

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI MOLEKULER MIKROBA ENDOFIT
TANAMAN PEGAGAN (*Centella asiatica* L) SEBAGAI PENGHASIL
ANTIMIKROBA**

*ISOLATION and MOLECULAR CHARACTERIZATION of ENDOPHYTIC
MICROBE FROM Centella asiatica L as
A PRODUCER of ANTIMICROBIAL COMPOUND*

MUH. HIDAYAT



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2018**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI MOLEKULER MIKROBA ENDOFIT
TANAMAN PEGAGAN (*Centella asiatica L*) SEBAGAI PENGHASIL
ANTIMIKROBA**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi
Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

MUH. HIDAYAT

Kepada

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2018

TESIS

ISOLASI DAN KARAKTERISASI MOLEKULER MIKROBA ENDOFIT TANAMAN PEGAGAN (*Centella asiatica* L) SEBAGAI PENGHASIL ANTIMIKROBA

Disusun dan diajukan oleh

MUH. HIDAYAT

Nomor Pokok P2500215007

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis
Pada tanggal 13 Agustus 2018
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasihat,



Dr. Mufidah, S.Si., M.Si., Apt
Ketua



Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt
Anggota

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Farmasi



Dr. Hj. Latifah Rahman, DESS., Apt

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin,



Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt



PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Muh. Hidayat
Nomor Mahasiswa : P2500215014
Program Studi : Farmasi

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pemilikan orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya sendiri siap menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Agustus 2018

Yang menyatakan

Muh. Hidayat

PRAKATA

Alhamdulillah, atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat merampungkan tesis yang berjudul “Isolasi dan Karakterisasi Molekuler Mikroba Endofit Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L) Sebagai Penghasil Antimikroba”. Berbagai hambatan penulis temui selama dalam penyusunan dan penyelesaian tesis ini. Namun hambatan tersebut dapat teratasi berkat bimbingan, bantuan, perhatian, dorongan dan kerja sama dari berbagai pihak.

Untuk itu dengan segala kerendahan dan keikhlasan hati penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar - besarnya kepada Ibu Dr. Mufidah, M.S., Apt sebagai Ketua Komisi Penasehat dan Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt sebagai Anggota Komisi Penasehat dimana dalam kesibukan aktivitasnya beliau selalu menyempatkan membimbing dan memberi arahan mulai dari awal pengembangan minat terhadap permasalahan penelitian ini, pelaksanaan penelitiannya, sampai dengan penulisan tesis ini. Tak lupa pula penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar.
2. Dr. Hj. Latifah Rahman, DESS., Apt, selaku Ketua Program Pascasarjana Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar.

3. Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt, Ibu Dr. Sartini, M.Si., Apt, dan Ibu . Dr. Hj. Latifah Rahman, DESS., Apt selaku Komisi Penguji yang telah banyak memberikan masukan dan saran dalam penulisan tesis ini.
4. Untuk seluruh keluarga yang tidak dapat disebutkan semuanya, yang tak henti - hentinya memberikan semangat, doa dan kasih sayang yang tidak terhingga kepada penulis dalam menyelesaikan pendidikan.
5. Seluruh rekan-rekan Program Pascasarjana Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar Angkatan 2015 yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang selalu memberikan bantuan, dorongan serta kritikan yang sangat membangun kepada penulis.

Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat untuk ilmu pengetahuan dan Allah Subhanahu Wa Ta'ala senantiasa melimpahkanberkat dan anugerah-Nya kepada semua pihak yang telah mendidik, mendorong serta membantu penulis.

Makassar, Agustus 2018

Penulis

ABSTRAK

Muh. Hidayat. *Isolasi dan karakterisasi molekuler mikroba endofit tanaman pegagan (*Centella asiatica* L) sebagai penghasil antimikroba* (dibimbing oleh Mufidah dan Herlina Rante).

Pegagan atau dikenal sebagai *Centella asiatica* L merupakan tumbuhan tropis di Indonesia yang sering digunakan sebagai obat tradisional. Pegagan memiliki kandungan senyawa yang bermanfaat sebagai penyembuhan luka, antibakteri, antioksidan dan antikanker. Senyawa dengan karakteristik yang sama diperkirakan bisa dihasilkan oleh mikroba endofit yang ada pada pegagan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan melakukan karakterisasi molekuler isolat mikroba endofit pegagan yang memiliki potensi sebagai antimikroba.

Ada enam isolat fungi endofit yang diisolasi, dua diantaranya adalah bakteri endofit dan empat lainnya adalah fungi endofit. Isolat bakteri endofit BEF1 dan fungi endofit FEF2 dipilih untuk dilanjutkan karakterisasi molekulernya setelah melihat hasil uji antagonis terhadap *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella typhosa*, dan *Candida Albicans*. Isolat bakteri endofit BEF 1 menunjukkan zona hambatan terhadap *Salmonella typhosa* dan *Propionibacterium acnes* yaitu 8.1 mm dan 6.2 mm. Zona hambatan isolat fungi endofit FEF2 terhadap *Salmonella typhosa* dan *Propionibacterium acnes* yaitu 9.3 mm dan 8.3 mm. Isolat bakteri endofit BEF1 memiliki kekerabatan 100% dengan *Paenibacillus alvei*, sedangkan isolat fungi endofit FEF2 memiliki kekerabatan 100% dengan *Colletotrichum gloeosporioides*.

Kata kunci : *Centella asiatica* L, mikroba endofit, antimikroba, *Paenibacillus alvei*, *Colletotrichum gloeosporioides*

ABSTRACT

Muh. Hidayat. *Isolation and molecular characterization of endophytic microbe from Centella asiatica L as a producer of antimicrobial compound* (Supervised by Mufidah and Herlina Rante).

Pegagan or *Centella asiatica* L is a tropical plant in Indonesia used as a traditional medicine. *Centella asiatica* L has a useful as wound healing, antibacterial, antioxidant and anticancer. Compounds with the same properties are estimated to be produced by endophytic microbes present in *Centella*.

This study aims to isolate and perform molecular characterization of endophytic microbial isolates that are possible as antimicrobials.

Six isolates endophytic microbe been found, two endophytic bacteria and four endophytic fungi. BEF1 endophytic bacterial and FEF2 endophytic fungi were selected for molecular characterization after antagonist test against *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella typhosa*, and *Candida Albicans*. BEF 1 endophytic bacterial showed inhibition zone against *Salmonella typhosa* and *Propionibacterium acnes* is 8.1 mm and 6.2 mm. FEF2 endophytic fungal inhibition zone against *Salmonella typhosa* and *Propionibacterium acnes* is 9.3 mm and 8.3 mm. Bacterial endophytic BEF1 has a 100% association with *Paenibacillus alvei*, whereas FEF2 endophytic fungal have a 100% association with *Colletotrichum gloeosporioides*.

Keywords : *Centella asiatica* L, endophytic microbe, antimicrobial, *Paenibacillus alvei*, *Colletotrichum gloeosporioides*

DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR SINGKATAN	xii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Pegangan	5
1. Klasifikasi pegangan	5
2. Morfologi	6
3. Penggunaan Tumbuhan Pegangan	8
4. Kandungan Kimia Pegangan	8
B. Mikroba Endofit	9
1. Mikroba Endofit dan Keanekaragaman Hayati	12

2. Pemilihan Tumbuhan Untuk Mengisolasi Mikroba Endofit	12
3. Isolasi dan Identifikasi Mikroba Endofit	13
4. Produk Mikroba Endofit Sebagai Antibiotik	14
5. Skrining Antimikroba	15
C. Identifikasi Mikroorganisme yang Belum Diketahui Berdasarkan Analisis Sequence 16s rDNA	17
D. <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	18
E. Filogenetik	20
F. Kerangka Teori	22
G. Kerangka Konsep	23
BAB III. METODE PENELITIAN	24
A. Rancangan Penelitian	24
C. Lokasi dan Waktu	24
D. Alat dan Bahan	24
E. Prosedur Penelitian	25
1. Pengambilan dan Penyiapan Sampel	25
a. Pengambilan Sampel	25
b. Pengolahan Sampel	25
2. Penyiapan Mikroba Uji	25
3. Pembuatan Medium	26
a. Pembuatan Potato Dekstrosa Agar (PDA)	26
b. Pembuatan Potato Dekstrosa Broth (PDB)	26
c. Pembuatan Potato Dekstrosa Yeast (PDY)	26

d. Pembuatan Nutrien Agar (NA)	27
e. Pembuatan Nutrien Broth (NB)	27
4. Isolasi Mikroba Endofit	27
a. Isolasi Bakteri Endofit	27
b. Isolasi Fungi Endofit	28
5. Pemurnian Mikroba Endofit	28
6. Uji Antagonis Mikroba Endofit	29
7. Fermentasi Isolat dan Ekstraksi Metabolit Sekunder	29
8. Pembuatan Kurva Bobot Sel Kering Fungi Endofit	29
9. Penentuan Waktu Optimum Fermentasi Mikroba Endofit	30
10. Uji Aktivitas Antimikroba metabolit sekunder mikroba Endofit	30
11. Pemisahan Senyawa Secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	31
12. Pengujian KLT Bioautografi	32
13. Ekstraksi DNA	33
14. Amplifikasi <i>Polymerase Chain Reaction</i>	33
15. Elektroforesis	33
16. Pembuatan Pohon filogenetik	34
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
A. Isolasi Mikroba Endofit	35
B. Uji Antagonis Isolat Mikroba Endofit Terhadap Mikroba Patogen	35
C. Penentuan Waktu Optimum Fermentasi Mikroba Endofit	37
D. Produksi dan Uji Aktivitas Ekstrak Hasil Fermentasi Mikroba Endofit	42

E. KLT Bioautografi	43
F. Karakterisasi Molekuler Dan Pembuatan Pohon Filogenetik	45
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	50
A. Kesimpulan	50
B. Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	52
SKEMA KERJA	53
LAMPIRAN	54

DAFTAR TABEL

1. Hasil Uji Antagonis Isolat Mikroba Endofit	37
2. Uji Aktivitas Antimikroba Fermentat Isolat Bakteri Endofit BEF1	59
3. Uji Aktivitas Antimikroba Fermentat Isolat Fungi Endofit FEF2	61
4. Hasil Pengukuran Bobot Sel Kering Miselia Isolat Fungi Endofit FEF2	64

DAFTAR GAMBAR

1. <i>Flow chart</i> pemisahan kandungan antimikroba pada endofit	16
2. Kurva pengukuran bobot sel kering miselia isolat fungi endofit FEF2	38
3. Kurva zona hambat cairan fermentat isolat fungi endofit FEF2	40
4. Kurva zona hambat cairan fermentat isolat bakteri endofit BEF1	40
5. Kromatogram KLT ekstrak etil asetat Herba Pegagan, Ekstrak etil asetat ermentat bakteri endofit BEF1, dan Ekstrak etil asetat fermentat fungi endofit FEF2	43
6. Kromatogram ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat FEF2 dan zona hambatnya terhadap <i>Propionibacterium acnes</i>	44
7. Kromatogram ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat FEF2 dan zona hambatnya terhadap <i>Salmonella typhosa</i>	45
8. Hasil elektroforesis isolat mikroba endofit	48
9. Hasil pohon filogenetik isolat bakteri endofit BEF1	49
10. Hasil pohon filogenetik isolat fungi endofit FEF2	49

DAFTAR LAMPIRAN

1. Isolat mikroba endofit tanaman pegagan	54
2. Uji Antagonis Isolat Mikroba Endofit Tanaman Pegagan	57
3. Uji aktivitas antimikroba cairan fermentat isolat bakteri endofit BEF1 dan isolat fungi endofit FEF2	59
4. Hasil pengukuran bobot sel kering miselia isolat fungi endofit FEF2	64
5. Gambar Uji aktivitas ekstrak etil asetat isolat bakteri endofit BEF1 dan isolat fungi endofit FEF2	65
6. Determinasi Tumbuhan	66
7. Hasil Sekuensing Isolat bakteri Endofit BEF1	67
8. Hasil Sekuensing Isolat Fungi Endofit FEF2	68
9. Hasil Blast isolat bakteri endofit BEF1	69
10. Hasil Blast isolat funfi endofit FEF2	71

DAFTAR SINGKATAN

KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
BLAST	: <i>Basic Local Aligment Search Tool</i>
MEGA	: <i>Moleculer Evolutionary Genetics Analysis</i>
PCR	: <i>Polimerase Chain Reaction</i>

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tanaman merupakan salah satu sumber untuk mendapatkan senyawa antimikroba yang didapatkan melalui ekstraksi tanaman. Tanaman dianggap menjadi sumber yang mudah didapatkan dan hampir 80% populasi di dunia menggunakannya sebagai bahan obat dan biasanya dipilih dari penggunaan tradisional (Dash *et al.*, 2011). Produksi senyawa berkhasiat asal tanaman membutuhkan bahan baku yang sangat banyak, sehingga dibatasi oleh ketersediaan tanaman. Menurut Alvin *et al.*, 2014, keberhasilan produk alam secara komersial bergantung pada ketersediaan tanaman. Dalam kasus lain, isolat senyawa yang berasal dari tanaman yang terancam punah atau yang sangat endemik akan berdampak buruk pada konservasi keanekaragaman hayati.

Salah satu solusi dalam menangani masalah ini adalah penemuan mikroba yang berada di dalam jaringan tanaman yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang memiliki karakteristik yang sama dengan tanaman inangnya, dikenal dengan mikroba endofit. Mikroba endofit merupakan organisme yang hidup berasosiasi dengan tanaman. Hidup di dalam interseluler tanaman, dalam jaringan seperti akar, batang, dan daun. Tetapi tidak menyebabkan gejala penyakit pada tanaman inang (Ramos *et al.*, 2016).

Dari sudut pandang komersial, fermentasi mikroba endofit relatif lebih mudah dan memungkinkan produksi senyawa biologis secara besar-besaran untuk memenuhi permintaan industri. Mikroba endofit memberi kesempatan untuk menemukan sejumlah besar senyawa baru dan menjadi sumber untuk produk alam (Alvin *et al.*, 2014). Menurut Rafat, Philip, & Muniandy (Rafat *et al.*, 2012) mikroba endofit telah diisolasi dari beberapa tanaman menunjukkan potensi aktivitas biologi seperti antibakteri, antifungi, dan antitumor. Mikroba endofit memproduksi metabolit sekunder untuk melindungi tanaman dari serangan patogen. Beberapa penelitian mengenai mikroba endofit dari tanaman pegangan sebagai penghasil senyawa antimikroba telah dilakukan. Pegagan atau *Centella asiatica* L merupakan tanaman yang hampir ada di seluruh Asia. *Centella asiatica* L memiliki manfaat farmakologi yang banyak, digunakan sebagai penyembuhan luka, gangguan mental, antibakteri, antioksidan dan bahkan antikanker.

Penelitian yang dilakukan Prabakaran Nameirakpam Nirjanta Devi, & W. Femina (Prabakaran *et al.*, 2012) menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat fungi endofit pegangan menunjukkan penghambatan pertumbuhan pada mikroba uji *Klebsiella* sp., *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Proteus* sp., *Shigella* sp., *Serratia* sp. Nilai konsentrasi inhibisi minimum (MIC) untuk ekstrak berkisar antara 50,6 µg/ml sampai 274,6 µg/ml. Dash, *et al.* 2011, menunjukkan aktivitas ekstrak herba pegangan terhadap mikroba uji *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*,

Bacillus subtilis dan *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* dan *Candida albicans*. Berdasarkan informasi di atas akan dilakukan isolasi mikroba endofit dari pegangan dan karakterisasi metabolit sekunder antimikroba yang dihasilkan oleh mikroba endofit.

B. Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antimikroba metabolit sekunder yang dihasilkan mikroba endofit tanaman *Centella asiatica* L.?
2. Bagaimana karakteristik molekuler metabolit sekunder yang dihasilkan mikroba endofit tanaman *Centella asiatica* L.?

C. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengisolasi mikroba endofit dan mengetahui aktivitas antimikroba metabolit sekunder yang dihasilkan mikroba endofit tanaman *Centella asiatica* L.
2. Untuk mengetahui karakteristik molekuler mikroba endofit tanaman *Centella asiatica* L.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah ilmu pengetahuan terutama di bidang mikrobiologi dan eksplorasi bahan obat dari produk alam untuk pengembangan penemuan senyawa antimikroba dari mikroba endofit tanpa merusak keanekaragaman hayati yang menjaga kelestarian alam di masa yang akan datang.

Secara khusus penelitian ini diharapkan diperoleh karakteristik mikroba endofit yang memiliki metabolit sekunder yang aktif sebagai antimikroba yang dapat dikembangkan di masa yang akan datang.

BAB II

TEORI UMUM

A. Pegagan (*Centella asiatica* L)

Pegagan atau *Centella asiatica* L dikenal sebagai tumbuhan tropis yang tersebar di Asia selatan seperti India, Sri Lanka, China, Indonesia, dan Malaysia. Juga terdapat di Afrika selatan dan Madagaskar. Daun dari tumbuhan ini dapat dikonsumsi, memiliki warna kekuning-kuningan hingga hijau, tipis, petiola yang panjang, orbikular, bentuk elips oblongata dengan tujuh urat daun. Tumbuh menjalar secara horizontal dan tangkai daunnya berwarna hijau hingga merah saling menyokong dan tertancap di tanah (Ilkay., 2012).

