleh dari genus *Bacillus*, *Pinicillium* dan *trepomyces*. Sebagai contoh antibiotika alami adalah pinisilin, tetrasiklin dan eritromisin. Senyawa antimikroba didefinisikan sebagai senyawa biologis atau kimia yang dapat menghambat pertumbuhan dan aktivitas mikroba (1,2).

Tanaman merupakan salah satu sumber bahan baku obat dan termasuk senyawa antimikroba. Cabai (*Capsicum sp.*) adalah salah satu dari sekian banyak tanaman obat yang khasiat serta kegunaannya telah cukup dikenal oleh masyarakat kita. Khasiat cabai yang begitu banyak tersebut disebabkan oleh senyawa kapsaisin ($C_{18}H_{27}NO_3$) yang terkandung di dalam buah cabai. Kapsaisin yang merupakan unsur aktif dan pokok yang berkhasiat terdiri dari lima komponen kapsaisinoid, yaitu nordihidro kapsaisin, dihidro kapsaisin, homo kapsaisin, dan homo dihidro kapsaisin. Senyawa senyawa tersebut bisa dijadikan obat untuk pengobatan sirkulasi darah yang tidak lancar di tangan, kaki, dan jantung. Sewaktu kita mengonsumsi cabai yang berasa pedas (buah cabai merah

mempunyai tingkat kepedasan 100-250.000 unit *scoville*), terutama cabai merah dan cabai rawit, suhu tubuh akan meningkat sehingga merangsang metabolisme tubuh. Akibatnya, sirkulasi darah menjadi lancar dan aliran nutrisi di jaringan tubuh meningkat. Selain mengandung kapsaikin, cabai juga mengandung kapsikidin. Senyawa yang terdapat di dalam biji ini berguna untuk memperlancar Sekresi asam lambung dan mencegah infeksi sistem pencernaan. Senyawa lain yang juga dimiliki cabai adalah kapsikol. Senyawa ini bisa berfungsi sebagai pengganti minyak kayu putih yang berguna untuk mengurangi pegal-pegal, rematik, sakit gigi, sesak napas, dan gatal-gatal (3).

Sebagian besar komponen kimia yang berasal dari tanaman yang digunakan sebagai obat dan bahan obat adalah merupakan metabolit sekunder. Salah satu cara terbaru dalam memproduksi senyawa metabolit sekunder sejenis yang terdapat dalam tanaman adalah dengan memanfaatkan mikroba endofit yang hidup dalam jaringan tanaman (4).

Mikroba endofit adalah organisme hidup yang berukuran mikroskopis (bakteri dan jamur) yang hidup di dalam jaringan tanaman (*xylem* dan *phloem*), daun, akar, buah, dan batang. Mikroba ini hidup bersimbiosis saling menguntungkan, dalam hal ini mikroba endofitik mendapatkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman dan memproteksi tanaman melawan herbivora, serangga, atau jaringan yang patogen sedangkan tanaman mendapatkan derivat nutrisi dan senyawa aktif yang diperlukan selama hidupnya (5).

Mikroba endofit yang terdiri atas bakteri dan jamur merupakan mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman dan membentuk koloni tanpa membahayakan inangnya. Tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang menghasilkan metabolit sekunder. Fungi endofit dapat membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Hubungan yang terjadi antara inang dan fungi endofit bukan merupakan hubungan patogenitas. Fungi endofit yang terdapat dalam tanaman memacu perkecambahan, untuk bertahan dalam kondisi yang kurang menguntungkan, mempercepat pertumbuhan, ketahanan terhadap patogen lemah, dan beberapa kasus yang dapat meningkatkan ketahanan tanaman terhadap tekanan lingkungan. Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya yang merupakan peluang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya (6,7,8).

Pemanfaatan mikroba endofit dalam memproduksi senyawa aktif memiliki beberapa kelebihan, antara lain (1) lebih cepat menghasilkan dengan mutu yang seragam, (2) dapat diproduksi dalam skala besar dan (3) kemungkinan diperoleh komponen bioaktif baru dengan memberikan kondisi yang berbeda (9).

Penelitian tentang uji aktivitas antimikroba ekstrak cabai terhadap berbagai mikroba patogen secara *in vitro* telah dilakukan oleh Dyan dkk

(2008) dengan hasil positif menunjukkan nilai KHM pada *E.coli* (7,29%), *S.aureus* (2,35%) dan *C.albicans* (7,29%).

Berdasarkan uraian di atas, permasalahan yang timbul adalah apakah dapat mengisolasi dan memperoleh metabolit sekunder fungi endofit sebagai penghasil senyawa antimikroba dari daun cabai katokkon (*Capsicum annuum* L. var. *chinensis*) yang segar maupun dari daun cabai yang telah mulai menguning asal suku Solanaceae Kabupaten Tana Toraja Provinsi Sulawesi Selatan ?. Sehubungan dengan itu telah dilakukan penelitian mengenai isolasi fungi endofit dari daun cabai katokkon (*Capsicum annuum* L. var. *chinensis*) yang segar maupun dari daun cabai yang telah mulai menguning asal suku Solanaceae Kabupaten Tana Toraja Provinsi Sulawesi Selatan. Fungi endofit diisolasi dan dilakukan uji aktivitas dengan metode difusi agar, selanjutnya dilakukan fermentasi, ekstraksi dan uji KLT-Bioautografi.

