

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

**SUHERMAWAN
N111 09 321**



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

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

SKRIPSI

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

**SUHERMAWAN
N111 09 321**

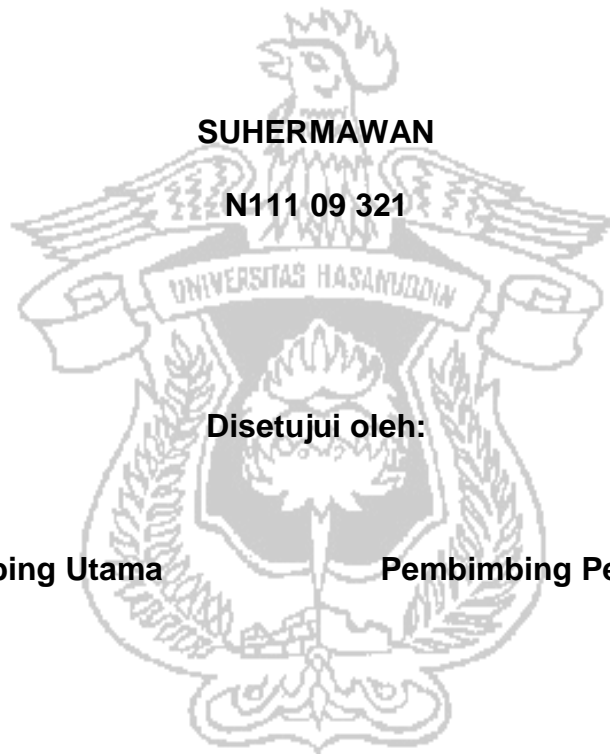
**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

PERSETUJUAN

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

SUHERMAWAN

N111 09 321



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,

Agustus 2013

PENGESAHAN

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

Oleh :

**SUHERMAWAN
N111 09 321**

Dipertahankan Dihadapan Panitia Penguji Skripsi

Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

Pada tanggal : 26 Juli 2013

Panitia Penguji Skripsi :

1. Ketua : Prof.Dr.H.M.Natsir Djide, MS., Apt
2. Sekretaris : Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt.
3. Ex. Officio : Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt.
4. Ex. Officio : Drs. H. Burhanuddin Taebe, M.Si., Apt.
5. Anggota : Drs. H. Syaharuddin Kasim, M.Si., 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, Juli 2013

Penyusun

Suhermawan

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 ibunda tersayang Bahrah yang telah banyak memberikan pengorbanan baik moril maupun materil yang tidak akan mampu penulis balas sampai akhir hayat, di dalam doa yang senantiasa dipanjatkan, 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 serta ibu Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt selaku Penasihat 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, Bapak Prof.Dr.H.M.Natsir Djide, MS., Apt., Bapak Drs. H. Syaharuddin Kasim, M.Si., Apt penguji penulis serta seluruh dosen dan staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas bantuannya dalam penyelesaian skripsi ini
2. Saudara Soendaria Intan, 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 selaku rekan penelitian Fungi Endofit.
5. Saudara-saudara seangkatan Ginkgo 2009.
6. Haslia S.Si. selaku Laboran Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Hasanuddin
7. Arti selaku Laboran Laboratorium Fitokimia Farmasi Universitas Hasanuddin
8. Sumiati S.Si. selaku Laboran Laboratorium Farmasetika Farmasi Universitas Hasanuddin
9. 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, Agustus 2013