1. Klasifikasi pegagan

Kingdom : Eukaryot
Subkingdom : Embryophyta
Subdivisi : Angiospermaae
Class : Dicotyledoneae
Subclass : Rosidae
Superorder : Aralianae
Order : Araliales (Umbelliflorae)
Family : Apiaceae atau Umbelliferae
Subfamily : Hydrocotyle

Genus :Centella

Species :*Centella asiatica* L

(Comitte on Herbal medicine product., 2010)

2. Morfologi

Berwarna hijau, ramping, tumbuh menjalar, memiliki stolon, dan berbau samar-samar. Tingginya bisa mencapai 15 cm, batangnya panjang, berbaring dan muncul dari aksil daun pada bagian batang bawah, aksilnya berlurik, membentuk fili, berwarna kemerahan dengan ruas yang panjang pada batang bawah. Daun muncul bergantian tumbuh pada batang induk, tumbuh hingga 1,3 hingga 3,6 cm, tipis, dengan tangkai daun yang panjang, 2 hingga 6 cm dan lebar daun 1, 5 hingga 5 cm. ada beberapa bentuk batang bawah, yaitu bulat berbentuk seperti ginjal, lebih bulat, atau berbentuk cangkir, tangkai daun memiliki panjang, 7,5 hingga 15 cm ataupun lebih. Stipulanya pendek dan dekat dengan bentuk tangkai daun membentuk lapisan. Gagang bunga panjangnya sekitar 6mm tanpa tangkai, daun berbentuk lain yang meliputi bunga, dihubungkan 1 hingga 5 bunga, bersifat sessile, putih atau kemerahan. Buahnya kecil, panjang 8 mm. merikarp lebih panjang, melengkung, bulat di bagian atas, memiliki 7 gerigi dengan gerigi tambahan yang mencolok sama seperti gerigi utamanya (Ambrose *et al.*, 2016).

Habitus berupa tera atau herba tahunan, tanpa batang tetapi dengan rimpang pendek dan stolon-stolon yang melata, panjang 10-80 cm. Daun tunggal, tersusun dalam roset yang terdiri dari dua

sampai sepuluh daun, kadang-kadang agak berambut; tangkai daun panjang sampai 50 mm, helai daun berbentuk ginjal, lebar dan bundar dengan garis tengah 1-7 cm, pinggir daun beringgit sampai beringgit-bergerigi, terutama ke arah pangkal daun. Perbungaan berupa payung tunggal atau tiga sampai lima bersama-sama keluar dari ketiak daun, gagang perbungaan 5-50 mm, lebih pendek dari tangkai daun. Bunga umumnya tiga, yang di tengah duduk, yang di samping bergagang pendek, daun pelindung dua, panjang 3-4 mm, bentuk bundar telur, tajuk berwarna merah lembayung, panjang 1-1,5 mm, lebar sampai 0,75 mm. Buah pipih, lebar ± 7 mm dan tinggi ± 3 mm, berlekuk dua, jelas berusuk, berwarna kuning kecoklatan, berdinding agak tebal (Badan POM RI., 2012).

3. Penggunaan tumbuhan pegagan

Penggunaan tanaman pegagan salah satunya adalah meringankan penyakit saluran pencernaan seperti disentri, konstipasi, masalah pencernaan, seperti kesulitan mencerna dan kurangnya nafsu makan, dan untuk meningkatkan daya ingat atau stimulasi saraf. Tumbuhan ini juga digunakan untuk sakit kepala, sakit gigi, luka, leukorea, penyakit kulit seperti eksema, hemoroid, antidot, masalah saluran urin, pneumonia, sipilis, masalah hati, lemah syahwat pada pria, demam, penyakit kardiovaskular, asma (Jahan *et al.*, 2012).

4. Kandungan kimia pegagan

Tanaman pegagan mengandung beberapa komponen misalnya centella saponin, *asiaticosid*, *medecassosid*, *sceffoleosid*, pektin, kastiliferol 1 dan kastilisetin 2. Asam lemak yang telah diisolasi dari tumbuhan ini mengandung gliserida dari oleat, linolat, centoat, linolenat, lignocerat, palmitat, dan asam stearat. Daunnya juga mengandung triterpen asam madasiatik seperti 3-glikosil kuersetin, 3-glikosil kaemperol dan 7-glikosil kameperol, asam pectic dan rein yang ada pada daun dan akar, asiatisida dan oxiasiatikosida menunjukkan akif pada pengobatan leprosa dan tuberkolusis (Arumugam *et al.*, 2011). Aktivitas antibakteri pegagan menunjukkan potensi terhadap bakteri patogen, dan menunjukkan kegunaannya terhadap penyakit diare dan disentri (Jahan, *et al.*, 2012).

Senyawa yang menonjol yang menjadi bahan aktif pada tumbuhan pegagan adalah triterpen, mengandung asam asiatik, asam medekasik, asiaticosida. Asam asiatik merupakan aglikon dari asiaticosida yang diisolasi dari pegagan, biasanya digunakan untuk penyembuhan luka, anti bakteri, anti fungi potensial, anti oksidan dan perlindungan dari radikal bebas, perbaikan dermis dengan stimulasi kolagen, anti aging dengan biomekanis pada kulit (Taemchuay *et al.*, 2009).

B. Mikroba Endofit

Mikroba endofit merupakan mikroorganisme bakteri ataupun fungi yang tinggal dalam jaringan interseluler atau intraseluler tumbuhan yang sehat tanpa menyebabkan munculnya gejala penyakit pada tumbuhan. Tersebar dalam tanaman, tinggal dalam tanaman, dan telah diisolasi dari hampir semua tanaman yang diuji hingga saat ini. Mikroba endofit dapat berasosiasi secara obligat atau fakultatif dan tidak berbahaya untuk tumbuhan inang. Mikroba endofit menunjukkan interaksi yang kompleks dengan inang yang saling terlibat baik secara mutualisme atau antagonism. Tumbuhan mungkin menjadi tempat yang sulit untuk pertumbuhan endofit, dan endofit menggunakan banyak mekanisme untuk bisa beradaptasi pada lingkungan. Untuk bisa menjadi stabil dengan simbiosis, endofit menghasilkan beberapa senyawa yang memberikan bantuan untuk beradaptasi dan tumbuh pada lingkungan tersebut (Nair & Padmavathy., 2014).

Dalam tumbuhan, Ketika kombinasi sintesis menghasilkan produk secara random yang disebut metabolit sekunder, yang diartikan sebagai molekul berbobot rendah yang tidak muncul ditempat asal, melainkan muncul sebagai adaptasi di lingkungan alam. Dipercaya bahwa termasuk mikroba menghasilkan metabolit mirip karakteristiknya dengan biotop dari lingkungan maupun level organisme. Endofit sendiri merupakan mikroba yang mendiami biotope atau tingkat tumbuhan yang lebih tinggi, yang dipertimbangkan menjadi sumber metabolit sekunder yang berpotensi

untuk dunia medis, pertanian, dan industri. Endofit juga membantu para peneliti untuk mengetahui atau mempunyai keahlian dibidang taksonomi mikroba, dan termasuk tehnik molekuler modern yang melibatkan analisis sekuen 16S dan 18S rDNA. Saat ini, endofit dipandang sebagai sumber yang luar biasa untuk produk bioaktif alami karena banyak dari endofit menempati sistem biologi unik pada lingkungan yang tidak biasa (Strobel et al., 2004).

Hal tersebut memunculkan banyak sekali faktor biologi yang berhubungan dengan tanaman yang menjadi bagian penting untuk tumbuhan dilakukan penelitian. Hal tersebut pula bisa menjadi faktor perkembangan mikroba yang ada di dalam tumbuhan memiliki aktivitas biologi yang sama dari produk yang dihasilkan oleh organismenya. (Strobel et al., 2004).

Sejak ditemukannya endofit di Damel, Jerman tahun 1904, berbagai penelitian telah mendefenisikan endofit dalam berbagai artian, yang biasanya bergantung pada sudut pandang darimana endofit diisolasi dan ditentukan. Ketika keadaan alami dari endofit yang mendiami jaringan tumbuhan telah fokus pada hubungan simbiosis atau mutualistik antara endofit dan inangnya. Pengamatan keragaman yang diusulkan bahwa endofit juga bisa menjadi saprofit agresif atau pathogen oportunistik. Fungi dan bakteri merupakan mikroba umumnya yang dikenal sebagai endofit. (Strobel et al., 2004). Bentuk mikroba yang lain seperti mikoplasma, rikesia, dan arkebakteria belum dibuktikan menjadi salah satu endofit.

Endofit yang paling banyak diketahui adalah berupa fungi (Strobel et al., 2004).

Ada sekitar 1 juta spesies fungi yang berbeda, hanya 100.000 yang telah diketahui. Estimasi ini masih bisa terus meningkat untuk melihat spesies fungi secara aktual. Diestimasi hampir 1 juta spesies merupakan fungi endofit. Hal tersebut menunjukkan bahwa endofit merupakan sumber yang digunakan untuk keragaman genetik, dan bisa menunjukkan spesies yang belum diketahui (Strobel et al., 2004).

1. Mikroba endofit dan keanekaragaman hayati

Dari banyak sekali ekosistem di bumi, yang memiliki keanekaragaman yang paling tinggi yaitu endofit yang menjadi urutan pertama dan menjadi keanekaragaman mikroorganisme. Hutan tropis dan hutan hujan merupakan ekosistem dengan keanekaragaman secara biologi yang paling banyak di bumi. Namun yang menjadi spot hanya 1,44%, dan masih tersembunyi sebanyak 60%. Oleh karena itu, keragaman tersebut juga membuat keragaman kandungan kimia yang ada dalam ekosistem, terjadi dimana ada evolusi percepatan untuk bisa bertahan adalah yang paling aktif. Secara statistik metabolit bioaktif yang didapat lebih banyak pada iklim tropis dibandingkan iklim sedang. Bukan hanya menyediakan bahan yang lebih aktif, tapi juga jumlah endofit iklim tropis diproduksi lebih banyak dari pada iklim tropical subrata (Strobel & Daisy., 2003).

2. Pemilihan tumbuhan untuk mengisolasi mikroba endofit

Sangat penting untuk memahami metode dan alasan yang digunakan untuk menyediakan peluang yang lebih besar bagi endofit untuk menghasilkan antimikroba dari sebuah spesies tumbuhan. Beberapa strategi pemilihan tanaman sebagai berikut : (Yu *et al.*, 2010)

- a. Tumbuhan tumbuh di area dengan prospek keragaman hayati endofit yang tinggi.
- b. Tumbuh di habitat yang khusus.
- c. Tumbuh di tempat yang dikelilingi patogen
- d. Tumbuhan yang telah digunakan manusia sebagai obat dan penting untuk dilakukan penelitian
- e. Tumbuhan yang membutuhkan lahan yang sangat luas.

3. Isolasi dan identifikasi mikroba endofit

Organisme endofit telah diisolasi dari bagian-bagian tanaman yang berbeda. Diisolasi dari potongan primordial, meristem, dan pembuluh resin, bagian daun dengan pelepah dan akar, dan dari batang, kulit batang, daun, tangkai daun, dan tunas (Nair & Padmavathy., 2014). Mikroorganisme Endofit yaitu bakteri, fungi, dan atau aktinomisetes yang diisolasi dari jaringan tanaman telah menjadi subjek penelitian. Beberapa penelitian telah mereview metode yang berbeda untuk mengisolasi endofit (Nair & Padmavathy., 2014). Endofit diisolasi diawali dengan sterilisasi permukaan diikuti dengan mengkultur dengan ekstrak jaringan atau dikulturkan langsung jaringan tanaman pada media yang cocok dengan

pertumbuhan bakteri, jamur, atau aktinomisetes (Nair & Padmavathy., 2014).

Secara konvensional, identifikasi endofit dilakukan berdasarkan karakteristik morfologi untuk bakteri, fungi, dan aktinomisetes dan dengan bantuan uji biokimia untuk uji bakteri dan aktinomisetes. Dengan pengembangan biologi molekuler, analisis sekuen DNA *Ribosomal transcribed spacer* (ITS) secara luas digunakan untuk identifikasi mikroorganisme. DNA ribosom (rDNA) ITS dibuktikan menjadi sumber yang berharga untuk membuktikan permasalahan hubungan filogenetik pada level terendah, seperti genera atau spesies (Nair & Padmavathy., 2014).

4. Produk mikroba endofit sebagai antibiotik

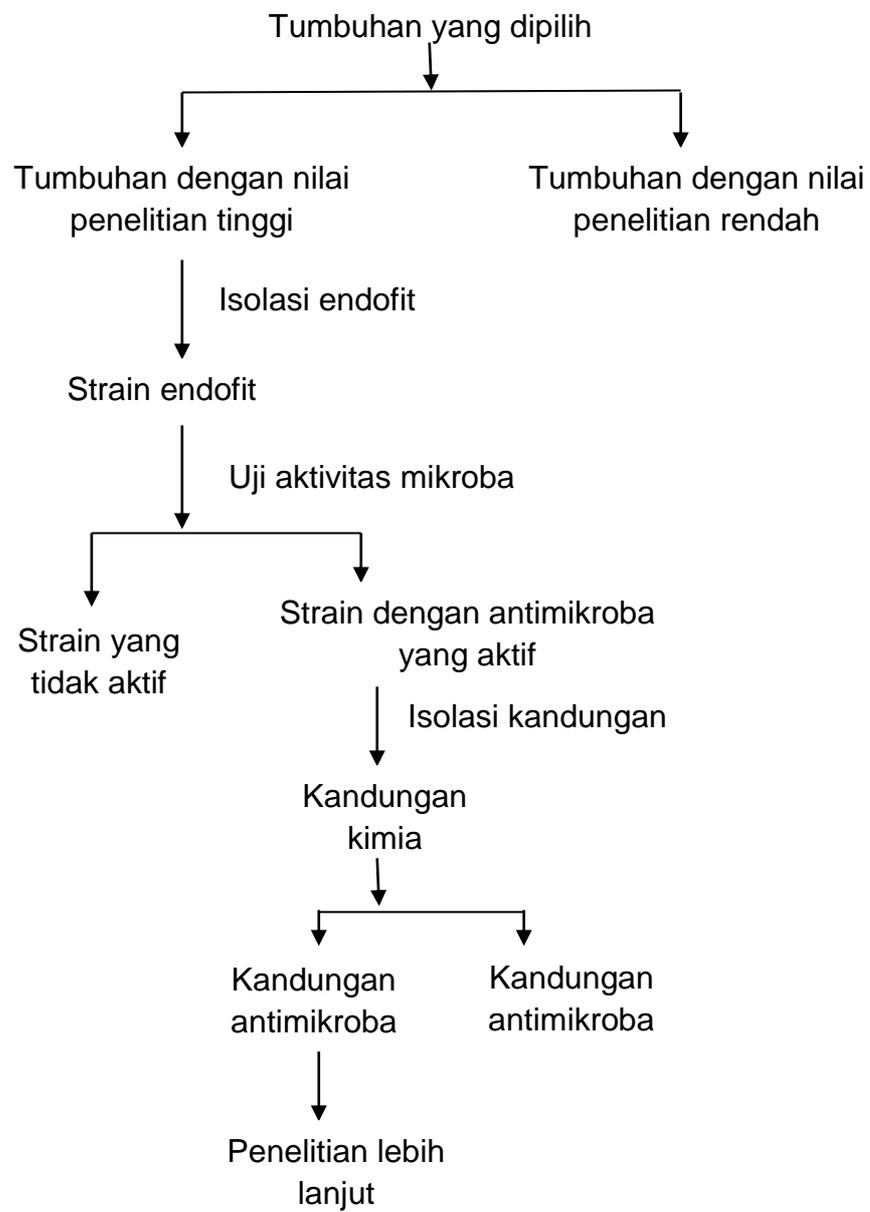
Antibiotik merupakan produk organik alami dengan berat molekul rendah yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang aktif pada konsentrasi rendah pada mikroorganisme lain. Seringkali, endofit merupakan sumber antibiotik ini. Produk alami dari mikroba endofit telah diamati untuk menghambat atau membunuh penyebab penyakit-penyakit seperti fitopatogen, bakteri, fungi, virus, dan protozoa yang menginfeksi manusia dan hewan (Stobel & Daisy., 2003). *Cryptosporiosis quercina* merupakan bentuk belum sempurna dari penicula cinnamomea, jamur yang umumnya berasosiasi dengan kayu di eropa. Diisolasi sebagai endofit dari *tripterigeum wilfordii*, sebuah tanaman obat asli Eurasia. *C. quercina* menunjukkan aktivitas antifungi yang sangat baik terhadap beberapa fungi

patogen seperti *Candida Albicans* dan *Trichopyton spp* (Stobel & Daisy., 2003).

5. Skrining antimikroba

Ekstrak kasar dari fermentasi broth dari endofi membutuhkan uji pertama kali menggunakan beberapa metode seperti metode difusi paper disk, agar dilusi, disk difusi, dan uji *mycelia radial growth*. Banyak penelitian telah dilaporkan bahwa endofit belum memiliki kepastian bahwa isolatnya menunjukkan aktivitas antimikroba (Yu *et al.*, 2010).

Kromatografi lapis tipis (KLT) dan bioatugrafi dapat digunakan untuk memeriksa kandungan antimikroba. Ekstrak kasar ditempatkan pada lempeng KLT dan dipisahkan dengan eluen yang cocok. Mikroorganisme uji diinokulasikan ke dalam cawan KLT yang telah dielusi, dan mikroba dibiakkan untuk melihat perubahannya dalam beberapa hari. Kandungan antimikroba dapat dilihat dengan mengamati zona hambat pada cawan KLT. Selanjutnya, komponen aktif dapat diisolasi menggunakan metode kromatografi, kromatografi cair, dan kromatografi kolom. Efikasi dari kandungan antimikroba diindikasikan dengan konsentrasi hambat minimum (nilai MIC), atau konsentrasi hambat 50% (IC₅₀) (Yu *et al.*, 2010).



Gambar 1. *Flow chart* pemisahan kandungan antimikroba pada endofit (Yu *et al.*, 2010)

C. Identifikasi Mikroorganisme yang Belum Diketahui

Berdasarkan Analisis Sequence 16s rDNA

rRNA adalah gen yang paling stabil dalam semua sel. Bagian dari rangkaian rDNA dari organisme yang berkerabat jauh akan nampak sangat mirip. Ini berarti bahwa sekuen dari organisme yang berkerabat jauh dapat secara tepat disesuaikan, juga membuat perbedaan yang mudah diukur. Untuk alasan ini, gen yang menyandikan rRNA (rDNA) telah digunakan secara ekstensif untuk menentukan taksonomi, filogeni (Hubungan evolusioner), dan untuk memperkirakan tingkat penyebaran spesies bakteri. Dengan demikian perbandingan urutan rDNA 16s dapat menunjukkan keterkaitan evolusioner di antara mikroorganisme. Karya ini dipelopori oleh Carl Woese, yang mengusulkan tiga sistem klasifikasi Domain - Archaea, Bacteria, dan Eucarya berdasarkan informasi sekuen (Jill & Claridge., 2004).