Penelitian ini bermaksud untuk untuk menguji aktivitas fungi endofit dari daun cabai katokkon (*Capsicum annuum* L var. *chinensis*) yang segar maupun dari daun cabai yang telah mulai menguning terhadap beberapa mikroba uji dan tujuan dari penelitian ini yaitu untuk memperoleh isolat fungi endofit yang merupakan senyawa antimikroba.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman

II.1.1 Morfologi

Habitus semak, sistem perakaran tunggang, batang bulat, bercabang. Bangun daun bulat telur, ujung daun meruncing, pangkal daun runcing, tepi daun rata, pertulangan daun menyirip, warna daun hijau, dan daging daun seperti kertas. Mahkota bunga berlekatan. Buah berbentuk bakul(katokkon, bahasa Toraja) keluar dari ketiak daun, pada saat masih muda buah berwarna hijau muda sampai keungu-unguan, kuning dan setelah masak berwarna merah terang. Buah Lombok katokkon tergolong buah berukuran pendek berlekuk panjang 3-4 cm dan lebar 2,5-3,5 cm. jika dipotong akan mengeluarkan aroma khas terasa pedis, jumlah sekat ada 3 ruang tidak sama besar, biji terletak di sudut tengah sekat buah (axillaris). Sympetalae artinya mahkota bunga saling berlekatan. Tubiflorae artinya susunan mahkota bunga bersatu membentuk susunan seperti tabung/lonceng. Kelompok Suku Solanaceae artinya tanaman terong-terongan.

II.1.2 Klasifikasi

Tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah daun cabai katokkon (*Capsicum annum* L.var. *chinensis*). Identifikasi tanaman yang

digunakan dilakukan oleh Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta (Lampiran 1).

Regnum	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Anak Kelas	: Sympetaleae
Bangsa	: Solanales/tubiflorae
Famili	: Solanaceae
Genus	: Capsicum
Spesies	: <i>Capsicum annum</i> L.var. <i>chinensis</i> (Lampiran 1)

II.2 Fungi Endofit

Fungi merupakan protista nonfotosintetis yang tumbuh dengan bercabang, jalinan filament (*hifa*) yang dikenal dengan sebutan miselium (*mycelium*). Meskipun hifa memiliki sekat atau septa, akan tetapi septa umumnya memiliki pori yang cukup besar sehingga ribosom, mitokondria dan bahkan nukleus dapat mengalir dari satu sel ke sel lain. Jadi secara utuh, organisme ini adalah *coenocytes* (bentukan berinti banyak dengan sitoplasma saling berhubungan) berada dalam deretan tabung-tabung yang bercabang. Tabung-tabung ini dibentuk dari polisakarida seperti khitin, yang mirip dengan dinding sel. Bentuk miselial disebut mold, jenis lain seperti ragi, tidak membentuk miselium namun mudah dikenali

sebagai fungi melalui proses reproduksi seksualnya dan dari adanya bentuk-bentuk peralihan (10).

Fungi adalah eukariotika, dan sebagian besar adalah eukariotika multiseluler. Fungi mempunyai ciri-ciri spesifik antara lain: mempunyai inti sel, membentuk spora, tidak berklorofil, heterospora, saprofit, dapat berkembang biak secara aseksual maupun seksual. Meskipun fungi pernah dikelompokkan ke dalam kingdom tumbuhan, fungi adalah organisme unik yang umumnya berbeda dari eukariotika lainnya jika ditinjau dari cara memperoleh makanan, organisasi struktural, serta pertumbuhan dan reproduksi. Pada kenyataannya kajian molekuler menunjukkan bahwa fungi dan hewan kemungkinan berasal dari satu nenek moyang yang sama (11).

Endofit merupakan mikroorganisme yang tumbuh dalam jaringan tanaman tetapi tidak membahayakan inangnya, dapat diisolasi dari jaringan tanaman yang telah disterilisasi permukaan ataupun diekstraksi dari dalam jaringan tanaman. Endofit dapat memiliki beberapa efek yang menguntungkan pada inangnya dan dapat digunakan sebagai kontrol biologis bagi hama tanaman, juga dapat mempertinggi karakteristik tanaman seperti meningkatkan ketahanan terhadap kering, panas, efisiensi nitrogen, sebagai bioherbisida dan juga memiliki efek farmakologis. (12)

Pada umumnya isolat mikroba endofit adalah fungi. Fungi tumbuh dalam bentuk filamen-filamen yang tumbuh dari bagian tanaman pada

permukaan medium isolasi. Kebanyakan isolat fungi yang diperoleh termasuk dalam golongan fungi imperfekti atau deuteromisetes. Sebagian besar endofit ini menghasilkan metabolit sekunder jika dikultur fermentasi. Akan tetapi, temperatur, komposisi medium, dan derajat aerasi sangat menentukan jumlah dan macam komponen yang dihasilkan oleh fungi endofit. (13)

Fungi endofit adalah fungi yang terdapat di dalam sistem jaringan tumbuhan seperti daun, bunga, ranting ataupun akar tumbuhan. Fungi ini menginfeksi tumbuhan sehat pada jaringan tertentu dan mampu menghasilkan mikotoksin, enzim serta antibiotik (14).