Suhermawan

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 buah tanaman cabai katokkon (*Capsicum annum* 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 1 isolat yang diberi kode CA-1, hasil uji antagonis isolat CA-1 menunjukkan penghambatan pada mikroba uji. Hasil uji dengan metode difusi menunjukkan bahwa pada konsentrasi ekstrak 10 µL/disk mampu menghambat pertumbuhan *Eschericia coli* (16,50mm), *Staphylococcus aureus* (15,00mm) dan *Pseudomonas aeruginosa* (16,00mm). Hasil bioautografi *agar-overlay* menunjukkan bahwa senyawa aktif yang ada dalam ekstrak etil asetat media fermentasi memiliki Rf 0,8 cm aktif terhadap bakteri *Eschericia coli* (10,0mm), *Staphylococcus aureus* (8,00mm), *Pseudomonas aeruginosa* (5,00mm) dengan perbandingan fase gerak heksan : etil asetat 1:2. Ekstrak etil asetat dari media fermentasi isolat CA-1 diduga merupakan golongan senyawa terpenoid. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jamur endofit pada buah cabai katokkon mampu menghasilkan senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganismenya.

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 annuum* L.var.*chinensis*) fruit. 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 CA-1. The result of diffusion method test shows that in concentration of 10 μ L/disk could inhibit *Eschericia coli* (16,50mm), *Staphylococcus aureus* (15,00mm) and *Pseudomonas aeruginosa* (16,00mm) growth. Agar-overlay bioautography result shows that the active compound in ethyl acetate extract of fermentation media had an Rf value of 0,8 cm which is active against *Eschericia coli* (10,0mm), *Staphylococcus aureus* (8,00mm), *Pseudomonas aeruginosa* (5,00mm) with eluen hecsan :ethyl acetate 1:2. The ethyl acetate extract of fermentation media of isolate CA-1 maybe from terpenoid group. The result of this study shows that endophytic fungi from “cabai katokkon” fruit could produce active compound that had ability to inhibit microbial growth.
Keywords: Endophytic fungi, katokkon fruit, antimicrobial activity

BAB I

PENDAHULUAN

Antimikroba adalah senyawa yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Antimikroba dapat diperoleh dari berbagai jenis tumbuhan.. Penelitian-penelitian pencarian bahan antimikroba telah banyak dilakukan terutama dari berbagai jenis tumbuhan rempah-rempah. (1,2).

Cabai yang termasuk dalam marga *Capsicum* dan merupakan rempah-rempah yang paling banyak dikonsumsi di dunia. Kandungan senyawa dalam cabai yang menimbulkan rasa pedas adalah golongan oleoresin alam yang disebut kapsaisinoid. Selain menimbulkan rasa pedas, juga berfungsi sebagai antiseptik internal dan eksternal, bahan analgesik, haemolitik, sedatif dan stimulan untuk obat sakit perut, sehingga rasa pedas (kapsaisinoid) inilah yang diyakini dapat berperan sebagai antimikroba serta berkhasiat bagi kesehatan. Kapsaisinoid yang terkandung dalam cabai berkisar antara 0,1%-1% dari total komposisi cabai. Komponen kapsaisinoid terdiri dari kapsaisin (69%), dihidrokapsaisin (22%), dan tiga komponen kecil yaitu : norhidrokapsaisin (7%), homokapsaisin (1%), dan homodihidrokapsaisin (1%) (3,4,5).

Tumbuhan dikenal mengandung berbagai golongan senyawa kimia tertentu sebagai bahan obat yang mempunyai efek fisiologis terhadap organisme lain, atau sering disebut sebagai senyawa bioaktif. Salah satu sumber senyawa bioaktif yang berasal dari mikroba adalah mikroba

endofit. Mikroba endofit dapat menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang sangat potensial untuk dikembangkan menjadi obat. Mikroba endofit memiliki potensi yang besar dalam pencarian sumber-sumber obat baru. Hal ini karena mikroba merupakan organisme yang mudah ditumbuhkan, memiliki siklus hidup yang pendek dan dapat menghasilkan jumlah senyawa bioaktif dalam jumlah besar dengan metode fermentasi (2,6,7).