Dalam Bakteri, Archaea, Mitokondria, dan Kloroplas, subunit ribosom kecil mengandung 16S rRNA (di mana S dalam 16S mewakili unit Svedberg). Subunit ribosom besar mengandung dua spesies rRNA (rRNA 5S dan 23S). Gen bakteri 16S, 23S, dan 5S rRNA biasanya diorganisasikan sebagai operon co-transcribed. Mungkin ada satu atau lebih salinan operon yang terdispersi dalam genom (misalnya, *E coli* tujuh). Archaea berisi operon rDNA tunggal atau banyak salinan operon. Untuk menyimpulkan hubungan yang mencakup keragaman kehidupan yang

diketahui, perlu untuk melihat gen yang dilestarikan melalui miliaran tahun perpecahan evolusioner. Contoh gen dalam kategori ini adalah yang menentukan RNA ribosom (rRNA). Kebanyakan prokariota memiliki tiga rRNA, disebut 5S, 16S dan 23S rRNA. 5S telah dipelajari secara ekstensif, namun biasanya terlalu kecil untuk menyimpulkan filogenetik yang andal. rRNA 16S dan 23S cukup baik untuk digunakan (Jill & Claridge., 2004).

D. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase chain reaction (PCR) adalah teknik biologi molekuler untuk mereplikasi DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme hidup, seperti *E. coli* atau ragi. Teknik ini memungkinkan sejumlah kecil molekul DNA diamplifikasi, secara eksponensial. Dengan lebih banyak DNA yang tersedia, analisis dibuat jauh lebih mudah. PCR umumnya digunakan di laboratorium penelitian medis dan biologi untuk berbagai kegunaan, seperti deteksi penyakit, identifikasi finger print genetik, diagnosis penyakit menular, kloning gen, dan perhitungan DNA. Teknik yang dikembangkan pada tahun 1983 oleh Kary Mullis, PCR sekarang menjadi teknik umum dan penting yang digunakan di laboratorium penelitian medis dan biologi untuk berbagai aplikasi. Termasuk kloning DNA untuk sekuensing, filogeni berbasis DNA, atau analisis fungsional gen, diagnosis penyakit keturunan, Identifikasi sidik jari genetik (digunakan dalam ilmu forensik dan pengujian keturunan), Dan deteksi dan diagnosis penyakit menular. Pada tahun 1993, Mullis dianugerahi

penghargaan Nobel Kimia bersama Michael Smith atas karyanya tentang PCR. PCR umumnya dilakukan dalam volume reaksi 10-200 µl dalam tabung reaksi kecil (0,2-0,5 ml volume) dalam sebuah *cycler thermal*. *Cycler thermal* memanaskan dan mendinginkan tabung reaksi untuk mencapai suhu yang dibutuhkan pada setiap langkah reaksi. Banyak *Cycler thermal* modern memanfaatkan efek Peltier, yang memungkinkan pemanasan dan pendinginan blok yang menahan tabung PCR hanya dengan membalikkan arus listrik. Tabung reaksi berdinding tipis memungkinkan konduktivitas termal yang baik agar cepat terjadi kesetimbangan termal (Rahman *et al.*, 2013).

PCR dapat digunakan untuk diagnosis banyak penyakit manusia, beragam eksperimen dan analisis. Beberapa contoh dibahas di bawah ini : (Rahman *et al.*, 2013)

1. Penyakit menular HIV, CMV, Mycoplasma, Pneumonia, Kanker, Sifilis, Penyakit jamur & Protozoal, hepatitis dll.
2. Diagnosis kanker khususnya leukemia dan limfoma
3. Genetika sidik jari, tes keturunan dengan PCR

. Tes PCR dapat dilakukan secara langsung pada sampel DNA genom untuk mendeteksi sel ganas translokasi-spesifik pada sensitivitas yang setidaknya 10.000 kali lipat lebih tinggi daripada metode lainnya. PCR juga mengizinkan identifikasi mikroorganisme *noncultivable* atau slow-growing seperti *mycobacteria*, bakteri anaerob, atau virus dari tes kultur jaringan dan model hewan. Dasar untuk aplikasi diagnostik PCR

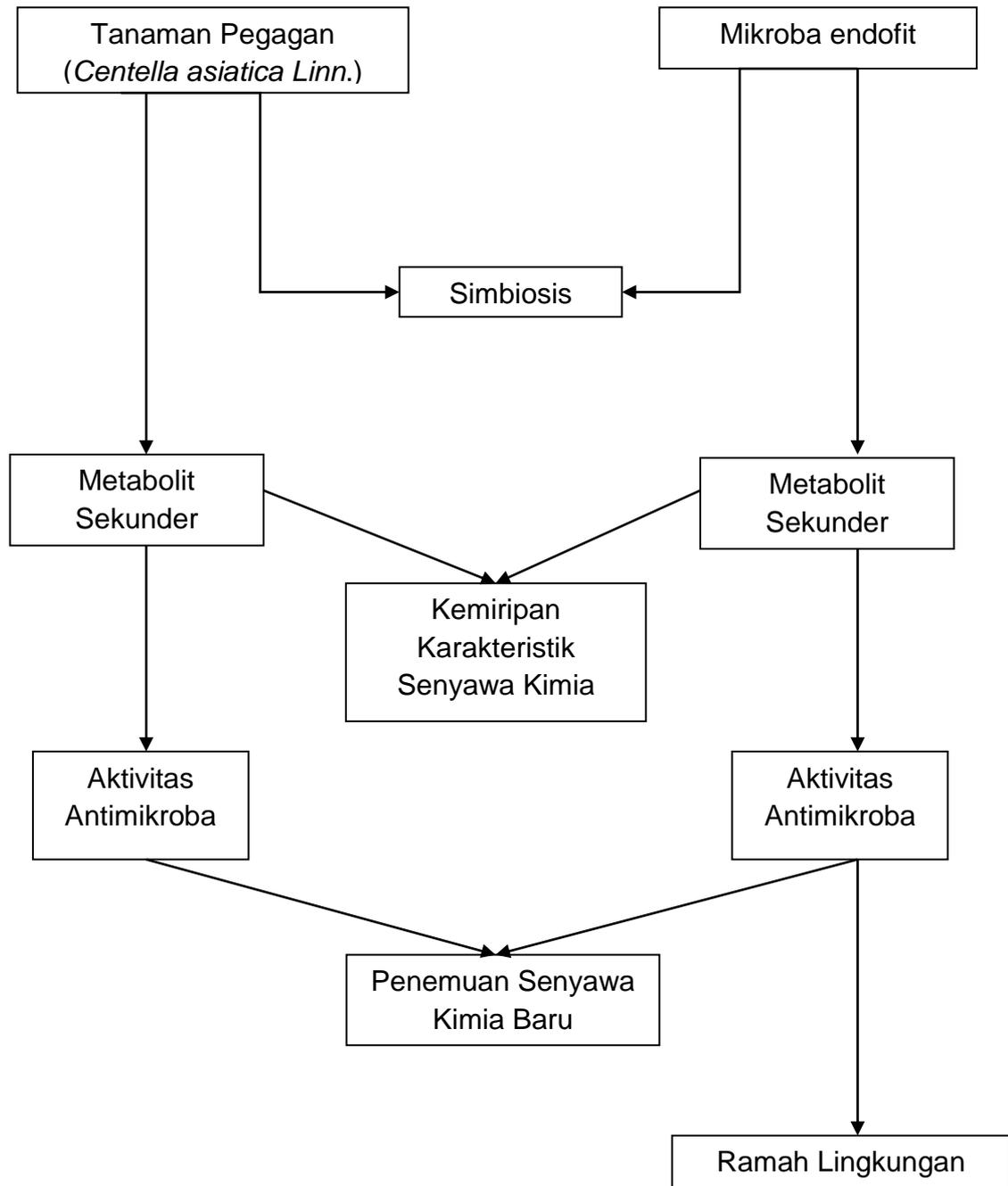
dalam mikrobiologi adalah deteksi agen infeksius dan diskriminasi nonpathogenik dari strain patogen berdasarkan gen tertentu. PCR digunakan untuk memperkuat bagian untai DNA yang pendek dan terdefinisi dengan baik. Ini bisa menjadi gen tunggal, atau hanya bagian dari gen. Berbeda dengan organisme hidup, proses PCR hanya bisa menyalin fragmen DNA pendek; Biasanya sampai 10 kb (kb singkatan dari kilo base pairs). Metode tertentu dapat menyalin fragmen berukuran sampai 40 kb, yaitu Yang masih jauh lebih sedikit daripada DNA kromosom dari sel eukariotik - misalnya, sel manusia berisi sekitar tiga miliar pasang basa (Rahman *et al.*, 2013).

E. Filogenetik

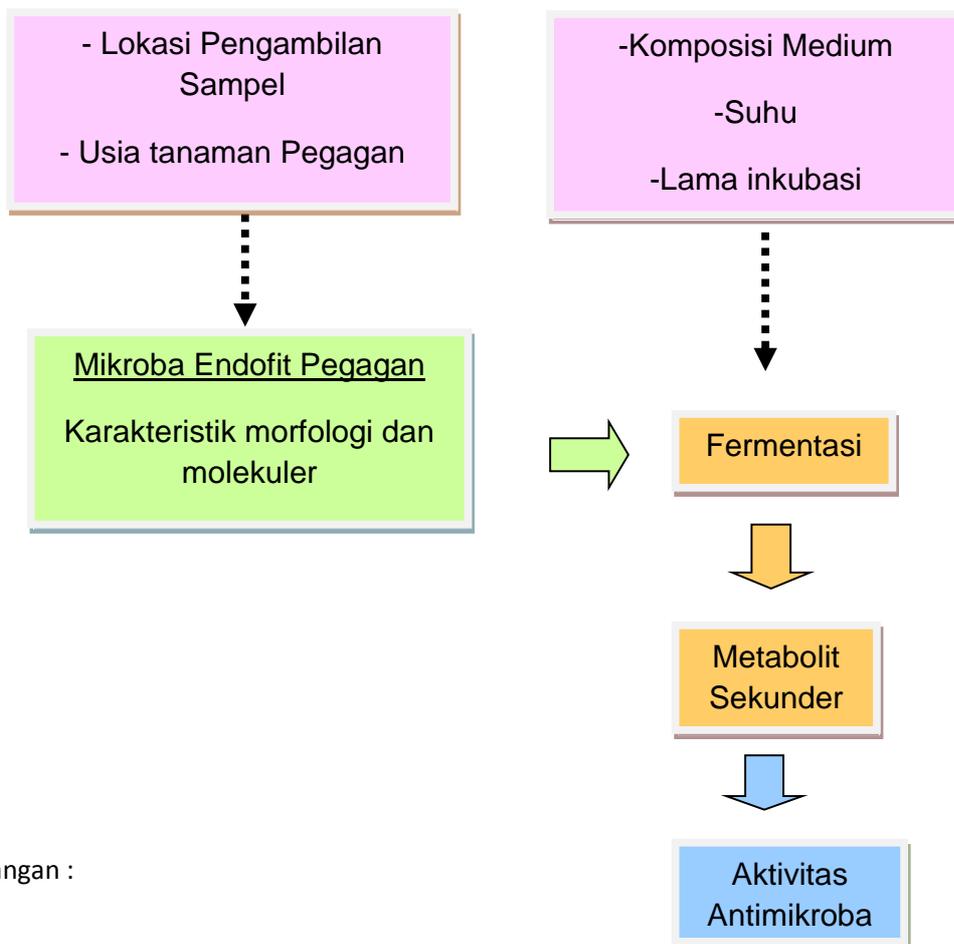
Filogenetik adalah bidang penelitian yang berkaitan dengan menemukan hubungan genetik antar spesies. Ide dasarnya adalah membandingkan karakter spesifik (fitur) spesies, dengan asumsi alami bahwa spesies serupa (yaitu, spesies dengan karakter serupa) secara genetik dekat. Istilah filogeni mengacu pada hubungan ini, biasanya disajikan sebagai pohon filogenetik. Filogenetik klasik terutama berhubungan dengan ciri fisik, atau morfologi ukuran, warna, jumlah kaki, dan lain-lain. Filogeni modern menggunakan informasi yang diambil dari bahan genetik terutama urutan DNA dan protein. Karakter yang digunakan biasanya adalah situs DNA atau protein (sebuah situs berarti satu posisi dalam urutan). Hubungan antara spesies kemudian

disimpulkan dari blok dalam penyelarasan beberapa urutan, satu dari setiap spesies yang diperiksa. Contoh yang menarik adalah sebuah proyek penelitian yang menggunakan filogenetik untuk melacak asal-usul populasi manusia di bumi. Periset menyelidiki DNA mitokondria dari 182 orang di seluruh bumi (DNA mitokondria sangat baik untuk penelitian filogenetik karena disalin sepenuhnya dari ibu ke anak, tanpa menggabungkannya dengan DNA ayah). Saat mempelajari filogeni menggunakan gen, kita menghadapi beberapa kesulitan. Selama evolusi, sangat umum bagi gen untuk diduplikasi. Salinan terus berkembang secara terpisah, menghasilkan dua (atau lebih) contoh serupa dari gen yang sama di sepanjang genom suatu spesies (Shamir., 2001).

F. Kerangka Teori



G. Kerangka Konsep



Keterangan :

 Variabel bebas

 Variabel kendali

 Variable antara

 Variabel terikat

 Hubungan variabel kendali

 Hubungan variabel bebas

 Hubungan variabel antara

 Hubungan variabel terikat

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian pengembangan yang bertujuan untuk mengisolasi mikroba endofit tanaman pegagan dan mengetahui aktivitas antimikroba serta karakteristik molekuler isolat mikroba endofit yang aktif sebagai antimikroba.

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Agustus 2017 sampai September 2017 di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Hasanuddin, Laboratorium Fitokimia Farmasi Universitas Hasanuddin, Laboratorium Biofarmaka Universitas Hasanuddin

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu alat-alat gelas, seperangkat alat *Polimerase Chain Reaction* (PCR), alat *sentrifuge*, autoklaf, cawan petri, enkas, inkubator, jangka sorong, *laminar air flow* (LAF), lemari pendingin, mikropipet, oven dan shaker.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu air suling, aluminium foil, etanol 70%, etil asetat, larutan NaOCl 5,25 %, medium NA, medium PDA, mikroba uji (*Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella thyposa*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Propionibacterium acne*), paper disk, dan sampel tanaman pegagan (*Centella asiatica L.*).

D. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan dan penyiapan sampel

a. Pengambilan Sampel

Sampel penelitian yang digunakan adalah daun dan batang tanaman pegagan yang diperoleh dari Bantabantaeng, kecamatan Rappocini, kota Makassar, Provinsi Sulawesi selatan.

b. Pengolahan sampel

Sampel penelitian dibersihkan menggunakan air mengalir hingga bersih, kemudian sampel penelitian siap digunakan

2. Penyiapan mikroba uji

Mikroba uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu bakteri dan fungi. Bakteri yang digunakan adalah *Escherichia coli*, *Staphylococcus*

aureus, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Propionibacterium acne*, sedangkan fungi yang digunakan adalah *Candida albicans*, *Malassezia furfur*, *Pyricularia oryzae* dan *Fusarium oxysporum*. Stok bakteri dan jamur yang berasal dari stok kultur koleksi Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Hasanuddin dan Pusat Kegiatan Penelitian Biofarmaka Universitas Hasanuddin diremajakan dalam medium NA miring untuk bakteri dan PDA miring untuk jamur serta diinkubasi untuk bakteri pada suhu 37°C selama 1x24 jam dan untuk jamur pada suhu kamar selama 3x24 jam. Kemudian didispersikan dengan air steril yang selanjutnya dapat digunakan sebagai mikroba uji.

3. Pembuatan Medium

a. Pembuatan potato dekstrosa agar (pda)

Medium PDA ditimbang sebanyak 39 gram kemudian dilarutkan dalam 1000 ml air suling dan dipanaskan. Kemudian media yang sudah jadi disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 2 atm selama 15 menit.

b. Pembuatan potato dekstrosa broth (PDB)

Medium PDB ditimbang sebanyak 26,5 gram kemudian dilarutkan hingga 1000 ml dengan air suling. Selanjutnya medium yang sudah jadi disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

c. Pembuatan potato dekstrosa yeast (PDY)

Medium PDB ditimbang sebanyak 26,5 gram dan media ekstrak yeast ditimbang sebanyak 4 gram kemudian dilarutkan hingga 1000 ml dengan air suling dan dipanaskan. Selanjutnya medium yang sudah jadi disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

d. Pembuatan nutrisi agar (NA)

Medium NA ditimbang sebanyak 23 gram kemudian dilarutkan dalam 1000 ml air suling dan dipanaskan. Selanjutnya medium yang sudah jadi disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 2 atm selama 15 menit.

e. Pembuatan nutrisi broth (NB)

Medium NB ditimbang sebanyak 13 gram kemudian dilarutkan dalam 1000 ml air suling dan dipanaskan. Selanjutnya medium yang sudah jadi disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 2 atm selama 15 menit.