Asosiasi fungi endofit dengan tumbuhan inangnya digolongkan dalam 2 kelompok (14):

1. Mutualisme konstitutif yaitu asosiasi yang erat antara fungi dengan tumbuhan terutama rumput-rumputan. Pada kelompok ini fungi endofit menginfeksi ovula (benih) inang, dan penyebarannya melalui benih serta organ penyerbukan inang.
2. Mutualisme induktif adalah asosiasi antara fungi dengan tumbuhan inang, yang penyebarannya terjadi secara bebas melalui air dan udara. Jenis ini hanya menginfeksi bagian vegetative inang dan seringkali berada dalam keadaan metabolisme inaktif pada periode yang cukup lama.

Fungi endofit memiliki arti ekonomis penting di masa depan karena menyimpan potensi tak terbatas yang saat ini belum banyak diaplikasikan

dalam bidang industri farmasi sebagai sumber bahan baku obat dan senyawa biologis berkhasiat lainnya. Arti penting ditemukannya mikroorganisme yang mampu memproduksi senyawa berkhasiat ini dapat mengubah paradigma dalam hal pencarian bahan baku farmasi yang efektif dari bahan alam. Mengingat kebutuhan bahan baku obat yang semakin meningkat baik jumlah maupun macamnya maka potensi sumber daya alam Indonesia khususnya mikroorganisme dalam hal ini endofit perlu digali dan dikembangkan (15).

II.3 Antimikroba

Antimikroba adalah bahan-bahan atau obat-obat yang digunakan untuk memberantas infeksi mikroba pada manusia termasuk diantaranya antibiotika, antiseptika, kemoterapeutika, dan pengawet. Obat-obat yang digunakan untuk membasmi mikroorganisme yang menyebabkan infeksi pada manusia, hewan ataupun tumbuhan harus bersifat toksisitas selektif artinya obat atau zat tersebut harus bersifat sangat toksik terhadap mikroorganisme penyebab penyakit tetapi relatif tidak toksik terhadap jasad dengan inang atau hospes (16).

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antimikroba yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba yang disebut sebagai aktivitas bakteriostatik, dan ada yang bersifat membunuh mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya, masing-masing di kenal sebagai kadar hambat minimal (KHM) atau kadar bunuh minimal (KBM).

Antimikroba tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari bakteriostatik menjadi bakterisid apabila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi KHM (17).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok :

1. Antimikroba yang menghambat metabolisme sel mikroba

Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, dimana bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoat (PABA). Apabila suatu zat antimikroba menang bersaing dengan asam para amino benzoat (PABA) untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional. Akibatnya kehidupan mikroba akan terganggu. Contoh obat yaitu sulfonamida, trimetoprim, asam p-aminosalisilat (PAS) dan sulfon.

2. Penghambatan terhadap sintesis dinding sel

Dinding sel mikroba secara kimia adalah peptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat reaksi pembentukannya atau mengubahnya setelah dinding sel tersebut selesai dibentuk.

Antimikroba ini dapat menghambat sintesis atau menghambat aktivitas enzim seperti enzim transpeptidase yang dapat menimbulkan kerusakan dinding sel yang berakibat sel mengalami lisis.

Contoh basitrasin, sefalosporin, sikloserin, penisilin, vankomisin.

3. Penghambatan terhadap fungsi membran sel

Membran sitoplasma mempertahankan bahan-bahan tertentu di dalam sel dan mengatur aliran keluar masuknya bahan-bahan lain. Membran sel memelihara integritas komponen-komponen seluler. Kerusakan pada membran ini akan mengakibatkan menghambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel, akibatnya mikroba akan mati.

Jika fungsi integritas membran sitoplasma dirusak, makromolekul dan ion keluar dari sel, kemudian sel akan rusak. Dalam hal ini antimikroba dapat berinteraksi dengan sterol sitoplasma pada jamur, dan merusak membran sel bakteri Gram negatif.

Contoh amfoterisin β , kolistin, imidasol, polien, polimiksin.

4. Penghambatan terhadap sintesis protein

Hidupnya suatu sel tergantung pada terpeliharanya molekul-molekul dalam keadaan alamiah. Suatu kondisi atau substansi mengubah keadaan ini yaitu mendenaturasikan protein dengan merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali. Suhu tinggi dan konsentrasi beberapa zat kimia dapat mengakibatkan koagulasi irreversibel komponen-komponen seluler yang vital ini.

Antimikroba mempengaruhi fungsi ribosom pada mikroorganisme yang menyebabkan sintesis protein terhambat. Dimana dapat berikatan dengan ribosom 30S yang dapat menyebabkan akumulasi sintesis protein awal yang kompleks, sehingga salah dalam menerjemahkan tanda m-RNA dan menghasilkan polipeptida yang abnormal. Selain itu

juga dapat berikatan dengan ribosom 50S yang dapat menghambat ikatan asam amino baru pada rantai peptida yang memanjang. Contoh aminoglikosida, kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin dan linkomisin.

5. Penghambatan terhadap sintesis asam nukleat

DNA dan RNA memegang peranan penting dalam proses kehidupan normal sel. Hal ini berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel. Dalam hal ini mempengaruhi metabolisme asam nukleat, seperti berikatan dengan enzim DNA-dependen, RNA-polymerase bakteri, memblokir helix DNA. Contoh quinolon, pyrimethamin, rifampicin, sulfonamid, trimethoprim, trimetrexat.