Bakteri dan fungi adalah jenis mikroba yang umum ditemukan sebagai mikroba endofit, akan tetapi yang banyak diisolasi adalah golongan fungi. Fungi endofit merupakan mikroba yang sebagian atau seluruh hidupnya berada dalam jaringan hidup tanaman inang dan tidak merugikan tanaman inangnya. mikroba endofit membantu kehidupan inang dengan cara memproduksi metabolit yang dibutuhkan inang tersebut. Selain itu endofit dapat membantu inang dalam mengambil nutrisi seperti nitrogen dan fosfor (7,8).

Penelitian tentang aktivitas bakterisida dari berbagai ekstrak cabai yang dilakukan oleh Agung Astuti (2008) menunjukkan hasil positif terhadap bakteri *Escherichia coli*, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang isolasi fungi endofit dari buah cabai katokkon (*Capsicum annum* L.var.*chinensis*) suku Solanaceae asal Kabupaten Tana Toraja Provinsi Sulawesi Selatan.

Penelitian ini bermaksud untuk untuk mengisolasi dan menguji aktivitas fungi endofit dari buah cabai katokkon (*Capsicum annum* L var. *chinensis*) tersebut terhadap beberapa mikroba uji dan tujuan dari

penelitian ini yaitu untuk memperoleh senyawa antimikroba dari isolat fungi endofit.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman

II.1.1 Klasifikasi

Tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah buah cabai katokkon (*Capsicum annuum* 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	: Sympetalae
Bangsa	: Solanales/tubiflorae
Suku	: Solanaceae
Marga	: Capsicum
Jenis	: <i>Capsicum annuum</i> L.var. <i>chinensis</i> (Lampiran 1)

II.1.2 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 familia Solanaceae artinya tanaman terong-terongan.

II.2 Fungi Endofit

Mikroba endofit merupakan mikroba yang hidup berkoloni dalam jaringan tumbuhan tanpa menimbulkan gejala penyakit pada tumbuhan inangnya. Istilah endofit diperkenalkan pertama kali oleh De Bary pada tahun 1866 sebagai mikroorganisme yang hidup dalam jaringan tanaman yang menyebabkan infeksi asimtomatis tetapi tidak berupa simtom penyakit(6,12).

Hampir semua jaringan tanaman mengandung mikroba endofit, termasuk ganggang laut dan lumut. Hasil berbagai penelitian menunjukkan bahwa sebagian besar mikroba endofit yang ditemukan adalah fungi. Identifikasi fungi endofit yang banyak dilakukan adalah dengan mengamati morfologi dari miselia dan konidianya(13,14).

Setiap tanaman tingkat tinggi umumnya mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau

metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit. Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya tersebut. Dari sekitar 300.000 jenis tanaman yang tersebar di muka bumi ini, masing-masing tanaman mengandung satu atau lebih mikroba endofit(15).

Jamur endofit hidup bersimbiosis mutualisme, dalam hal ini jamur endofit 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(16).

Asosiasi Jamur endofit dengan tumbuhan inangnya dapat digolongkan dalam dua kelompok, yaitu mutualisme konstitutif dan induktif. Mutualisme konstitutif merupakan asosiasi yang erat antara Jamur dengan tumbuhan terutama rumput-rumputan. Pada kelompok ini Jamur endofit menginfeksi ovula (benih) inang, dan penyebarannya melalui benih serta organ penyerbukan inang. Mutualisme induktif adalah asosiasi antara Jamur dengan tumbuhan inang, yang penyebarannya terjadi secara bebas melalui air dan udara. Ditinjau dari sisi taksonomi dan ekologi, Jamur ini merupakan organisme yang sangat heterogen(17).

Mikroorganisme endofit akan mengeluarkan suatu metabolit sekunder yang merupakan senyawa antibiotik itu sendiri. Metabolit sekunder merupakan senyawa yang disintesis oleh suatu mikroba, tidak untuk memenuhi kebutuhan primernya (tumbuh dan berkembang) melainkan untuk mempertahankan eksistensinya dalam berinteraksi dengan lingkungannya. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroorganisme endofit merupakan senyawa antibiotik yang mampu melindungi tanaman dari serangan hama insekta, mikroba patogen, atau hewan pemangsanya, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai agen biokontrol(18).