4. Isolasi Mikroba Endofit

a. Isolasi bakteri endofit

Tanaman pegagan dibersihkan menggunakan air mengalir. Diambil daun dan tangkai daun 2 cm, dan dilakukan disinfeksi dengan etanol 70% selama 1 menit, dilanjutkan dengan Natrium Hipoklorit *Bayclin* 5,25%. Dicuci kembali menggunakan etanol 70% selama 30 detik, dilanjutkan dengan pembilasan menggunakan air steril selama 1 menit. Pembilasan dengan air steril dilakukan sebanyak dua kali. Air bilasan terakhir diambil sebanyak 1 mL dan disimpan pada cawan

petri berisi media Nutrien Agar (NA). kemudian sampel dikeringkan dengan menggunakan *tissue* steril selama satu menit. Sampel kemudian dipotong 1 cm, dan tangkai daun dibelah menjadi dua bagian kemudian masing-masing sampel diletakkan dalam medium Nutrien Agar (NA). dilakukan inkubasi 37 °C selama 1 hari (Jasim *et al.*, 2014).

b. Isolasi fungi endofit

Tanaman pegagan dibersihkan menggunakan air mengalir. Diambil daun dan tangkai daun sebesar 2 cm, dan dilakukan disinfeksi dengan etanol 70% selama 1 menit, dilanjutkan dengan Natrium Hipoklorit *Bayclin* 5,25%. Dicuci kembali menggunakan etanol 70% selama 30 detik, dilanjutkan dengan pembilasan menggunakan air steril selama 1 menit. Pembilasan dengan air steril dilakukan sebanyak dua kali. Air bilasan terakhir diambil sebanyak 1 mL dan disimpan pada cawan petri berisi media Potato dekstroza Agar (PDA). kemudian sampel dikeringkan dengan menggunakan *tissue* steril selama satu menit. Sampel kemudian dipotong 1 cm, dan petiole dibelah menjadi dua bagian kemudian masing-masing sampel diletakkan dalam medium Potato dekstroza Agar (PDA), kemudian diinkubasi dalam suhu kamar selama 3 hari (Qadri *et al.*, 2013).

c. Pemurnian mikroba endofit

Mikroba endofit yang telah diinkubasi diidentifikasi berdasarkan ciri-ciri makroskopis. Pengamatan makroskopis dengan

cara langsung melihat warna koloni, warna koloni (pigmentasi koloni) dan pola penyebaran koloni jamur endofit. Kemudian dilakukan subkultur untuk mendapatkan biakan murni (Akmalasari *et al.*, 2013).

d. Uji antagonis mikroba endofit

Dilakukan penyiapan agar, strain mikroba endofit dibiakkan di cawan petri steril menggunakan medium sesuai, medium NA untuk bakteri dan medium PDA untuk fungi. Setelah inkubasi, agar sebesar 5 mm ditempatkan pada medium agar yang berisi mikroorganisme uji. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur. Isolat yang memiliki aktivitas signifikan akan dilanjutkan pada perlakuan selanjutnya. Diameter zona hambat diklasifikasikan sebagai berikut : kurang dari 20 mm (*strong inhibition*), 5-10 mm (*moderate inhibition*) dan kurang dari 5 mm (*weak inhibition*). Isolat yang stabil membentuk zona jernih pada 3 kali pengujian dipilih sebagai isolat untuk pengujian (Ramos *et al.*, 2016).

e. Fermentasi isolat dan ekstraksi metabolit sekunder

Isolat terpilih diinokulasikan ke dalam pada medium cair steril yang sesuai: Nutrient broth (NB) untuk isolat bakteri dan Potato dekstrosa yeast (PDY) untuk isolat fungi. Labu diinkubasi selama 3 minggu pada *shaker* 150 rpm. Kemudian hasil fermentasi diekstraksi dengan menggunakan etil asetat (1:1) dan dievaporasi. Ekstrak di

simpan pada suhu 4°C untuk digunakan lebih lanjut (Senthilmurugan *et al.*, 2013).

f. Pembuatan kurva bobot sel kering fungi endofit

Isolat diinokulasi ke dalam media PDA, diinkubasi selama 7 hari, kemudian disiapkan media fermentasi PDY sebanyak 10 mL dalam 25 wadah steril. Sedotan steril diameter 5 mm digunakan untuk memindahkan isolat dari media padat ke dalam media fermentasi. Kemudian diinkubasi dalam suhu kamar. Pertumbuhan isolat diamati tiap hari dengan menyaring hasil fermentasi, dan dimasukkan dalam oven selama 24 jam pada suhu 70 °C. Ditimbang biomasanya kemudian dibuat kurva pertumbuhan antara waktu pengambilan sampel dengan bobot biomassa (Srikandace *et al.*, 2007).

g. Penentuan waktu optimum fermentasi mikroba endofit

Isolat diinokulasikan ke dalam media fermentasi cair PDY untuk isolat fungi dan NB untuk isolat bakteri. Kemudian diinkubasi masing-masing medium tersebut pada suhu kamar (25°C) selama 21 hari dalam kondisi terkocok, Setiap hari disampling masing-masing cairan fermentasi sebanyak 1 ml dan disimpan dalam tabung eppendorf yang steril. Selanjutnya masing-masing cairan fermentasi tersebut disentrifus dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu kamar selama sepuluh menit dan diambil filtratnya. Kemudian dilakukan uji aktivitas

antimikroba dari masing-masing filtrat untuk mengetahui waktu inkubasi terbaik dari kedua jenis isolat endofit tersebut.

h. Uji aktivitas antimikroba metabolit sekunder mikroba endofit

Pengujian ini menggunakan metode difusi yaitu sebanyak 20 µl dispersi mikroba uji dimasukkan ke dalam botol steril, lalu ditambahkan 20 ml medium NA untuk bakteri uji dan PDA untuk jamur uji, dihomogenkan dan dituang ke dalam cawan petri, dibiarkan hingga memadat. Sebanyak 20 µl ekstrak dari masing-masing isolat yang dibuat konsentrasi sebesar 2500ppm, 5000ppm, 7500ppm, dan 10000ppm serta kontrol positif (*kloramfenikol*) dan kontrol negatif (*etil asetat*) dimasukkan ke dalam kertas cakram. Setelah semua pelarut menguap selanjutnya kertas cakram diletakkan pada permukaan medium yang telah berisi suspensi mikroba patogen, lalu diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C untuk medium NA dan tiga hari pada suhu 25°C untuk medium PDA. Selanjutnya diamati dan diukur zona hambatan yang terbentuk. Diameter zona hambatan lebih dari 20 milimeter menunjukkan penghambatan sangat kuat, 10 hingga 20 milimeter penghambatan kuat, 5 hingga 10 milimeter penghambatan sedang dan kurang dari 5 millimeter penghambatan lemah. Isolat yang stabil akan membentuk zona jernih pada tiga kali pengujian dan akan dipilih sebagai isolat aktif untuk pengujian selanjutnya (Rante *et al.*, 2013).

i. Pemisahan senyawa secara kromatografi lapis tipis (KLT)

Ekstrak sampel yang memiliki zona hambatan kemudian dipisahkan secara KLT, dengan cara lempeng KLT diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 110° C selama 30 menit sebelum digunakan. Sampel tersebut ditotolkan pada KLT ukuran 8 x 3 cm, kemudian dielusi di dalam chamber yang sudah jenuh dengan cairan pengelusi hingga batas 1 cm dari tepi atas lempeng. Lempeng dikeluarkan dari chamber dan diangin-anginkan hingga cairan pengelusi menguap. Selanjutnya diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm dan dihitung nilai Rf nodanya (Akhyar *et al.*, 2010).

j. Pengujian KLT bioautografi

Medium sebanyak 15 ml yang telah dicampur dengan 0,2 ml suspensi mikroba uji dituang ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan memadat. Setelah media memadat, lempeng KLT yang telah dielusi diletakkan di atas permukaan media agar. Setelah 30 menit lempeng tersebut diangkat dan dipindahkan, kemudian medium yang telah ditempati lempeng KLT diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, diamati zona hambatan yang terbentuk (Akhyar *et al.*, 2010).

k. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan untuk memisahkan genom DNA dari molekul-molekul lain dalam sel. Pada tahapan ini, ekstraksi DNA

dilakukan dengan menggunakan kit Geneaid Presto™ Mini gDNA Tissue yang merupakan kit ekstraksi DNA jaringan. Isolat diambil sebanyak 25 mg dan di potong-potong kecil, ditempatkan dalam tabung eppendorf 1,5 mL lalu ditambahkan 180 µL Buffer ATL. Ditambahkan 20 µL *Proteinase K* kemudian dihancurkan dengan mikropastel. Kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit sehingga miselia jamur tersebut benar-benar hancur. Dilanjutkan dengan proses lysis, ditambahkan GBT buffer pada sampel kemudian sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu 60°C.

Berikutnya dilakukan penambahan etanol absolut. DNA yang diperoleh kemudian dipindahkan ke dalam GD column. Pada tahap ini dilakukan pencucian menggunakan wash buffer.

Pada tahapan selanjutnya dilakukan proses rehidrasi DNA dengan menambahkan larutan pre-heated Elution buffer. Setelah proses rehidrasi selesai maka dihasilkan produk DNA.

I. Amplifikasi polymerase chain reaction

Amplifikasi DNA berlangsung dengan tahap sebagai berikut. Tahap awal debaturasi 95°C selama 3 menit, denaturasi 95°C selama 15 detik, suhu annealing 50-60°C selama 15 detik dan extension 72°C selama 15 detik. Pada tahapan akhir proses PCR dilakukan Final Extension selama 3 menit pada suhu 75°C dengan 36 siklus. Dalam tahapan PCR digunakan primer Forward ITS5 dan Reverse ITS4 yang secara spesifik akan mengamplifikasi target sebagai berikut:

Primer Forward : (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')

Primer Reverse : (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

m. Elektroforesis

Sebanyak 1 gr ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL Buffer TAE ke dalam Erlenmeyer, dipanaskan dalam *microwave* selama 2 menit hingga mendidih, kemudian ditambahkan 8 μ L etidium bromida. Cairan gel dituang dalam container pencetak agarose hingga memadat. Dimasukkan 5 μ L produk PCR masing-masing sampel yang diamplifikasi ke dalam sumur pada agarose yang terendam dalam tangki yang berisi TAE Buffer. Proses elektroforosis dijalankan pada tegangan 100 volt selama 50 menit. Lapisan gel hasil elektroforesis diamati dibawah sinar UV-transminator.

n. Pembuatan Pohon filogenetik

Data sekuen dianalisis menggunakan ABI Auto *Assambler* dan sekuen yang telah dianalisis, dideterminasi menggunakan Auto Assambler. Kesamaan/similaritas dengan galur-galur referensi terdekat pada DNA Data Bank dapat diketahui dengan melakukan analisis Blast pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov Multiple Alignment dari sekuen dilakukan dengan program Clustal W. Untuk membangun pohon filogenetik digunakan metode *neighbour-joining algorithm*. Stabilitas pengelompokkan (*robustness*) diperhitungkan menggunakan bootstrap dengan 1000 kali ulangan.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi mikroba endofit (fungi endofit dan bakteri endofit) dari pegagan (*Centella asiatica L*) meliputi bagian tangkai daun dan daunnya. Isolat mikroba endofit diuji antagonis untuk mengetahui aktivitas antimikroba terhadap beberapa mikroba patogen. Isolat yang dengan aktivitas antimikroba paling baik akan dipilih dan dikarakterisasi secara molekuler berdasarkan sekuen gen ITS untuk isolat fungi endofit dan sekuen gen 16S rRNA untuk bakteri endofit. Isolat mikroba endofit juga difermentasi untuk memperoleh metabolit sekundernya.

A. Isolasi Mikroba Endofit

Mikroba endofit dapat diisolasi dari berbagai bagian tanaman seperti jaringan meristem, segmen daun, pelepah daun, akar, batang, kulit kayu, tangkai daun, dan kuncup bunga (Nair & Padmavathy., 2014). Pada penelitian ini mikroba endofit pegagan diisolasi dari bagian tangkai daun dan daun.

Proses isolasi mikroba endofit diawali dengan melakukan sterilisasi permukaan menggunakan NaOCl 2-10%, etanol 70-95%, dan air steril. Sterilisasi permukaan dilakukan untuk menghilangkan kontaminasi

mikroba pada permukaan sampel (Strobel *et al*; 2004). Bagian tanaman yang telah disterilkan diletakkan pada medium NA (*Nutrient Agar*) untuk mengisolasi bakteri endofit dan medium PDA (*Potato Dextrosa Agar*) untuk mengisolasi fungi endofit. Isolat-isolat mikroba endofit yang tumbuh dipisahkan berdasarkan karakteristik morfologi, diperoleh 6 isolat mikroba endofit, 2 isolat merupakan bakteri endofit dan 4 isolat fungi endofit.

B. Uji Antagonis Isolat Mikroba Endofit Terhadap Mikroba Patogen

Uji antagonis menggunakan metode *Agar block* untuk mengetahui isolat yang memiliki aktivitas sebagai antimikroba. Mikroba patogen yang digunakan dalam pengujian ini adalah bakteri gram negatif *Eschericia coli*, *Salmonella typhosa*, *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteri gram positif *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes* serta fungi *Candida albicans*. Berdasarkan hasil uji antagonis (Tabel 1) dari enam isolat mikroba endofit tersebut diperoleh data bahwa isolat BEF1 memiliki zona hambatan yang besar pada *Propionibacterium acnes* dan *S. typhosa* dibandingkan isolat yang lain. Semua isolat menunjukkan daya hambat terhadap *Propionibacterium acnes*. Hanya isolate BEF1, FEF2, dan FEF4 yang menunjukkan zona hambatan pada *Candida albicans*. Oleh karena itu, isolat BEF1 dan FEF2 dipilih untuk dilanjutkan ke tahap identifikasi molekuler dan produksi metabolit sekundernya.

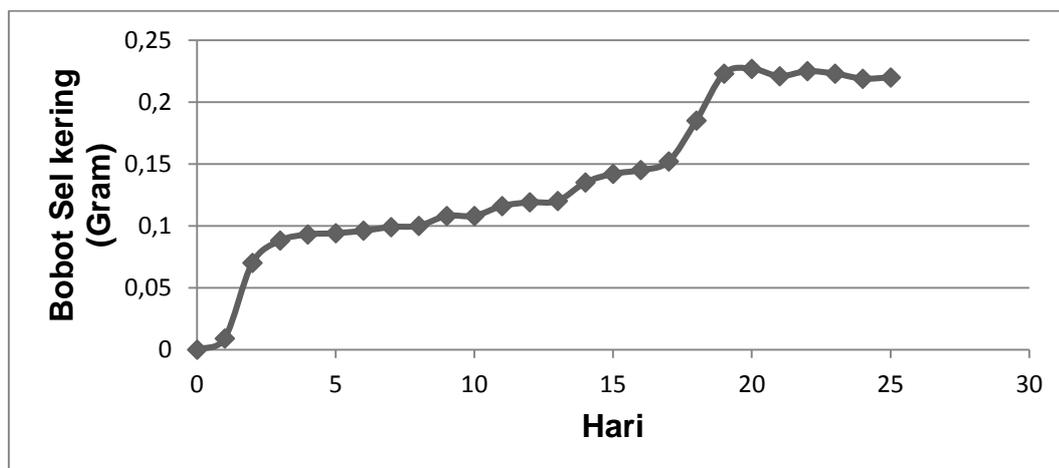
Tabel 1. Hasil uji antagonis isolat mikroba endofit

Isolat	Mikroba uji						
	<i>S.aureus</i>	<i>P.acne</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.typhosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>C.Albicans</i>
BEF1	+	+	+	+	+	-	+
BEF2	-	+	+	+	+	-	-
FEF1	+	+	+	+	-	-	-
FEF2	+	+	+	+	+	-	+
FEF3	+	+	+	+	+	-	-
FEF4	+	+	-	+	-	-	+

Keterangan: (+) Terbentuk zona hambatan dan (-) tidak membentuk zona hambatan.

C. Penentuan Waktu Optimum Fermentasi Mikroba Endofit

Isolat yang memiliki aktivitas yang lebih besar yaitu isolat bakteri endofit BEF1 dan isolat fungi endofit FEF2 kemudian dilakukan fermentasi untuk mengetahui waktu optimum dihasilkannya metabolit sekunder yang memiliki aktivitas sebagai antimikroba, dan dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan miselia isolat fungi endofit FEF2 dengan mengetahui bobot sel kering selama proses fermentasi. Proses pengamatan bobot sel kering isolat fungi endofit FEF2 diawali dengan melakukan kultur mikroba endofit pada media cair PDY (*Potato Dextrosa Broth*) untuk fungi. Isolat fungi endofit FEF2 dikulturkan pada medium PDY dalam dua puluh lima wadah medium steril berbeda. Setiap satu hari kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring, hasil saringan dan kertas saring dikeringkan dalam oven 70°C selama 24 jam kemudian ditimbang massanya.

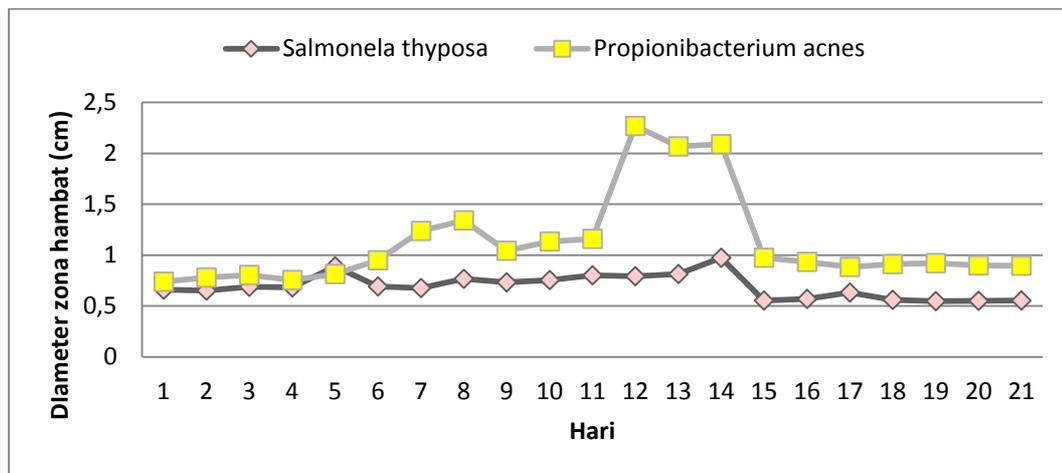


Gambar 2. Kurva pengukuran bobot sel kering miselia isolat fungi endofit FEF2

Kurva pengukuran bobot sel kering miselia fungi endofit FEF2 di atas menunjukkan pada hari ke-0 sampai dengan hari ke-1, mengalami fase lag atau fase adaptasi dilanjutkan dengan fase pertumbuhan yang dipercepat. Pada fase lag mikroorganisme melakukan penyesuaian diri dengan lingkungannya yang baru. Berbagai macam enzim dan zat-zat perantara dibentuk pada fase ini, sehingga memungkinkan terjadi pertumbuhan lebih lanjut. Sel-sel pada fase ini mulai membesar, tetapi belum melakukan pembelahan sel, sedangkan pada fase pertumbuhan yang dipercepat mikroorganisme mulai melakukan pembelahan diri (Natsir & Sartini., 2008). Hari ke-1, FEF2 sudah menunjukkan adanya pertumbuhan dengan bobot sel kering 0.009 gram. Hal ini berarti bahwa isolat fungi endofit FEF2 mampu beradaptasi dan tumbuh pada media PDY.