II.4 Isolasi Fungi Endofit

Ada beberapa metode isolasi yang bisa diterapkan dalam mengisolasi fungi tetapi yang umum digunakan adalah dengan sterilisasi permukaan. Isolasi fungi dapat dilakukan dari jaringan tanaman, daun atau dari buah, umumnya dilakukan dengan cara meletakkan sedikit jaringan sampel secara langsung diatas permukaan medium agar pada cawan petri maupun pada agar miring. Terlebih dahulu dilakukan sterilisasi permukaan dikarenakan dikhawatirkan adanya kontaminan pada permukaan sampel. Sterilisasi permukaan dapat dilakukan dengan menggunakan (a) etanol 95% selama beberapa detik kemudian dihilangkan dengan mencuci pada air steril, (b) kemudian merendam

sampel pada larutan 1:1000 HgCl₂ selama 15-25 detik kemudian dibilas, (c) direndam dalam larutan calsium hipoklorit selama 1 menit kemudian dibilas, (d) kemudian dalam larutan H₂O₂ 50% selama 15 detik hingga 5 menit kemudian dibilas. Setelah itu sampel diletakkan diatas medium agar dan diinkubasi. (18)

Mikroorganisme yang penting dalam industri fermentasi dapat diperoleh dari berbagai sumber di alam. Untuk mendapatkan isolat mikroba dari suatu bahan yang mengandung campuran mikroba dapat dilakukan dengan beberapa cara tergantung dari mikroorganismenya antara lain :

1. Isolasi pada agar cawan

Kebanyakan bakteri, kapang dan khamir dapat membentuk koloni pada medium padat, sehingga mudah diisolasi dengan cara menyebarkan sel-sel tersebut pada agar cawan sedemikian rupa sehingga tumbuh koloni-koloni yang terpisah. Konsentrasi agar yang digunakan 1–2 %, tetapi terkadang digunakan agar yang lebih lunak untuk mengisolasi beberapa mikroba tertentu. Prosedur isolasinya dapat menggunakan metode gores yaitu dengan menggoreskan sampel di permukaan medium agar ataupun dengan metode tuang yaitu dengan cara mengencerkan kultur yang kemudian dituang kedalam cawan dan kemudian menambahkan medium agar.

2. Isolasi dalam medium cair

Beberapa bakteri terutama yang ukuran selnya besar dan kebanyakan protozoa dan ganggang tidak dapat tumbuh pada agar cawan, tetapi hanya dapat tumbuh pada kultur cair. Cara yang termudah untuk mengisolasi mikroba dalam medium cair adalah dengan metode pengenceran. Dalam metode ini, inokulum diencerkan di dalam medium steril, dan sejumlah tabung yang berisi medium diinokulasikan dengan suspensi inokulum dari masing-masing pengenceran.

3. Isolasi sel tunggal

Untuk mengisolasi sel mikroba yang ukurannya besar dan tidak dapat diisolasi dengan metode agar cawan atau pengenceran, ada suatu cara isolasi yang disebut isolasi sel tunggal. Sel mikroba yang dapat dilihat dengan perbesaran 100 kali atau kurang, setiap selnya dapat dipisahkan dan diambil dengan menggunakan pipet kapiler yang sangat halus, kemudian dicuci beberapa kali di dalam medium steril yang jumlahnya relatif besar untuk menghilangkan mikroba kontaminan yang ukurannya lebih kecil(19).

II.5 Uji Aktivitas Antimikroba dengan Metode Difusi Agar

Pada metode ini didasarkan atas perbandingan antara luas daerah hambatan yang terjadi. Beberapa modifikasi dari metode difusi yaitu difusi silinder pipih, difusi dengan mangkuk pipih, difusi dengan kertas saring, difusi Kirby-Bauer, dan difusi agar berlapis (16,20,21).

- a. Cara difusi silinder pipih. Cara ini didasarkan atas perbandingan antara luas daerah hambatan yang dibentuk larutan contoh terhadap pertumbuhan mikroba dengan daerah hambatan yang dibentuk oleh larutan pembanding. Pada cara ini digunakan plat silinder yang diletakkan pada media, kemudian larutan dimasukkan ke dalamnya.
- b. Cara difusi dengan mangkuk pipih. Cara ini sama dengan silinder pipih namun perbedaannya menggunakan lubang yang dibuat langsung pada medium.
- c. Cara difusi dengan kertas saring. Cara ini menggunakan kertas saring dengan bentuk ukuran tertentu, biasanya dengan garis tengah 0,7-1 cm, yang nantinya akan dicelupkan kedalam larutan contoh dan pembanding. Pengamatan dilakukan setelah masa inkubasi dengan melihat daerah hambatan yang terbentuk.
- d. Cara difusi Kirby-Bauer. Cara ini menggunakan alat untuk meletakkan kertas saring dan cawan yang digunakan berukuran 150 x 15 mm sehingga langsung dapat diuji dengan berbagai larutan contoh.
- e. Cara difusi agar berlapis. Cara ini merupakan modifikasi dari Kirby-Bauer. Perbedaannya pada cara ini menggunakan dua lapis agar. Lapis pertama (*based layer*), tidak mengandung mikroba, sedangkan lapis kedua (*seed layer*) mengandung mikroba.