Mikroba endofit yang diisolasi dari tumbuhan obat akan memiliki aktivitas yang lebih besar, bahkan dapat memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan aktivitas tumbuhan inangnya. Dilihat dari segi efisiensi, hal ini sangat menguntungkan, karena siklus hidup mikroba endofit lebih singkat dibandingkan siklus hidup tumbuhan inangnya, sehingga dapat menghemat waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan senyawa tersebut, dan jumlah senyawa yang diproduksi dapat dibuat dalam skala yang besar dengan menggunakan proses fermentasi(7).

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 (13).

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 (19).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok (20):

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 menterjemahkan 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 (21).

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 (9):

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 ke dalam 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.

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 (13,22,23).

- 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

berbagai jenis endofit telah berhasil diisolasi dari tanaman inangnya, dan telah berhasil dibiakkan dalam media perbenihan yang sesuai. Demikian pula metabolit sekunder yang diproduksi oleh mikroba endofit tersebut telah berhasil diisolasi dan dimurnikan serta telah dielusidasi struktur molekulnya (29).

1. Mikroba endofit yang menghasilkan antibiotika kriptokandin adalah antijamur yang dihasilkan oleh mikroba endofit *Cryptosporiopsis quercina* yang berhasil diisolasi dari tanaman obat *Tripterigeum wilfordii*, dan berhasiat sebagai antijamur yang patogen terhadap manusia yaitu *Candida albicans* dan *Trichopyton spp.*
2. 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. Disamping 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.

3. Mikroba endofit yang memproduksi anti virus Jamur endofit *Cytonaema* sp. dapat menghasilkan metabolit cytonic acid A dan B yang strukturnya merupakan isomer p-tridepside, berhasiat 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 anti kanker Paclitaxel dan derivatnya merupakan zat yang berhasiat sebagai anti kanker 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.
5. 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.

6. Endofit yang menghasilkan metabolit yang berhasiat sebagai anti diabetes Endofit *Pseudomassria* sp yang diisolasi dari hutan lindung, menghasilkan metabolit sekunder yang bekerja seperti insulin. Senyawa ini sangat menjanjikan 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 dimasa mendatang.
7. Endofit yang memproduksi senyawa immunosupresif. Immunosupresif merupakan obat yang digunakan untuk pasien yang akan dilakukan tindakan transplantasi organ. Selain itu immunosupresif juga dapat digunakan untuk mengatasi penyakit autoimun seperti rematoid arthritis dan insulin dependent diabetes. Senyawa subglutininol A dan B yang dihasilkan oleh endofit *Fusarium subglutinans* yang diisolasi dari tanaman *T. wilfordii*, merupakan senyawa immunosupresif yang sangat potensial.

II.7 Produksi Metabolit Sekunder

Ada beberapa metode yang dapat digunakan dalam proses fermentasi mikroorganisme antara lain (9) :

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 di atas permukaan koloni berada dalam kondisi yang lebih aerobik dibandingkan yang di bawah 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 (*continuous 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.

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, nutrien 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.

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 (13,17).

Prinsip KLT adalah pemisahan secara fisikokimia. Pemisahan komponen kimia berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi, 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 (13,17).

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.

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 (21).

Bidang utama bioautografi adalah (21):

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 (21):

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 pemadatan, 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.

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 (25,26).

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 inangnya luas, dan banyak galur merupakan patogen potensial (25,27).

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 (25,27).

4. *Malassezia furfur*

a. Klasifikasi

Kerajaan	: Fungi
Divisio	: Basidiomycota
Kelas	: Hymenomycetes

Bangsa : Tremellales
Suku : Filobasidiaceae
Marga : *Malassezia*
Jenis : *Malassezia furfur*

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 mikrokonidianya (27).