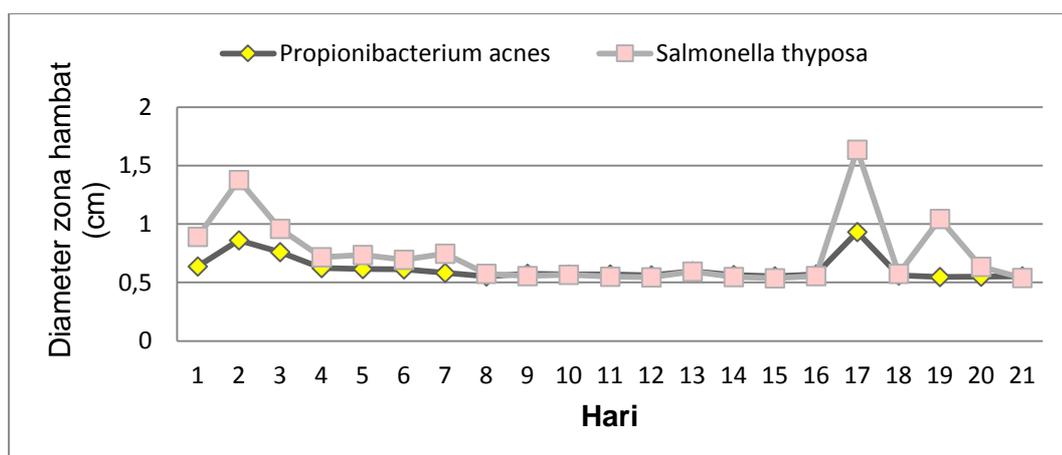
Isolat fungi endofit FEF2 mengalami fase logaritma dari hari ke-4 sampai hari ke 19, hal ini terlihat pada kurva pertumbuhan yang menunjukkan terjadinya peningkatan bobot sel kering. Pada fase ini metabolisme cepat dan konstan, keadaan fase logaritma terus berlangsung sampai salah satu atau beberapa nutrisi habis, sehingga menyebabkan terhambatnya pertumbuhan mikroorganisme. Panjang pendeknya waktu generasi pada fase ini sangat tergantung pada spesies mikroorganisme, medium dan faktor lingkungan selama pertumbuhan (Djide & Sartini., 2008). Setelah hari ke-19 sampai hari ke-25, kurva pertumbuhan menunjukkan bahwa isolat fungi endofit FEF2 mulai memasuki fase stasioner. Pada fase ini sel menjadi tua, laju pembiakan berkurang dan beberapa sel mati karena menyusutnya nutrisi dalam media.

Dilakukan uji aktivitas cairan hasil fermentasi pada isolat mikroba endofit untuk mengetahui waktu optimal dihasilkannya metabolit sekunder dari mikroba endofit yang memiliki aktivitas sebagai antimikroba. Isolat bakteri endofit BEF1 dan isolat fungi endofit FEF 2 difermentasikan pada media fermentasi cair, kemudian hasil fermentasi diambil 1 ml setiap hari pada saat fermentasi. Hasil fermentasi tersebut disentrifugasi dan filtratnya digunakan untuk uji aktivitas terhadap mikroba patogen. Zona hambat yang muncul kemudian diukur dan dibuat kurva aktivitas cairan fermentasi.



Gambar 3. Kurva zona hambat cairan hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2

Kurva di atas menunjukkan bahwa zona hambat cairan hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 paling besar pada hari ke 14 untuk *Salmonella typhosa* dan hari ke 12 untuk *Propionibacterium acnes* yaitu sebesar 20.9 mm dan 9.7 mm. Berdasarkan perhitungan bobot sel kering miselia isolat fungi endofit FEF2, zona hambat yang paling besar berada pada fase logaritma dengan bobot sel kering miselia 0.135 gram.



Gambar 4. Kurva zona hambat cairan hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1

Kurva di atas menunjukkan BEF1 mengalami dua kali peningkatan zona hambat serupa terhadap bakteri uji *Propionibacterium acnes* dan *Salmonella typhosa*, yaitu pada hari ke-2 dan hari ke-17. Zona hambat yang paling besar terhadap bakteri uji *Propionibacterium acnes* dan *Salmonella typhosa*, 9.3 mm dan 16.3 mm. Hasil fermentasi dari kedua isolat tersebut tidak menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap fungi patogen *C. albican*. Hal ini dapat terjadi karena beberapa faktor, antara lain tingkat sensitifitas dari mikroba uji, kecepatan difusi dari senyawa antimikroba serta konsentrasi senyawa yang digunakan. Waktu optimal fermentasi pada isolat BEF1 yaitu pada hari ke 17 dan isolat FEF2 yaitu pada hari ke 14, dengan melihat zona hambat pada kedua bakteri uji.

Berdasarkan perbandingan dari aktivitas fermentasi dan pertumbuhan dari isolat bakteri endofit BEF1 dan isolat fungi endofit FEF2, dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri endofit BEF1 dan isolat fungi endofit FEF2 yang didapatkan menghasilkan metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antimikroba. Metabolit sekunder pada mikroba tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan, perkembangan, dan reproduksi seperti metabolit primer. Ada beberapa hipotesis tentang fungsi metabolit sekunder, salah satunya yaitu melakukan produksi anttimikroba. Pembentukan metabolit sekunder diatur oleh nutrisi, kecepatan pertumbuhan, dan induksi enzim. Keterbatasan nutrisi dan penurunan kecepatan pertumbuhan akan menghasilkan sinyal yang mempunyai efek

regulasi sehingga menyebabkan diferensiasi kimia (metabolit sekunder) (Nofiani., 2008).

D. Produksi Dan Uji Aktivitas Ekstrak Hasil Fermentasi Mikroba

Endofit

Proses fermentasi isolat FEF1 berlangsung selama dua puluh satu hari pada suhu kamar menggunakan medium PDY dan fermentasi isolat BEF1 berlangsung selama 21 hari pada suhu kamar menggunakan medium NB pada *rotary shaker*. Hasil fermentasi dari isolat bakteri endofit BEF1 dan isolat fungi endofit FEF2 disonikasi dengan tujuan memecahkan sel mikroba sehingga metabolitnya keluar dari dalam sel dan mempercepat waktu ekstraksi. Media fermentasi disaring untuk memisahkan sel-sel mikroba. Filtrat diekstraksi menggunakan etil asetat dengan jumlah yang sama (1:1 v/v) sebanyak 3 kali menggunakan pelarut yang baru. Ekstrak dikumpulkan kemudian pelarutnya diuapkan menggunakan rotavapor. Ekstrak etil asetat dari kedua isolat yang didapatkan adalah 44.9 mg untuk BEF1 dan 62.5 mg untuk FEF2 dari 150 ml media kultur dengan menggunakan 450 ml penyari etil asetat

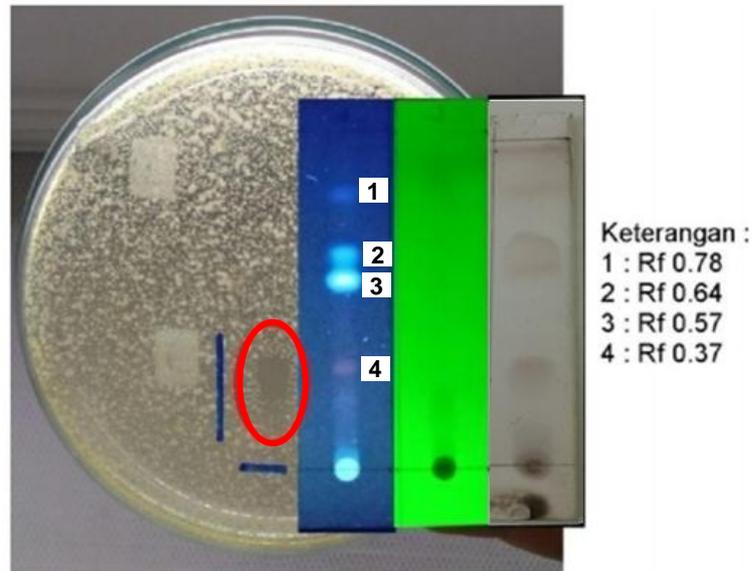
Ekstrak yang diperoleh dari hasil fermentasi diuji aktivitas antimikrobanya terhadap *Propionibacterium acnes* dan *Salmonella typhosa* dan diukur diameter zona hambatan yang terbentuk. Berdasarkan data yang diperoleh menunjukkan bahwa senyawa metabolit yang dihasilkan oleh isolat fungi endofit FEF2 dan bakteri endofit BEF1 memiliki aktivitas antimikroba. Hal ini dapat dilihat melalui zona hambat yang

dihasilkan. Pada konsentrasi 10.000 ppm atau 1% ekstrak isolat fungi endofit FEF2 menunjukkan zona hambat 9.3 mm terhadap *Salmonella typhosa*, dan 8.3 mm terhadap *Propionibacterium acnes*. Isolat bakteri endofit BEF1 pada konsentrasi 10.000 ppm atau 1% menunjukkan zona hambat 8.1 mm terhadap bakteri *Salmonella typhosa*, dan 6.2 mm terhadap *Propionibacterium acnes*. Hasil yang diperoleh jauh lebih kecil dibandingkan dengan hasil De somnath *et al* 2015 melakukan uji in vitro ekstrak fungi endofit pada tanaman pegagan, ekstrak etil asetat menunjukkan penghambatan yang besar yaitu 18 mm sedangkan heksan 13 mm dan ekstrak methanol tidak menunjukkan adanya zona hambat pada bakteri uji *S. aureus*

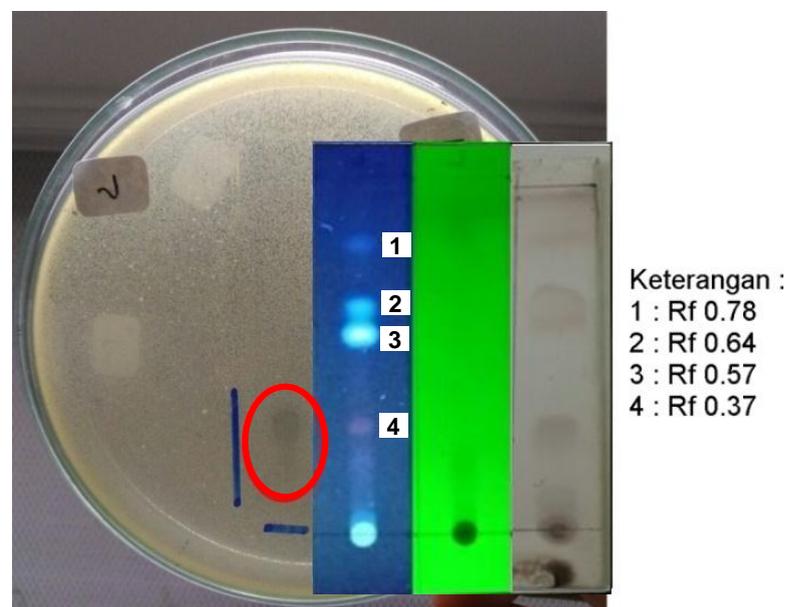
E. KLT Bioautografi

Ekstrak etil asetat dari hasil fermentasi bakteri endofit BEF1 dan fungi endofit FEF2 ditotolkan pada lempeng KLT dan dielusi menggunakan campuran etil asetat: heksan (1:5) dibandingkan dengan ekstrak etil asetat herba pegagan.

Hasil profil KLT dari ekstrak etil asetat herba pegagan dan ekstrak etil asetat mikroba endofit dengan menggunakan eluan etil asetat : heksan (1:5) menunjukkan bahwa adanya kemiripan senyawa ekstrak metabolit yang dihasilkan isolat mikroba endofit dengan tanaman inangnya yaitu pegagan. Hasil visualisasi menunjukkan bahwa nampak empat noda pada ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit FEF2 dengan nilai Rf 0.37, 0.57, 0.64, 0.78. Zona bening tampak pada nilai Rf 0.37.



Gambar 6. Kromatogram ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat FEF2 dan zona hambatnya terhadap *Propionibacterium acnes*



Gambar 7. Kromatogram ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat FEF2 dan zona hambatnya terhadap *Salmonella typhosa*

F. Karakterisasi Molekuler dan Pembuatan Pohon Filogenetik

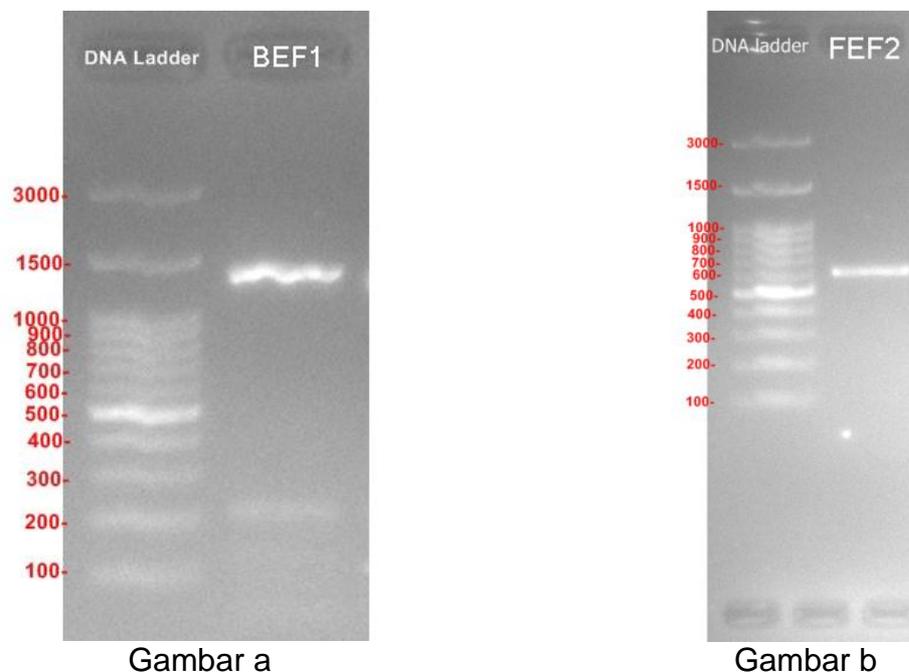
Ekstraksi DNA dilakukan untuk memisahkan genom DNA dari molekul-molekul lain dalam sel. Pada tahapan ini, ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan kit Geneaid Presto™ Mini gDNA Tissue yang merupakan kit ekstraksi DNA jaringan. Isolat diambil sebanyak 25 mg dan di potong-potong kecil, ditempatkan dalam tabung eppendorf 1,5 mL lalu ditambahkan 180 µL Buffer ATL di mana berfungsi untuk mempermudah proses lisis. Ditambahkan 20 µL *Proteinase K* kemudian dihancurkan dengan mikropastel. Proteinase K berfungsi untuk memutus ikatan peptida pada protein yang terdapat pada miselia. Kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit sehingga miselia jamur tersebut benar-benar hancur. Tahapan selanjutnya adalah lisis, pada tahapan ini dilakukan penambahan GBT buffer pada sampel kemudian sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu 60°C untuk membantu mempercepat terjadinya lisis pada sel.

Berikutnya dilakukan penambahan etanol absolut untuk mengumpulkan DNA, tahapan ini juga disebut DNA *binding* karena pada tahapan ini DNA sampel dikumpulkan, dalam hal ini konsentrasi etanol yang tinggi tidak akan merusak DNA, melainkan dengan semakin tinggi konsentrasi etanol yang digunakan maka semakin kuat etanol mengumpulkan DNA. DNA yang diperoleh kemudian dipindahkan ke dalam GD column. Matriks pada GD column akan mengikat DNA sementara kontaminan akan tersuspensi. Pada tahap ini dilakukan

pencucian menggunakan wash buffer, wash buffer akan menghilangkan kontaminan sedangkan DNA tetap terikat dimatriks. Pada tahapan selanjutnya dilakukan proses rehidrasi DNA yang bertujuan untuk mencairkan atau melepaskan DNA, karena produk DNA dalam bentuk sedimen. Rehidrasi dilakukan dengan menambahkan larutan pre-heated Elution buffer yang dapat melarutkan DNA. Setelah proses rehidrasi selesai maka dihasilkan produk DNA.

Amplifikasi DNA berlangsung dengan tahap sebagai berikut. Tahap awal denaturasi 95°C selama 3 menit, denaturasi 95°C selama 15 detik, suhu annealing 50-60°C selama 15 detik dan extension 72°C selama 15 detik. Pada tahapan akhir proses PCR dilakukan Final Extension selama 3 menit pada suhu 75°C dengan 36 siklus. Dalam tahapan PCR digunakan primer Forward ITS5 dan Reverse ITS4 yang secara spesifik akan mengamplifikasi target sebagai berikut: Primer Forward : (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') Primer Reverse: (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Pada tahap elektroforesis sebanyak 1 g ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL Buffer TAE ke dalam Erlenmeyer, dipanaskan dalam *microwave* selama 2 menit hingga mendidih, kemudian ditambahkan 8 µL etidium bromida. Cairan gel dituang dalam container pencetak agarose hingga memadat. Dimasukkan 5 µL produk PCR masing-masing sampel yang diamplifikasi ke dalam sumur pada agarose yang terendam dalam tangki yang berisi TAE Buffer. Proses elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 volt selama 50 menit.