II. 6 Metabolit Sekunder dari Fungi Endofit

Metabolit sekunder yang diproduksi oleh mikroba endofit tersebut telah berhasil diisolasi dan dimurnikan serta telah dielusidasi struktur molekulnya. Beberapa diantaranya adalah :

1. Mikroba endofit yang menghasilkan antibiotika *Cryptocandin* adalah anti-fungi yang dihasilkan oleh mikroba endofit *Cryptosporiopsis quercina* yang berhasil diisolasi dari tanaman obat *Tripterigeum wilfordii*, dan berkhasiat sebagai antijamur yang patogen terhadap manusia yaitu *Candida albicans* dan *Trichopyton spp*
2. Jenis endofit lainnya yang juga menghasilkan antibiotika berspektrum luas adalah mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman *Grevillea pteridifolia*. Endofit ini menghasilkan metabolit *kakadumycin*. Aktifitas antibakterinya sama seperti *munumbicin D*, dan *kakadumycin* ini juga berkhasiat sebagai anti malaria
3. Mikroba endofit yang memproduksi antivirus Jamur endofit *Cytonaema sp.* dapat menghasilkan metabolit *cytonic acid A* dan *B*, yang struktur molekulnya merupakan isomer p-tridepside, berkhasiat sebagai anti virus. *Cytonic acid A* dan *B* ini merupakan protease inhibitor dan dapat menghambat pertumbuhan cytomegalovirus manusia.
4. Mikroba endofit yang menghasilkan metabolit sebagai antikanker *Paclitaxel* dan derivatnya merupakan zat yang berkhasiat sebagai antikanker yang pertama kali ditemukan yang diproduksi oleh mikroba endofit. *Paclitaxel* merupakan senyawa *diterpenoid* yang didapatkan dalam tanaman *Taxus*. Senyawa yang dapat mempengaruhi molekul

tubulin dalam proses pembelahan sel-sel kanker ini, umumnya diproduksi oleh endofit *Pestalotiopsis microspora*, yang diisolasi dari tanaman *Taxus andreanae*, *T. brevifolia*, dan *T. wallichiana*. Saat ini beberapa jenis endofit lainnya telah dapat diisolasi dari berbagai jenis *Taxus* dan didapatkan berbagai senyawa yang berhasiat sebagai anti tumor. Demikian pula upaya untuk sintesisnya telah berhasil

5. Mikroba endofit penghasil zat anti malaria *Colletotrichum* sp. merupakan endofit yang diisolasi dari tanaman *Artemisia annua*, menghasilkan metabolit *artemisinin* yang sangat potensial sebagai anti malaria. Di samping itu beberapa mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman *Cinchona* spp, juga mampu menghasilkan alkaloid *cinchona* yang dapat dikembangkan sebagai sumber bahan baku obat anti malaria.

6. Endofit yang memproduksi antioksidan *Pestacin* dan *isopestacin* merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh endofit *P. microspora*. Endofit ini berhasil diisolasi dari tanaman *Terminalia morobensis*, yang tumbuh di Papua New Guinea. Baik *pestacin* ataupun *isopestacin* berhasiat sebagai antioksidan, dimana aktivitas ini diduga karena struktur molekulnya mirip dengan *flavonoid*.

7. Endofit yang menghasilkan metabolit yang berkhasiat sebagai antidiabetes Endofit *Pseudomassaria* sp yang diisolasi dari hutan lindung, menghasilkan metabolit sekunder yang bekerja seperti insulin. Senyawa ini sangat menjanjikan karena tidak sebagaimana insulin, senyawa ini tidak rusak jika diberikan peroral. Dalam uji praklinik terhadap binatang

coba membuktikan bahwa aktivitasnya sangat baik dalam menurunkan glukosa darah tikus yang diabetes. Hasil tersebut diperkirakan dapat menjadi awal dari era terapi baru untuk mengatasi diabetes di masa mendatang (22).

II.7 Produksi Metabolit Sekunder

Sistem fermentasi dapat dilakukan dengan 3 macam, yaitu :

1. Sistem *Batch*

Sistem ini adalah sistem yang paling sederhana dan sering digunakan di laboratorium untuk mendapatkan produk sel atau metabolitnya. Fermentasi sistem *batch* adalah sistem tertutup, artinya semua nutrisi yang dibutuhkan mikroba selama pertumbuhan dan pembentukan produk berada di dalam 1 fermentor. Jadi tidak ada penambahan bahan atau pengambilan hasil selama fermentasi berlangsung. Keuntungan sistem ini adalah mudah, sederhana, dan kecil kemungkinan adanya kontaminasi; sedangkan kerugiannya adalah kultur mikroba yang menua, yaitu tidak ada perbaruan pertumbuhan mikroba, pembentukan metabolit toksik yang bercampur dengan produk, konsentrasi substrat terbatas, dan sukar untuk diaplikasikan dalam skala besar.

2. Sistem *Fed-batch*

Sistem ini tidak tertutup seperti halnya sistem *batch*. Selama fermentasi, substrat, nutrisi, atau inducer dapat ditambahkan ke dalam fermentor. Sistem *fed-batch* dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu sistem volume tetap dan sistem volume berubah. Sistem volume tetap berarti setiap ada

penambahan medium baru ke dalam fermentor, ada medium lama, produk, atau sel yang dikeluarkan sebanyak medium baru yang dimasukkan fermentor; sedangkan sistem volume berubah, berarti ke dalam fermentor ditambahkan medium baru tetapi tidak ada medium lama atau produk yang dikeluarkan dari dalam fermentor. Keuntungan sistem ini adalah mudah dalam pengontrolan konsentrasi medium/substrat, pertumbuhan mikroba dapat dioptimalkan dan tingkat kebutuhan oksigen dapat dikontrol; sedangkan kerugiannya adalah membutuhkan pengetahuan tentang profil pertumbuhan mikroba, kontrol lebih ketat, dan membutuhkan peralatan dan operator yang lebih terlatih.

3. Sistem *Continuous*

Sistem fermentasi ini biasanya digunakan dalam skala industri. Sistem *continuous* adalah sistem *batch* yang fase eksponensialnya diperpanjang, dengan tetap menjaga fluktuasi nutrisi dan jumlah sel/biomassa. Mikroba diberi nutrisi/medium segar, sementara itu sejumlah sel atau medium dikeluarkan dari sistem dengan kecepatan yang sama. Hal ini menjamin tingkat kestabilan dari faktor-faktor seperti volume kultur, biomassa, konsentrasi produk dan substrat, pH, suhu, dan oksigen terlarut. Keuntungan sistem ini adalah mempunyai produktivitas dan kecepatan pertumbuhan dapat dioptimalkan, proses dalam waktu lama dapat dijalankan, dapat digunakan model sel amobil, serta faktor fisis dan lingkungan mudah dianalisis; sedangkan kerugiannya adalah tidak sesuai

dengan kaidah *Good Manufacturing Practice* sehingga dilarang digunakan untuk memproduksi produk farmasi, resiko kontaminasi yang besar, produk yang belum optimal terbentuk, dan mudah timbul perubahan/evolusi pada mikroba(23).

Ada beberapa metode yang dapat digunakan dalam proses fermentasi mikroorganisme antara lain :

1. Kultur Permukaan (*surface culture*)

Pada metode ini, medium diinokulasikan spora atau miselium fungi. Miselium akan tumbuh diseluruh permukaan medium cair membentuk suatu koloni bervariasi. Ini merupakan metode yang paling mudah dan murah, akan tetapi memiliki beberapa kerugian yaitu pertumbuhan yang tidak homogen dimana koloni terdiri dari beberapa miselium yang berbeda pertumbuhannya dan lingkungan tumbuhnya dimana miselium yang berada diatas permukaan koloni berada dalam kondisi yang lebih aerobik dibandingkan yang dibawah permukaan koloni, hal ini berkebalikan pada keadaan kontak dengan medium.

2. Kultur dengan pengocokan (*shaker culture*)

Pada metode ini medium dikocok setelah diinokulasikan spora atau miselium sehingga pertumbuhan akan tampak pada seluruh medium. Kelebihan metode ini dibandingkan dengan metode kultur permukaan yaitu pemanfaatan medium oleh mikroorganisme lebih efisien, mempercepat pertumbuhan dan pertumbuhannya lebih homogen.

3. Kultur dengan pengocokan, mengalirkan udara (*stirred aerate culture*)

Metode ini merupakan pengembangan dari metode kultur dengan pengocokan, menggunakan pengaduk medium dan jalur udara atau oksigen. Dikarenakan efisiensi pengocokan dan aerasi produksi dapat meningkat pesat dan ini merupakan metode yang paling efisien untuk memproduksi metabolit fungi dalam skala besar.

4. Kultur berkelanjutan (*continous culture*)

Metode ini dilakukan dengan cara berkala mengganti medium pada fermentor dengan medium fermentasi yang baru, hal ini akan menyebabkan proses fermentasi akan terus berlangsung. Metode ini akan sangat bermanfaat untuk penelitian laboratorium fermentasi, karena dengan menjaga ketersediaan medium baru kita dapat menjaga proses fermentasi pada tahapan yang diinginkan sementara efek yang lain dipelajari. (20)

Pada proses fermentasi terdapat beberapa faktor yang berpengaruh pada metabolit sekunder yang diperoleh yaitu :

1. pH

Selama fermentasi berlangsung, pada umumnya pH ini dapat mengganggu pertumbuhan sel dan produksi metabolit. Oleh karena itu selama fermentasi berlangsung pH harus tetap dipertahankan pada pH optimum. Untuk itu dapat dilakukan dengan penambahan buffer yang tidak dapat dirombak oleh mikroorganisme atau dengan

larutan asam atau basa dari luar, jika pH berubah, hal ini dapat dilakukan secara manual atau dengan cara otomatis.

2. Medium

Medium harus dapat menyediakan seluruh kebutuhan nutrisi mikroorganisme. Kebutuhan tersebut meliputi senyawa sumber karbon, nitrogen, mineral, vitamin dan air. Mineral dapat dibuat dari senyawa sintetis yang menyediakan nutrien-nutrien. Senyawa sintetis ini relatif murni dari strukturnya sehingga konsentrasi di dalam medium diketahui pasti. Kelebihan lainnya adalah konsentrasi di dalam medium mudah ditambah dan dikurangi, serta tidak berbuih. Kekurangannya adalah cukup mahal.