Lapisan gel hasil elektroforesis diamati dibawah sinar UV-transminator. Keberhasilan produk amplifikasi PCR isolat DNA FEF2 pada daerah ITS dan BEF1 pada daerah rDNA diketahui melalui analisa elektroforesis. Amplifikasi PCR isolat DNA FEF2 menggunakan pasangan primer ITS5 dan ITS4, sedangkan isolat DNA BEF1 menggunakan primer 63F dan 1387R memberikan hasil yang baik dengan ditunjukkan adanya pita DNA pada gel agarosa yang dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Hasil elektroforesis isolat mikroba endofit. a (hasil elektroforesis isolat bakteri endofit BEF1), b (hasil elektroforesis isolat fungi endofit FEF2)

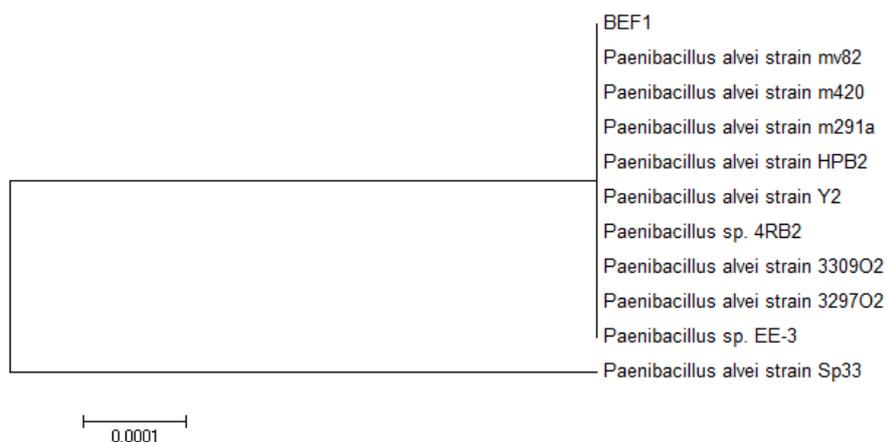
Hasil amplifikasi DNA dari kedua isolat endofit tersebut kemudian divisualisasi dengan elektroforesis. Terlihat bahwa DNA dari isolat fungi endofit FEF2 teramplifikasi memiliki panjang 600 bp dan untuk isolat

bakteri endofit BEF1 1400 bp. Hasil PCR disekuensing untuk mendapatkan sekuen basa berupa format ab1. Sekuen diedit pada *trace editor* MEGA 6.0 untuk memilih bagian sekuen yang akan digunakan untuk melakukan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) pada <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Setelah BLAST dilakukan maka akan didapatkan kumpulan data sekuen dari spesies dengan yang memiliki kemiripan urutan basa pada DNAny. Dibuat pohon filogenetik menggunakan perangkat lunak MEGA 6.06 dengan metode *neighbor joining* (NJ). Kelebihan metode NJ dianggap cepat dibandingkan metode yang lainnya, lebih praktis untuk menganalisis kumpulan data yang besar (ratusan atau ribuan taksa) dan untuk bootstrap atau tujuan analisis lainnya yang dapat dihitung secara komputasi (*Mihaescu et al., 2009*). Hasil BLAST dan pohon filogenetik menunjukkan bahwa BEF1 memiliki kekerabatan 100% dengan *Paenibacillus alvei*, sedangkan FEF2 memiliki kekerabatan 100% dengan *Colletotrichum gloeosporioides*

Paenibacillus alvei diisolasi pertama kali oleh Cheshire pada tahun 1885 pada larva lebah yang mati di Eropa dan dibuat genus *paenibacillus* pada tahun 1994 oleh ash et al. *Paenibacillus alvei* adalah bakteri aerobik, Gram positif, dan membentuk endospora (Djukic et al 2012), biasanya terdeteksi pada koloni lebah madu. Namun, dapat ditemukan di lingkungan lain termasuk tanah, susu, dan manusia. *Paenibacillus alvei* diisolasi dari tumbuhan dan digunakan sebagai biokontrol terhadap *Salmonella* pada tanaman tomat. Bakteri ini juga menunjukkan aktivitas

antimikroba spektrum luas terhadap patogen makanan gram negatif dan gram positif (Zheng., 2017).

Bakteri ini dapat tumbuh maksimal pada suhu 35-45 °C. tidak tumbuh pada pH 5.7, dapat tumbuh pada 2-7% NaCl, pertumbuhan maksimum 50-70 jam pada suhu 37 °C (Gochnauer., 1973). Pertumbuhan in vivo bakteri ini, membutuhkan hingga 24 jam untuk spora dan perkembangan dan sampai 9-10 hari untuk sporulasi berikutnya (Woodrow & Holst., 1942).

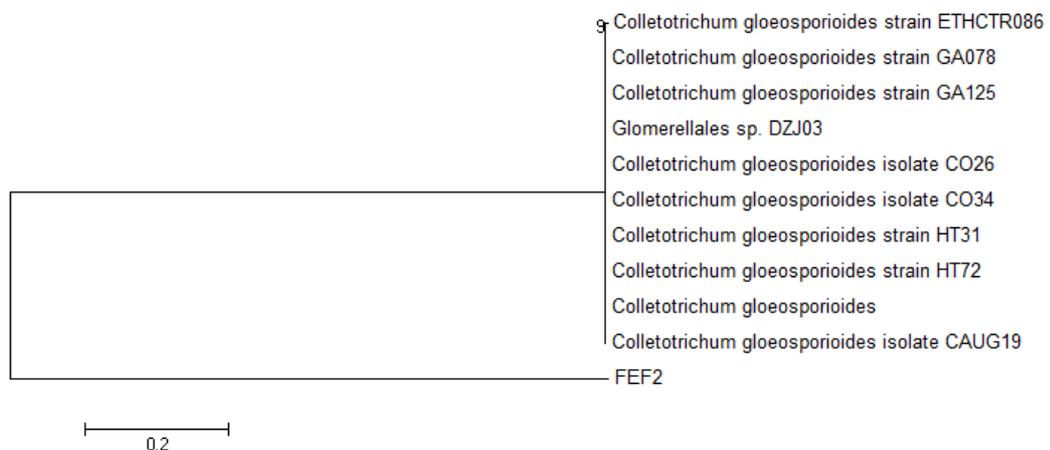


Gambar 9. Hasil pohon filogenetik isolat bakteri endofit BEF1

Genus *Colletotrichum Corda* mengandung banyak taksa yang secara morfologis serupa yang terdiri dari jamur endofit, saprobik, dan jamur patogen tanaman. Spesies *colletotrichum* menyebabkan antraknosa, yang dapat menyebabkan kerusakan pada tanaman seperti gandum, kopi, kacang-kacangan, alpukat, pisang dan mangga. Spesies *colletotrichum* juga ditemukan pada buah-buahan liar yang membusuk.

Spesies *Colletotrichum* yang menyebabkan penyakit tanaman yang serius juga umumnya terisolasi sebagai endofit dari tanaman yang sehat, dan telah diidentifikasi sebagai saproba pada tanaman mati (Photita., *et al.*, 2005).

Tumbuh paling baik pada suhu antara 25–30 °C, kelembapan >95%, dan rentang pH 5,8 hingga 6,5. Patogenesis dapat terjadi pada rentang suhu 20–30 °C. Acervuli melepaskan spora hanya ketika ada banyak kelembaban, jadi *C. gloeosporioides* tidak aktif selama musim kemarau. Sinar matahari langsung, suhu ekstrim, dan kelembaban rendah dapat menyebabkan spora menjadi tidak aktif. Ketiga faktor ini bisa menyebabkan inaktivasi spora (Sharma & Kulshrestha., 2015)



Gambar 10. Hasil pohon filogenetik isolat fungi endofit FEF2

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Diperoleh 2 isolat bakteri endofit dan 4 isolat fungi endofit dari pegangan. Hasil skrining fotokimia menunjukkan bahwa aktivitas terbesar pada isolat bakteri endofit BEF1 dan fungi endofit FEF2.
2. Ekstrak etil asetat isolat bakteri endofit BEF1 memiliki aktivitas penghambatan terhadap *P. acne* dan *S. thyposa* pada konsentrasi 10000 ppm (setara 10mg/ml) dengan diameter zona hambatan masing-masing sebesar 6.2 mm dan 8.1 mm. Sedangkan ekstrak etil asetat isolat fungi endofit FEF2 memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen *P. acne* dan *S. thyposa* pada konsentrasi 10000 ppm (setara 10 mg/ml) dengan diameter zona hambatan sebesar 9.3 mm dan 8.3 mm
3. Isolat bakteri endofit BEF1 memiliki kekerabatan 100% dengan *Paenibacillus alvei*, sedangkan isolat fungi endofit FEF2 memiliki kekerabatan 100% dengan *Colletotrichum gloeosporioides*.

B. Saran

Perlu dilakukan isolasi senyawa antimikroba dari isolat fungi endofit FEF2 dan bakteri endofit BEF1.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambrose., Manickavasagan, A., & Naik, R. 2016. *Leafy medicinal herbal: botany, chemistry, postharvest technology and uses*. Central institute of agricultural engineering, regional centre, Coimbatore. India.
- Akhyar, 2010. *Uji Daya Hambat dan Analisis KLT Bioautografi Ekstrak AKar dan Buah Bakau (Rhizopora Stylosa Griff.) Terhadap Vibrio Harveyi*. Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Akmalasari, I., Purwati, E. S., & Dewi S. 2013. Isolasi dan Identifikasi Jamur Endofit Tanaman Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Biosfera*, 30(2),82-89.
- Alvin., Miller, K.I., Neilan, B.A. 2014. *Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds*. *Microbiol. Res.*, 169:483–495
- Arumugam., Muniappan, A., Yesudason Justin Koil Pillai and Thangavel Sekar. 2011. Phytochemical Screening And Antibacterial Activity Of Leaf And Callus Extract of *Centella Asiatica*. *A journal of the Bangladesh pharmacological society* 6 55-60.
- Badan POM RI. 2012. *Acuan Sediaan Herbal* Volume ke 7 Edisi 1. Direktorat Obat Asli Indonesia. Jakarta. Indonesia.
- Comitte on herbal medicine product. 2010. *Assessment Report on Canella Asiatica (L) Urban, Herba*. European medicines agency: London. Ed 14
- Dash., Faruquee., Biswas., Alam., Sisir., Prodhana. 2011. Antibacterial and Antifungal Activities of Several Extracts of *Centella asiatica* L. against Some Human Pathogenic Microbes. *Life Sciences and Medicine Research*. 1-5
- Djide & sartini. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Farmasi*. Lembaga penerbit universitas Hasanuddin. Makassar.
- Djukic Marvin., Dominik Becker., Anja Poehlein., Sonja Voget., Rolf Danie., 2012. Genome Sequence of *Paenibacillus alvei* DSM 29, a Secondary Invader during European Foulbrood Outbreaks. *Journal of Bacteriology* p. 6365 Volume 194 no. 22
- De Somnath., Sanjib Rana., Nargis Parvin., 2015. In vitro antibacterial activity study of endophytic fungi extracts from the medicinal plants

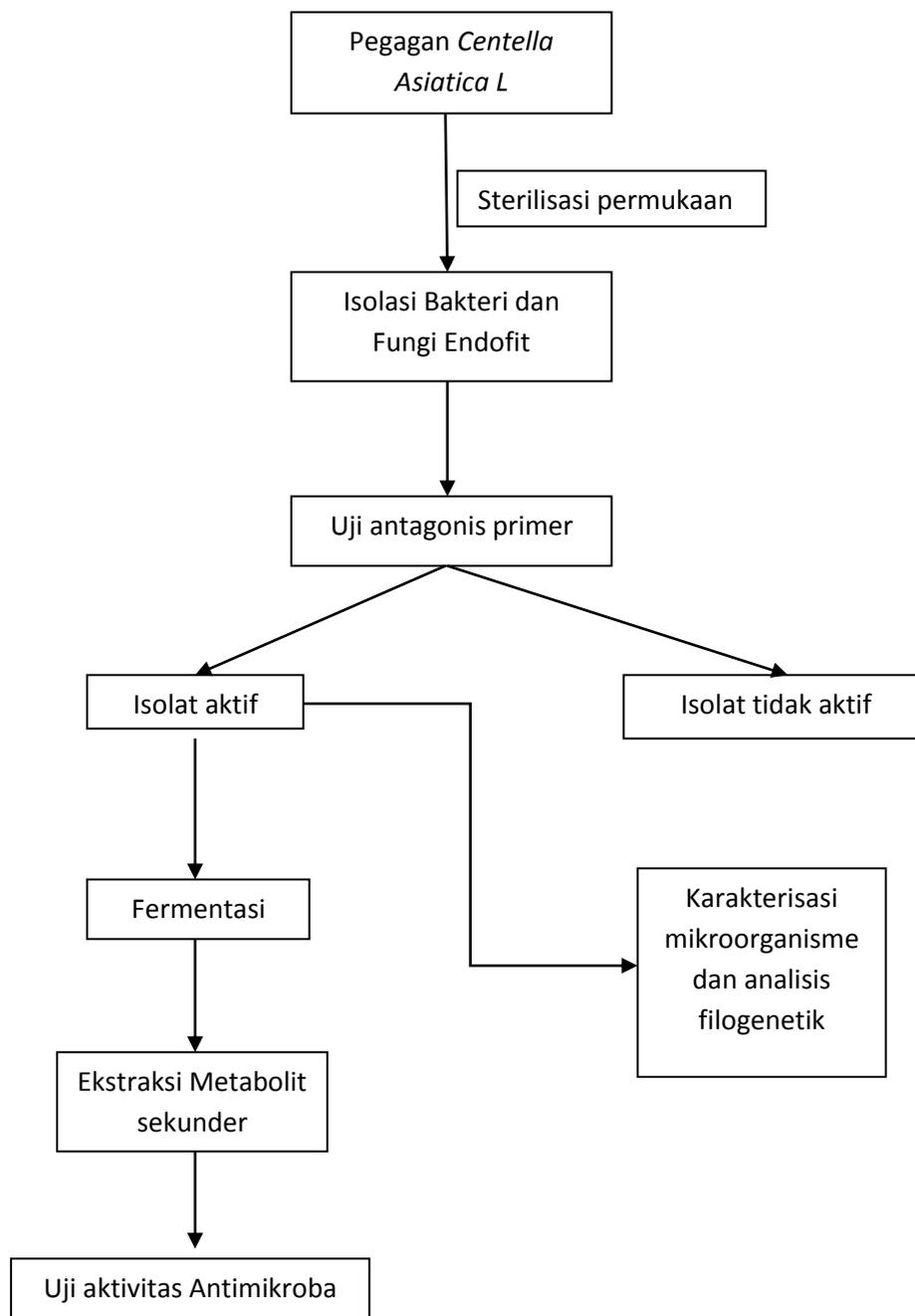
Catharanthus roseus and *Centella asiatica*. *International Journal of Research (IJR)*. Volume 2, Issue 08

- Gochnauer., 1973. Growth., Protease Formation, and Sporulation of *Bacillus Larvae* In Aerated Broth Culture. *Journal Of Invertebrate Pathology* 22, 251-257
- Jahan., Sophia Hossain., Syeda Seraj., Dilruba Nasrin., Zubaida Khatun., Protiva Rani Das., Tabibul Islam., Ishtiaq Ahmed., Mohammed Rahmatullah., 2012. *Centella asiatica* L. herb : Ethnomedical Uses And Their Scientific Validations. *American Eurasian Journal Of Sustainable Agriculture*, 6 (4) 261- 270
- Jasim., Aswathy Agnes Joseph., Jimtha John., Jyothis Mathew., & Radhakrishnan. 2014. Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria From The Rhizome of *Zingiber officinale*. *Biotech* 4:197–204
- Jill & Claridge. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Disease. *Clinical microbiology Reviews*, p. 840–862
- Ilkay, 2012. *Centella asiatica* (L) Urban : From Traditional Medicine To Modern Medicine With Neuroprotective Potential. *Evidence Based Complementary And Alternative Medicine*.
- Mihaescu R., Levy D., Pachter L. 2009. Why Neighbor-Joining Works. *Algorithmica* Vol 54, issue 1, pp 1-24.
- Nair & Padmavathy. 2014. Impact Of Endophytic Microorganism On Plants, Environment And Humans. Hindawi publishing corporation, the scientific world journal.
- Nofiani & Risa. 2008. Urgensi dan Mekanisme Biosintesis Metabolit Sekunder Mikroba Laut. *Jurnal Natur Indonesia*. 10(2) 120-125
- Photita, W., Taylor., P.W.J., Ford, R., Hyde, K.D. and Lumyong, S. (2005). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity* 18: 117-133.
- Prabakaran., Nameirakpam Nirjanta Devi., & W. Femina. 2012. Antibiogram pattern of endophytic fungi isolated from medical plant *Centella asiatica*. *Journal of pharmacy research* 5 205-207
- Qadri., Sarojini Johri., Bhahwal., Anamika Khajuria., Tabasum Sidiq., Surrinder Lattoo., Malik Z Abdin & Syed Riyaz. 2013. Identification

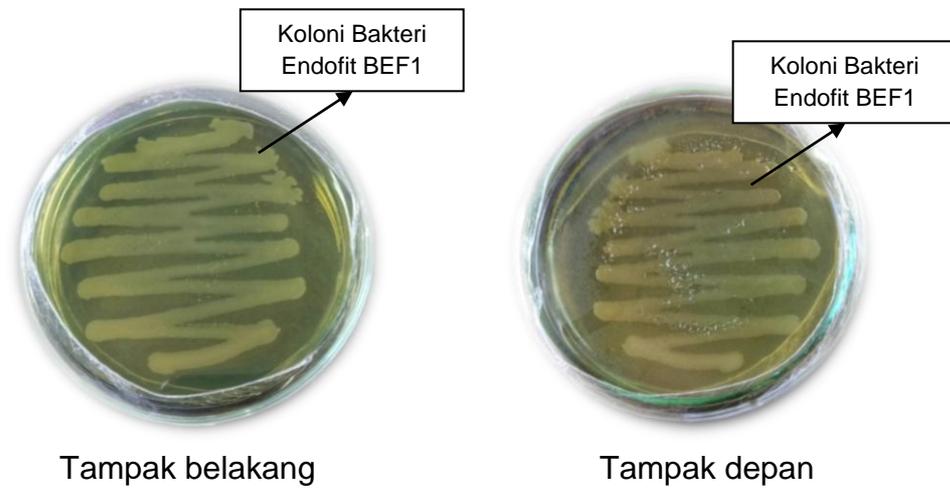
and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. *Springer Plus*,2:8