3. Suhu

Suhu dibutuhkan dalam proses fermentasi dimana pertumbuhan sel atau produksi metabolit yang tertinggi. Berdasarkan suhu tersebut, pada umumnya mikroorganisme yang digunakan adalah mikroorganisme yang bersifat mesofil dengan suhu 20-45°C dan kadang-kadang yang bersifat termofil dengan suhu optimum 45 °C.

4. Nutrien

Mikroorganisme membutuhkan senyawa sumber energi yang diperoleh dari perombakan senyawa organik maupun anorganik. Senyawa yang mengandung nitrogen dibutuhkan terutama untuk pembentukan sel dan metabolit-metabolit yang mengandung nitrogen. jenis senyawa nitrogen ini dapat

mempengaruhi proses fermentasi misalnya produksi antibiotika dapat dihambat oleh sumber nitrogen yang cepat dicerna.

5. Agitasi

Agitasi bertujuan untuk menghomogenkan penyebaran mikroorganisme, nutrisi dan oksigen di dalam medium. Kecepatan putaran agitasi di antaranya ditentukan oleh volume fermentor.

6. Aerasi

Fermentasi yang bersifat aerobik memerlukan sistem aerasi untuk mensuplai kebutuhan oksigen. Laju aerasi fermentasi berkisar 0,25-1,0 volume udara (volume medium/menit)

7. Potensial reduksi oksidasi

Potensial reduksi oksidasi (redoks) diukur dengan elektroda khusus. Interpretasi hasil pengukuran harus mempertimbangkan kemungkinan potensial redoks mikroba yang tidak sama dengan kultur/medium.(16)

II.8 Metode KLT-Bioautografi

II.8.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis atau *Thin Layer Chromatography* adalah teknik analisis sederhana untuk memisahkan komponen secara tepat berdasarkan prinsip partisi dan adsorpsi. Kromatografi lapis tipis terbuat dari lempeng gelas atau logam yang tahan karat atau lempengan tipis yang cocok sebagai penyangga.

Prinsip KLT adalah pemisahan secara fisikokimia. Pemisahan komponen kimia berdasarkan prinsip adsorpsi dan partis, dimana komponen kimia bergerak mengikuti cairan pengembang karena daya serap adsorben terhadap komponen kimia tidak sama, sehingga komponen kimia bergerak dengan kecepatan berbeda dan hal ini menyebabkan pemisahan.

Harga Rf dapat dihitung dengan menggunakan perbandingan sebagaimana dalam persamaan :

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak tempuh fase gerak}}$$

Faktor-faktor yang mempengaruhi nilai Rf dari KLT, yaitu :

1. Struktur kimia dari senyawa yang akan dipisahkan
2. Sifat dari penjerap dan derajat aktivitasnya
3. Tebal dan kerataan lapisan penjerap. Ketidakrataan akan menyebabkan aliran pelarut menjadi tidak rata
4. Pelarut dan derajat kemurniannya
5. Derajat kemurnian dari uap dalam mana bejana pengembangan yang digunakan
6. Jumlah cuplikan yang digunakan
7. Panjang trayek migrasi
8. Adanya zat asing atau pencemar
9. Kelembaban udara
10. Suhu. (24,25)

II.8.2 Bioautografi

Bioautografi adalah teknik laboratorium untuk mendeteksi zat yang mempengaruhi tingkat pertumbuhan organisme uji dalam campuran yang kompleks dan matriks. Metode ini didasarkan pada aktivitas biologis dari analit, yang dapat berupa antibakteri, antijamur, antitumor, antiprotozoa.

Bidang utama bioautografi adalah :

1. Mencari zat antibiotik baru dan baru antijamur, antitumor, dan antiprotozoae senyawa dengan mempelajari aktivitas biologis zat yang berasal dari tanaman, mikroorganisme atau kombinasi zat kimia
2. Penyelidikan antibiotik dan senyawa biologis-aktif lainnya dalam air limbah, air minum, cairan tubuh, makanan
3. Kontrol kualitas obat-obatan antibiotik
4. Mencari senyawa antimikroba yang efektif melawan bakteri patogen tanaman dan jamur
5. Deteksi dan penentuan senyawa beracun (misalnya, aflatoksin) atau fototoksik (misalnya, furocoumarins).

Metode bioautografi biasanya dibagi menjadi tiga kategori:

1. Difusi agar atau bioautografi kontak.

Dalam bioautografi kontak, antimikroba berdifusi dari plat TLC atau kertas ke agar inokulasi. Kromatogram ditempatkan menghadap ke bawah agar inokulasi dan dibiarkan selama beberapa menit atau jam untuk memungkinkan difusi. Kemudian kromatogram dipindahkan dan lapisan agar diinkubasi. Zona hambat diamati pada permukaan agar di

tempat di mana noda antimikroba yang menempel pada agar. Metode ini menyerupai alat tes disk. Kelemahan dari bioautografi kontak adalah kesulitan dalam memperoleh kontak sempurna antara agar dan plat dan kepatuhan dari adsorben ke permukaan agar. Kekurangan ini dihindari dengan menerapkan penggunaan kromatografi lembaran serat kaca asam silikat, chromar.15 Namun, dasar dari metode ini sama dan antimikroba harus ditransfer dari lembar ke agar menyebabkan kerugian dan dilusi.

2. Perendaman atau bioautografi agar-*overlay*.

Dalam bioautografi perendaman, kromatogram ditutupi dengan media, agar yang cair. Setelah pematangan, inkubasi dan noda penghambatan (biasanya dengan pencelupan tetrazolium) atau pertumbuhan koloni pertumbuhan adalah akan tampak. Kadang-kadang, sebelum inkubasi, plat yang tersisa selama beberapa jam pada suhu rendah untuk memungkinkan difusi. Agar-*overlay* adalah penggabungan antara bioautografi kontak dan bioautografi langsung. Antimikroba ditransfer dari pelat TLC ke lapisan agar seperti dalam uji kontak tetapi selama inkubasi dan visualisasi lapisan agar tetap dalam plat seperti dalam bioautografi langsung. Kerugian utama dari metode ini adalah sensitivitas yang lebih rendah disebabkan oleh cairan antibakteri dalam lapisan agar dibandingkan dengan bioautografi langsung. Agar- *overlay* disarankan terutama ketika bioautografi langsung adalah tidak memungkinkan untuk dilakukan.

3. Bioautografi langsung.

Dalam bioautografi langsung, pengembangan palt dicelupkan dalam suspensi mikroorganisme yang tumbuh dalam kaldu cocok atau suspensi ini disemprotkan ke plate. Plat ini diinkubasi dan mikroorganisme tumbuh secara langsung di atasnya. Oleh karena itu, pemisahan, penyiapan, inkubasi dan visualisasi yang dilakukan langsung di plat. Untuk lokasi dan visualisasi antibakteri garam tetrazolium biasanya digunakan, yang dikonversi oleh dehydrogenases oleh mikroorganisme hidup untuk intens berwarna, formazan. Bakteri yang dibunuh oleh antimikroba pada pelat TLC mengakibatkan warna tidak diproduksi di tempat noda antibakteri dan disebut zona penghambatan yang pucat yang terbentuk pada latar belakang berwarna(26).

II.9 Mikroba Uji

1. *Escherichia coli*

a. Klasifikasi

Divisi	: Procaryota
Kelas	: Gammaproteobacteria
Bangsa	: Enterobacteriaes
Suku	: Enterobacteriaceae
Marga	: Escherichia
Jenis	: <i>Escherichia coli</i>

b.Sifat dan Morfologi.

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang lurus, 1,1-1,5 μm x 2,0-6,0 μm , motil dengan flagelum peritrikus atau non motil. Tumbuh dengan mudah pada medium nutrisi sederhana. Laktose difermentasi oleh sebagian besar galur dengan produksi asam dan gas(27,28).

2. *Staphylococcus aureus*

a. Klasifikasi

Kerajaan	: Protophyta
Kelas	: Bacilli
Bangsa	: Bacillales
Suku	: Staphylococcaceae
Marga	: Staphylococcus
Jenis	: <i>Staphylococcus aureus</i>

b. Sifat dan Morfologi.

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram positif, sel-sel berbentuk bola, berdiameter 0,5-1,5 μm , terdapat tunggal dan berpasangan, dan secara khas membelah diri lebih dari satu bidang sehingga membentuk gerombol yang tidak teratur. Dinding sel mengandung dua komponen utama; peptidoglikan dan asam teikoat. Metabolisme secara respiratif dan fermentatif. Tumbuh lebih cepat dan lebih banyak dalam keadaan aerob. Suhu optimum 35-40°C. Terutama berasosiasi dengan kulit, dan selaput lendir

hewan berdarah panas. Kisaran inanginya luas, dan banyak galur merupakan patogen potensial(27,29).

3. *Pseudomonas aeruginosa*

a. Klasifikasi

Divisio	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Bangsa	: Pseudomonadales
Suku	: Pseudomonadaceae
Marga	: Pseudomonas
Jenis	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

b. Sifat dan Morfologi.

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri Gram negatif dengan berbentuk sel tunggal, batang lurus atau melengkung, namun tidak berbentuk heliks. Pada umumnya berukuran 0,5-1,0 μm x 1,5-4,0 μm . Motil dengan flagelum polar; monotrikus atau multitrikus. Tidak menghasilkan selongsong prosteka. Metabolisme dengan respirasi, beberapa merupakan kemolitotrof fakultatif, dapat menggunakan H_2 atau CO_2 sebagai sumber energi. Oksigen molekular merupakan penerima elektron universal, dapat melakukan denitrifikasi dengan menggunakan nitrat sebagai penerima pilihan(27,29).

4. *Malassezia furfur*

a. Klasifikasi

Kerajaan	: Fungi
----------	---------

Divisio	: Basidiomycota
Kelas	: Hymenomycetes
Bangsa	: Tremellales
Suku	: Filobasidiaceae
Marga	: <i>Malassezia</i>
Jenis	: <i>Malassezia furfur</i>

b. Sifat dan Morfologi.

Malassezia furfur merupakan flora normal dan terdapat pada mukosa dan kulit. Jamur ini berupa kelompok sel-sel bulat, bertunas, berdinding tebal, dan hifanya berbatang pendek dan bengkok. *Malassezia furfur* menghasilkan konidia sangat kecil (mikrokonidia) pada hifanya, tetapi di samping itu juga menghasilkan makrokonidia besar, multiseptat, berbentuk gelendong yang jauh lebih besar daripada mikrokonidiana(30).