- Rafat., Philip., Muniandy. 2012. A Novel Source of Bioactive Compounds : Endophytic Bacteria Isolated From *Centella asiatica*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. Vol 6.
- Rahman., Salah Uddin., Razia Sultana., Arumina Moue., & Muntahina Setu. 2013. Polymerase Chain Reaction (PCR) : a Short review. *AKMMC J (4)*1 30-36
- Ramos., Silva., Correia., Araujo., Coelho. 2016. Endophytic microorganisms from bauhinia monandra leaves : isolation, antimicrobial activities and interaction with galactose-specific lectin BmmolL. *African journal of microbiological research*, vol 10(17) 600-607
- Rante, H., Taebe, B., Intan, S. 2013. Isolasi Fungi Endofit penghasil Senyawa Antimikroba dari daun Cabai Katokkon (*Capsicum annum* L. var. *chinensis*) dan Profil KLT Bioautografi. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, Vol. 17, No. 2 hlm 39-46 (ISSN 1410-7031). Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin; Makassar.
- Senthilmurugan, VG., Sekar, R., Kuru, S., Balamurugan, S., 2013. Phytochemical screening, enzyme and antibacterial activity analysis of endophytic fungi *Botrytis* sp. isolated from *Ficus benghalensis* (L.). *Int J Pharm Res Biol Sci*. 2(4): 264-273
- Shamir, 2001. Phylogenetics and Phylogenetic Trees. *Algorithms for Molecular Biology*.
- Sharma M., Kulshrestha, S., 2015. *Colletotrichum gloeosporioides*: An anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables. *Biosci Biotechnol Res Asia* 2015;12
- Srikandace, Y., Hapsari, Y., & Simanjuntak, P. 2007. Selection of endophytic microbes of *Curcuma zedoaria* in producing antimicrobial compounds. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 5(2), 77-84
- Strobel., Daisy B., Castillo, U., & Harper J.. 2004. natural Products From Endophytic Microorganisms. *Journal of natural products* vol 67 no 2 257-268
- Strobel & daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophyte and their natural products. *Microbiology and molecular biology review*. 491-502

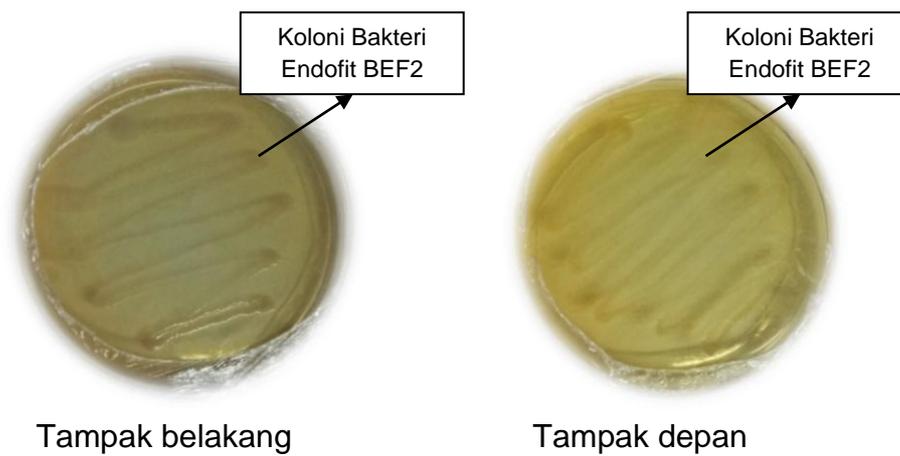
- Taemchuay., Theera Rukkwamsuk., Thavajchai Sakpuaram & Nongluck Ruangwises . 2009. Antibacterial Activity Of Crude Extract Of *Centell Asiatica* Against *Staphylococcus Aureus* In Bovine Mastitis. *Kasetsart veterinarians* vol 19 No 3 119-128
- Woodrow & Holst, 1942. The mechanism of colony resistance to American foulbrood. *J. Econ. Entomol.* 35, 327-330.
- Yu, Zhang L., Li L., Zheng C., Guo L., Li W., Sun P., & Qin L.. 2010. Recent Development And Future Prospect Of Antimicrobial Metabolites Produced By Endophytes. *Microbiological research*. 437-449
- Zheng, Jie. 2017. Discovery of Naturally-occurring broad-spectrum cyclic antibiotics from *Paenibacillus alvei*, *J Med Microb Design*. doi 10.4172/2161-0703-C1-014

SKEMA KERJA**Alur Penelitian Isolasi dan Karakterisasi Molekuler Mikroba Endofit
Tanaman Pegagan Sebagai Penghasil Antimikroba**

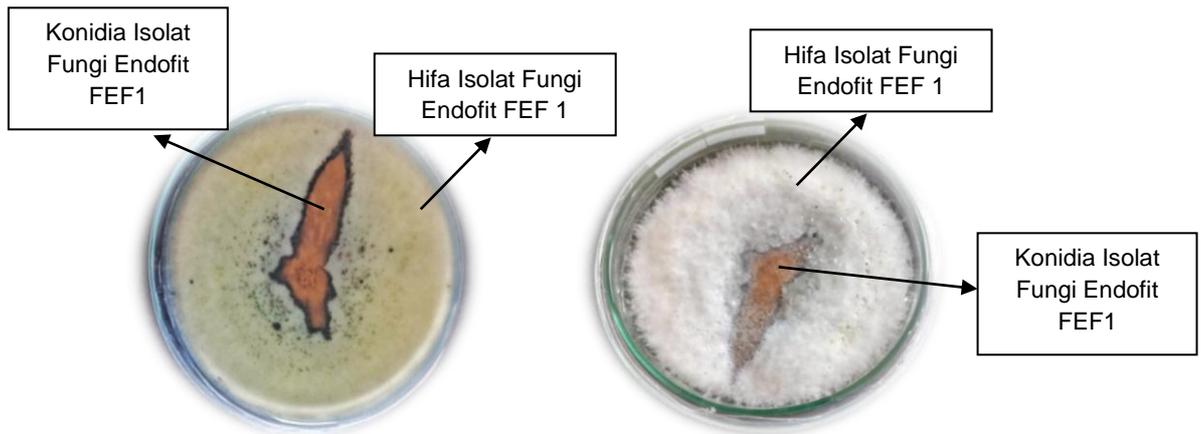
Lampiran 1. Gambar isolat mikroba endofit tanaman pegagan



Gambar 11. Isolat bakteri endofit BEF1 tanaman pegagan



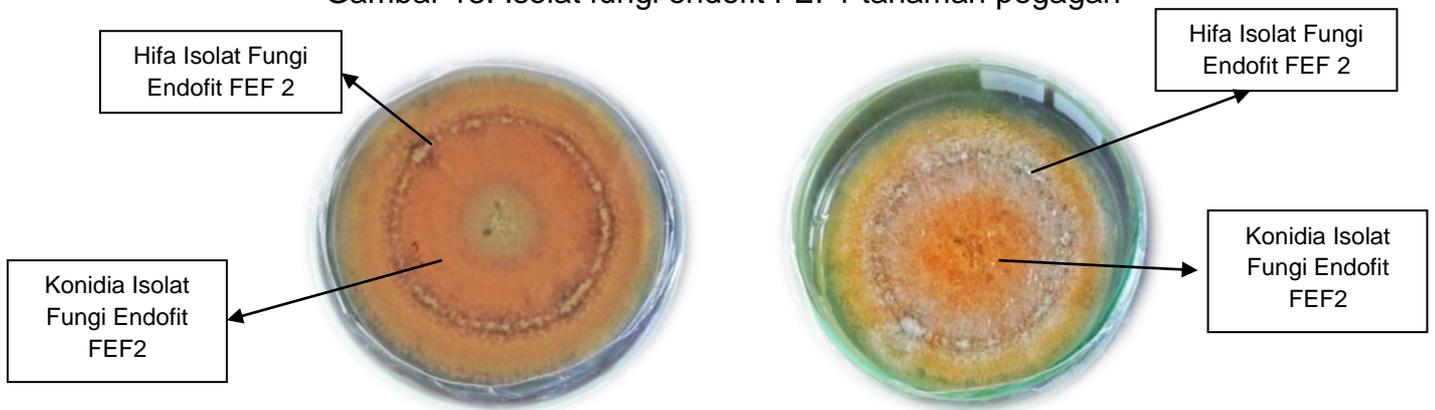
Gambar 12. Isolat bakteri endofit BEF2 tanaman pegagan



Tampak belakang

Tampak depan

Gambar 13. Isolat fungi endofit FEF1 tanaman pegagan



Tampak belakang

Tampak depan

Gambar 14. Isolat fungi endofit FEF2 tanaman pegagan



Tampak belakang

Tampak depan

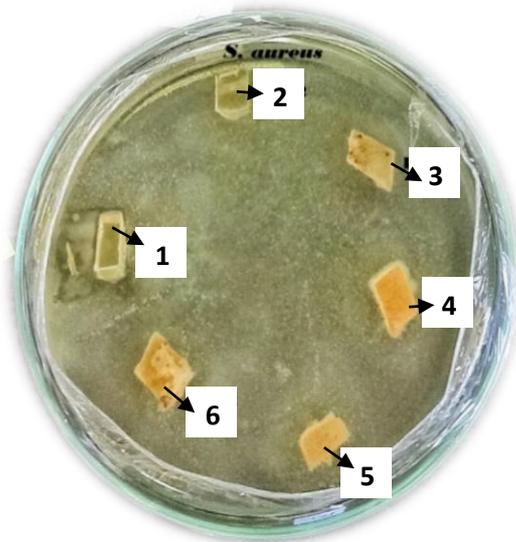
Gambar 15. Isolat fungi endofit FEF3 tanaman pegagan



Gambar 16. Isolat fungi endofit FEF4 tanaman pegagan

Lampiran 2. Gambar Uji Antagonis Isolat Mikroba Endofit Tanaman Pegagan

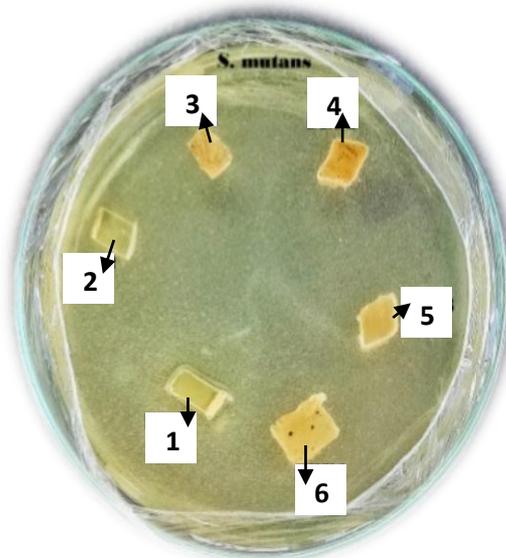
A. Gambar Uji Antagonis Isolat Mikroba Endofit Tanaman Pegagan Terhadap *Staphylococcus aureus*



Keterangan :

1. Isolat bakteri BEF1 terhadap *Staphylococcus aureus*
2. Isolat bakteri BEF2 terhadap *Staphylococcus aureus*
3. Isolat bakteri FEF1 terhadap *Staphylococcus aureus*
4. Isolat bakteri FEF2 terhadap *Staphylococcus aureus*
5. Isolat bakteri FEF3 terhadap *Staphylococcus aureus*
6. Isolat bakteri FEF4 terhadap *Staphylococcus aureus*

B. Gambar Uji Antagonis Isolat Mikroba Endofit Tanaman Pegagan Terhadap *Streptococcus mutans*

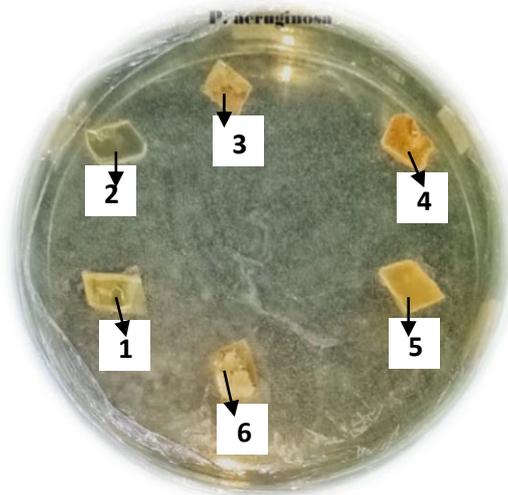


Keterangan :

1. Isolat bakteri BEF1 terhadap *Streptococcus mutans*
2. Isolat bakteri BEF2 terhadap *Streptococcus mutans*
3. Isolat bakteri FEF1 terhadap *Streptococcus mutans*
4. Isolat bakteri FEF2 terhadap *Streptococcus mutans*
5. Isolat bakteri FEF3 terhadap *Streptococcus mutans*
6. Isolat bakteri FEF4 terhadap *Streptococcus mutans*

C. Gambar Uji Antagonis Isolat Mikroba Endofit Tanaman Pegagan Terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

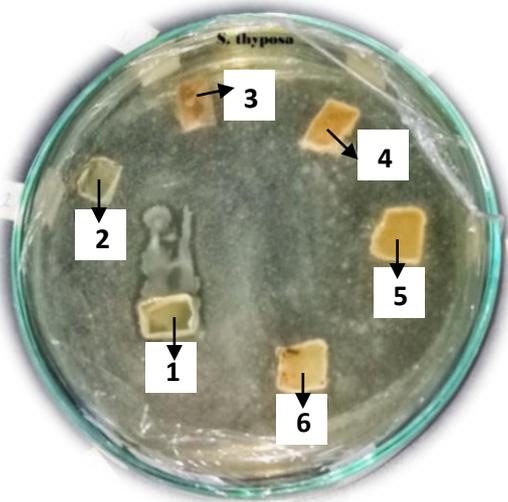
Keterangan :



1. Isolat bakteri BEF1 terhadap *Pseudomonas aeruginosa*
2. Isolat bakteri BEF2 terhadap *Pseudomonas aeruginosa*
3. Isolat bakteri FEF1 terhadap *Pseudomonas aeruginosa*
4. Isolat bakteri FEF2 terhadap *Pseudomonas aeruginosa*
5. Isolat bakteri FEF3 terhadap *Pseudomonas aeruginosa*
6. Isolat bakteri FEF4 terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

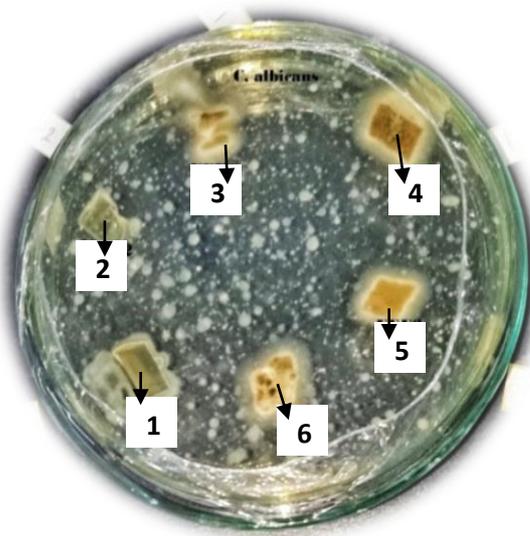
D. Gambar Uji Antagonis Isolat Mikroba Endofit Tanaman Pegagan Terhadap *Salmonella thyposa*

Keterangan :



1. Isolat bakteri BEF1 terhadap *Salmonella thyposa*
2. Isolat bakteri BEF2 terhadap *Salmonella thyposa*
3. Isolat bakteri FEF1 terhadap *Salmonella thyposa*
4. Isolat bakteri FEF2 terhadap *Salmonella thyposa*
5. Isolat bakteri FEF3 terhadap *Salmonella thyposa*
6. Isolat bakteri FEF4 terhadap *Salmonella thyposa*

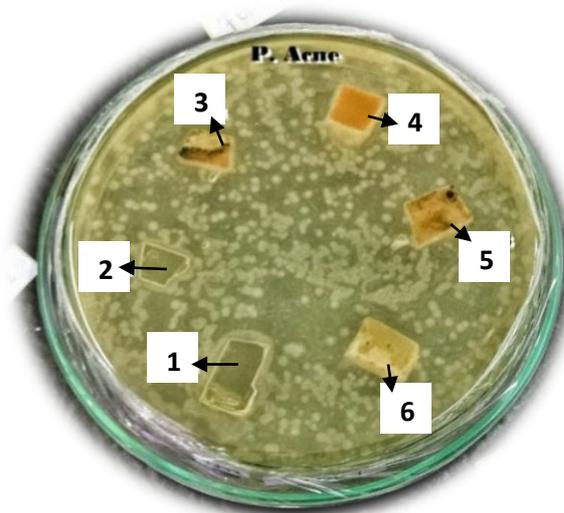
E. Gambar Uji Antagonis Isolat Mikroba Endofit Tanaman Pegagan Terhadap *Candida albicans*



Keterangan :

1. Isolat bakteri BEF1 terhadap *Candida albicans*
2. Isolat bakteri BEF2 terhadap *Candida albicans*
3. Isolat bakteri FEF1 terhadap *Candida albicans*
4. Isolat bakteri FEF2 terhadap *Candida albicans*
5. Isolat bakteri FEF3 terhadap *Candida albicans*
6. Isolat bakteri FEF4 terhadap *Candida albicans*

F. Gambar Uji Antagonis Isolat Mikroba Endofit Tanaman Pegagan Terhadap *Propionibacterium acnes*



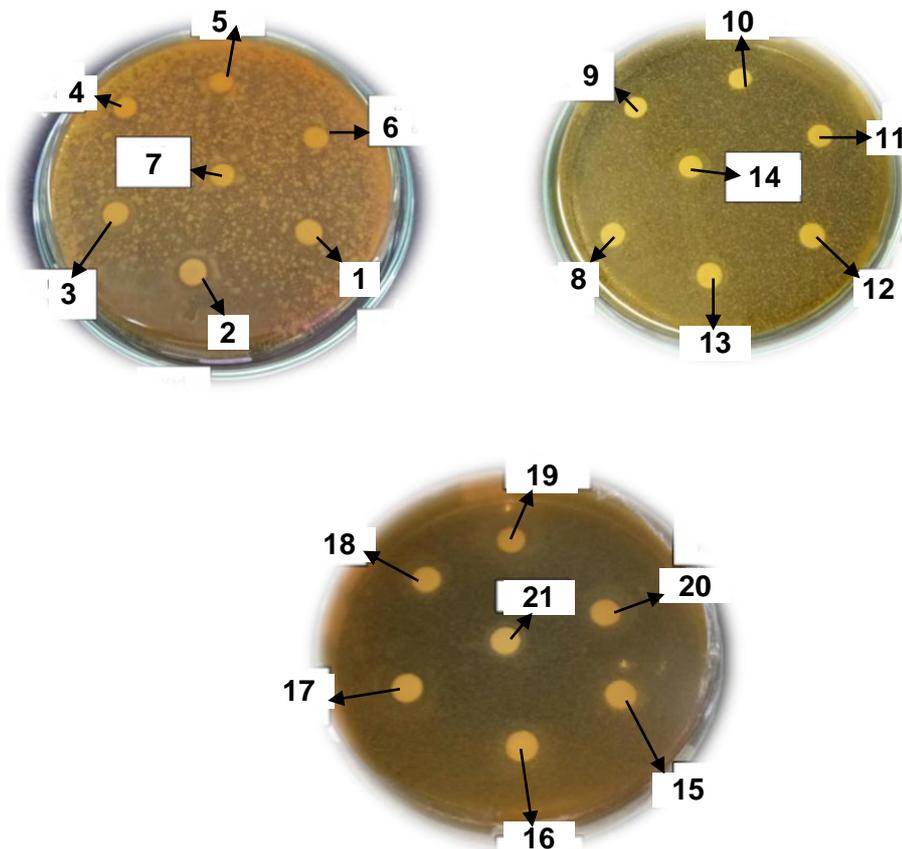
Keterangan :

1. Isolat bakteri BEF1 terhadap *Propionibacterium acnes*
2. Isolat bakteri BEF2 terhadap *Propionibacterium acnes*
3. Isolat bakteri FEF1 terhadap *Propionibacterium acnes*
4. Isolat bakteri FEF2 terhadap *Propionibacterium acnes*
5. Isolat bakteri FEF3 terhadap *Propionibacterium acnes*
6. Isolat bakteri FEF4 terhadap *Propionibacterium acnes*

Lampiran 3. Uji aktivitas antimikroba cairan hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1

Hari fermentasi	Diameter hambatan terhadap mikroba patogen (mm)		
	<i>P.acne</i>	<i>S.thyposa</i>	<i>C.albican</i>
1	6.3	8.9	0
2	8.6	13.7	0
4	7.6	9.6	0
5	6.2	7.1	0
6	6.1	7.3	0
7	6.1	6.9	0
8	6.8	7.4	0
9	5.8	5.7	0
10	5.5	5.5	0
11	5.7	5.6	0
12	5.7	5.9	0
13	5.9	5.4	0
14	5.6	5.3	0
15	5.5	5.5	0
16	5.7	16.3	0
17	9.3	5.7	0
18	5.6	10.4	0
20	5.4	6.3	0
21	5.5	5.4	0

Lampiran 4. Gambar uji aktivitas antimikroba cairan hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 terhadap *Propionibacterium acnes*

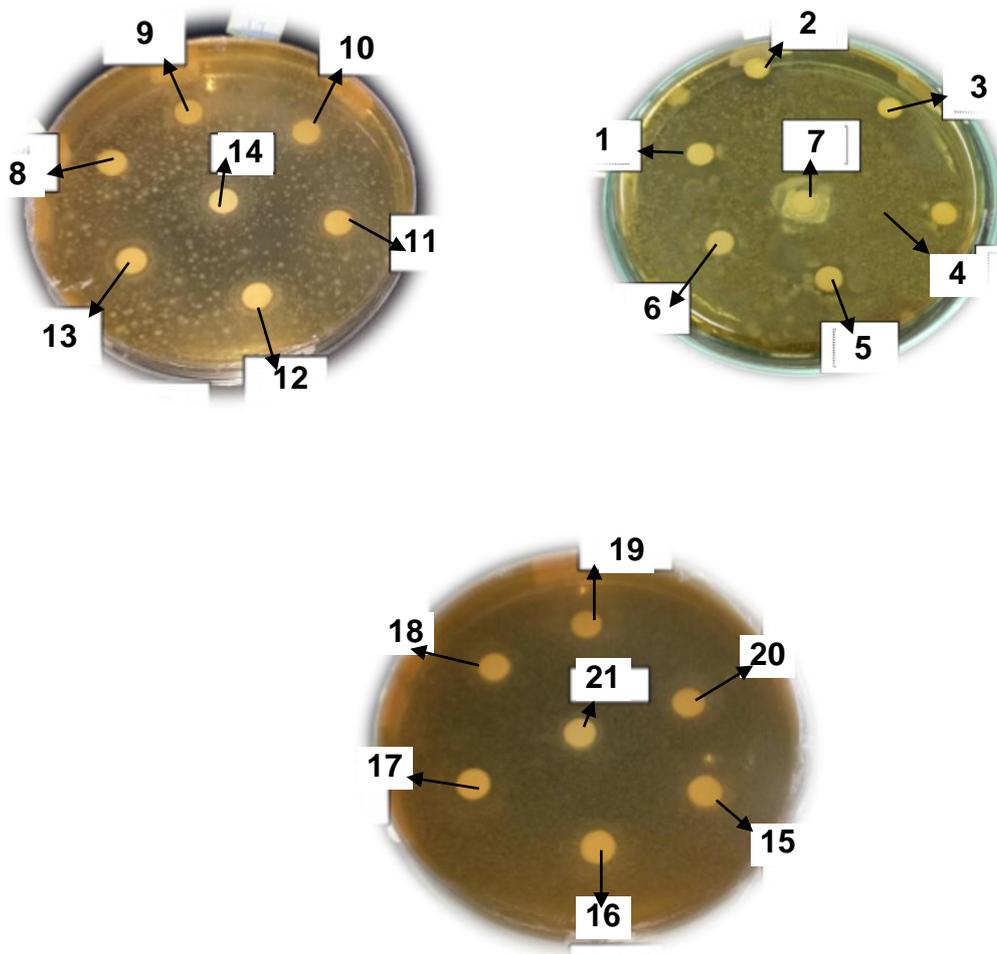


Keterangan :

1. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 1 terhadap *Propionibacterium acnes*
2. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 2 terhadap *Propionibacterium acnes*
3. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 3 terhadap *Propionibacterium acnes*
4. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 4 terhadap *Propionibacterium acnes*
5. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 5 terhadap *Propionibacterium acnes*
6. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 6 terhadap *Propionibacterium acnes*
7. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 7 terhadap *Propionibacterium acnes*

8. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 8 terhadap *Propionibacterium acnes*
9. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 9 terhadap *Propionibacterium acnes*
10. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 10 terhadap *Propionibacterium acnes*
11. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 11 terhadap *Propionibacterium acnes*
12. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 12 terhadap *Propionibacterium acnes*
13. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 13 terhadap *Propionibacterium acnes*
14. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 14 terhadap *Propionibacterium acnes*
15. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 15 terhadap *Propionibacterium acnes*
16. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 16 terhadap *Propionibacterium acnes*
17. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 17 terhadap *Propionibacterium acnes*
18. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 18 terhadap *Propionibacterium acnes*
19. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 19 terhadap *Propionibacterium acnes*
20. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 20 terhadap *Propionibacterium acnes*
21. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 21 terhadap *Propionibacterium acnes*

Lampiran 5. Gambar uji aktivitas antimikroba cairan hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 terhadap *Salmonella thyposa*

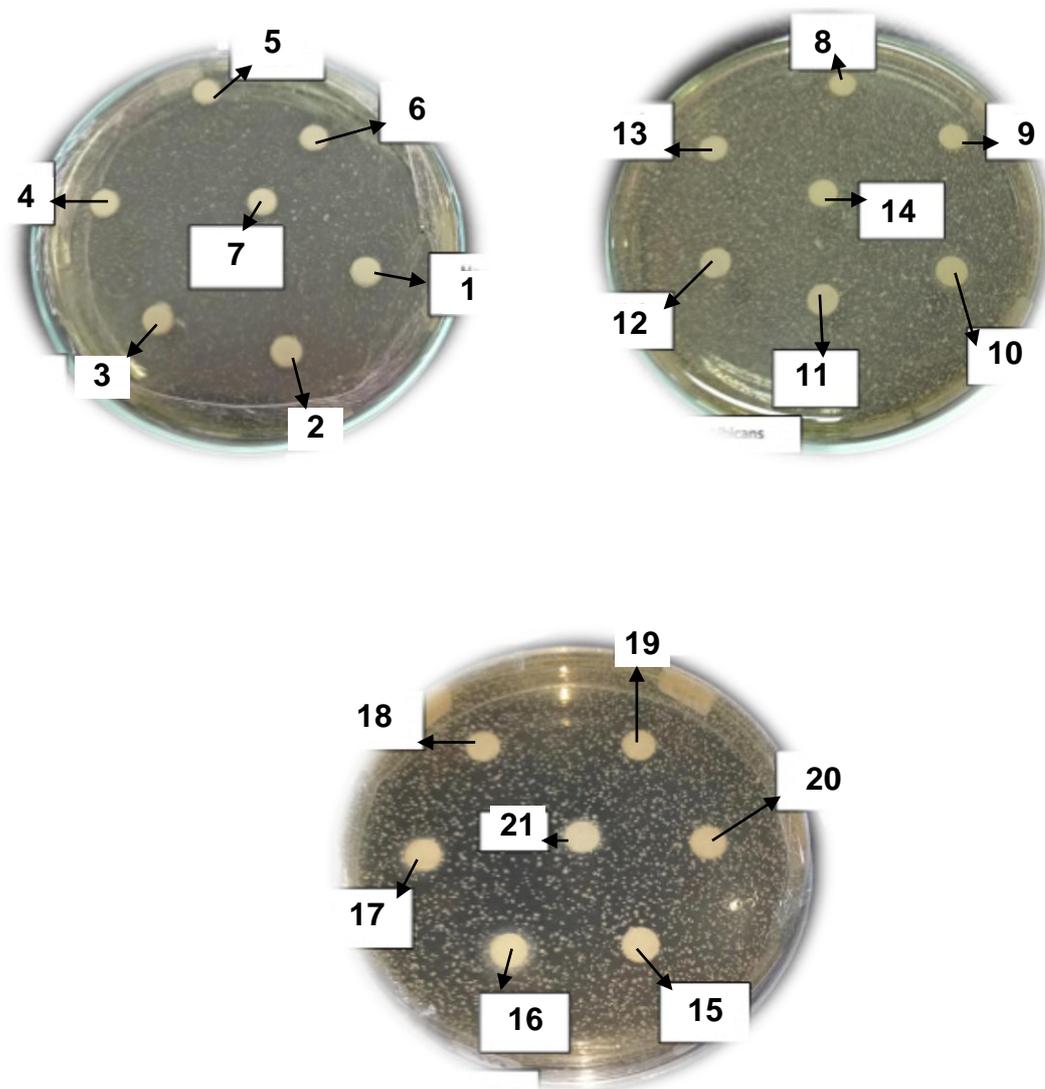


Keterangan :

1. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 1 terhadap *Salmonella thyposa*
2. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 2 terhadap *Salmonella thyposa*
3. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 3 terhadap *Salmonella thyposa*
4. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 4 terhadap *Salmonella thyposa*
5. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 5 terhadap *Salmonella thyposa*

6. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 6 terhadap *Salmonella thyposa*
7. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 7 terhadap *Salmonella thyposa*
8. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 8 terhadap *Salmonella thyposa*
9. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 9 terhadap *Salmonella thyposa*
10. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 10 terhadap *Salmonella thyposa*
11. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 11 terhadap *Salmonella thyposa*
12. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 12 terhadap *Salmonella thyposa*
13. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 13 terhadap *Salmonella thyposa*
14. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 14 terhadap *Salmonella thyposa*
15. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 15 terhadap *Salmonella thyposa*
16. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 16 terhadap *Salmonella thyposa*
17. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 17 terhadap *Salmonella thyposa*
18. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 18 terhadap *Salmonella thyposa*
19. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 19 terhadap *Salmonella thyposa*
20. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 20 terhadap *Salmonella thyposa*
21. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 21 terhadap *Salmonella thyposa*

Lampiran 5. Gambar uji aktivitas antimikroba cairan hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 terhadap *Candida albicans*



Keterangan :

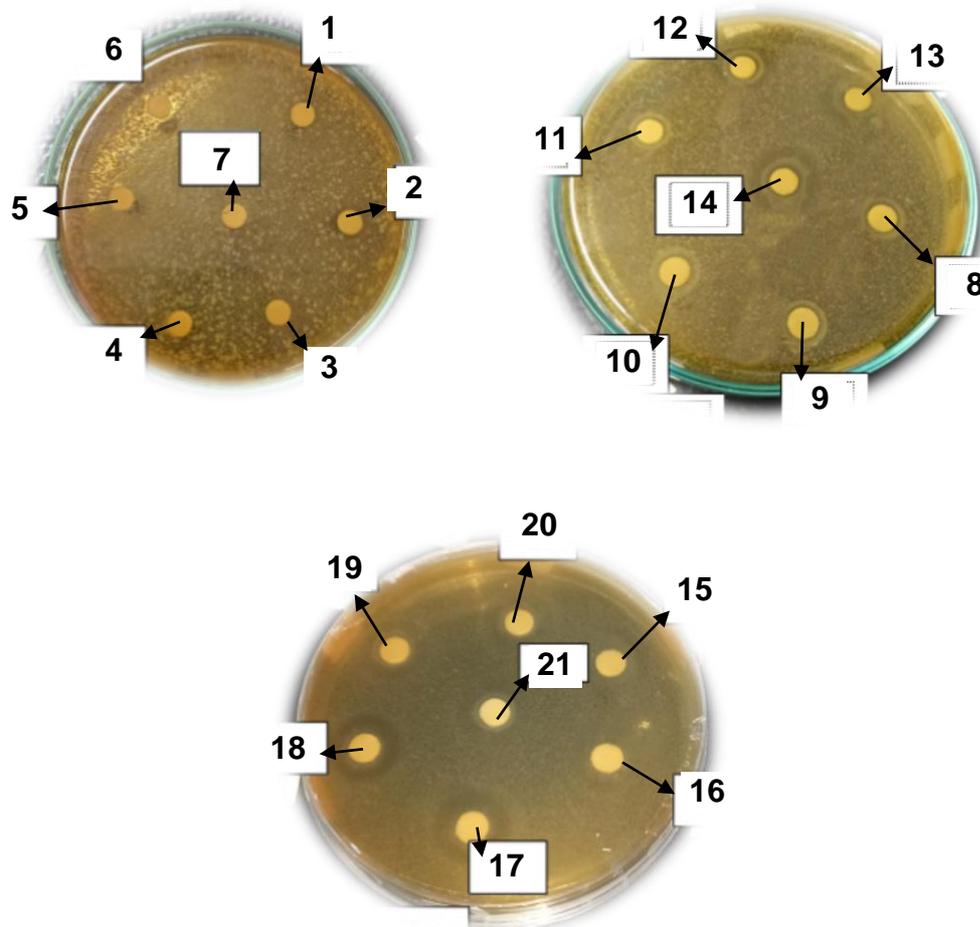
1. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 1 terhadap *Candida albicans*
2. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 2 terhadap *Candida albicans*
3. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 3 terhadap *Candida albicans*
4. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 4 terhadap *Candida albicans*

5. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 5 terhadap *Candida albicans*
6. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 6 terhadap *Candida albicans*
7. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 7 terhadap *Candida albicans*
8. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 8 terhadap *Candida albicans*
9. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 9 terhadap *Candida albicans*
10. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 10 terhadap *Candida albicans*
11. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 11 terhadap *Candida albicans*
12. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 12 terhadap *Candida albicans*
13. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 13 terhadap *Candida albicans*
14. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 14 terhadap *Candida albicans*
15. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 15 terhadap *Candida albicans*
16. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 16 terhadap *Candida albicans*
17. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 17 terhadap *Candida albicans*
18. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 18 terhadap *Candida albicans*
19. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 19 terhadap *Candida albicans*
20. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 20 terhadap *Candida albicans*
21. Hasil fermentasi isolat bakteri endofit BEF1 hari ke 21 terhadap *Candida albicans*

Lampiran 6. Hasil uji aktivitas antimikroba cairan hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2

Hari fermentasi	Diameter hambatan terhadap mikroba patogen (mm)		
	<i>P. acne</i>	<i>S. thyposa</i>	<i>C. albican</i>
1	6.6	7.4	0
2	6.5	7.8	0
3	6.9	8	0
4	6.8	7.5	0
5	8.9	8.1	0
6	6.9	9.5	0
7	6.7	12.3	0
8	7.6	13.4	0
9	7.3	10.4	0
10	7.5	11.3	0
11	8	11.6	0
12	7.9	22.7	0
13	8.1	20.6	0
14	9.7	20.9	0
15	5.3	9.7	0
16	5.7	9.3	0
17	6.3	8.8	0
18	5.6	9.1	0
19	5.7	9.2	0
20	5.5	9	0
21	5.5	8.9	0

Lampiran 7. Gambar uji aktivitas antimikroba cairan hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 terhadap *Propionibacterium acnes*

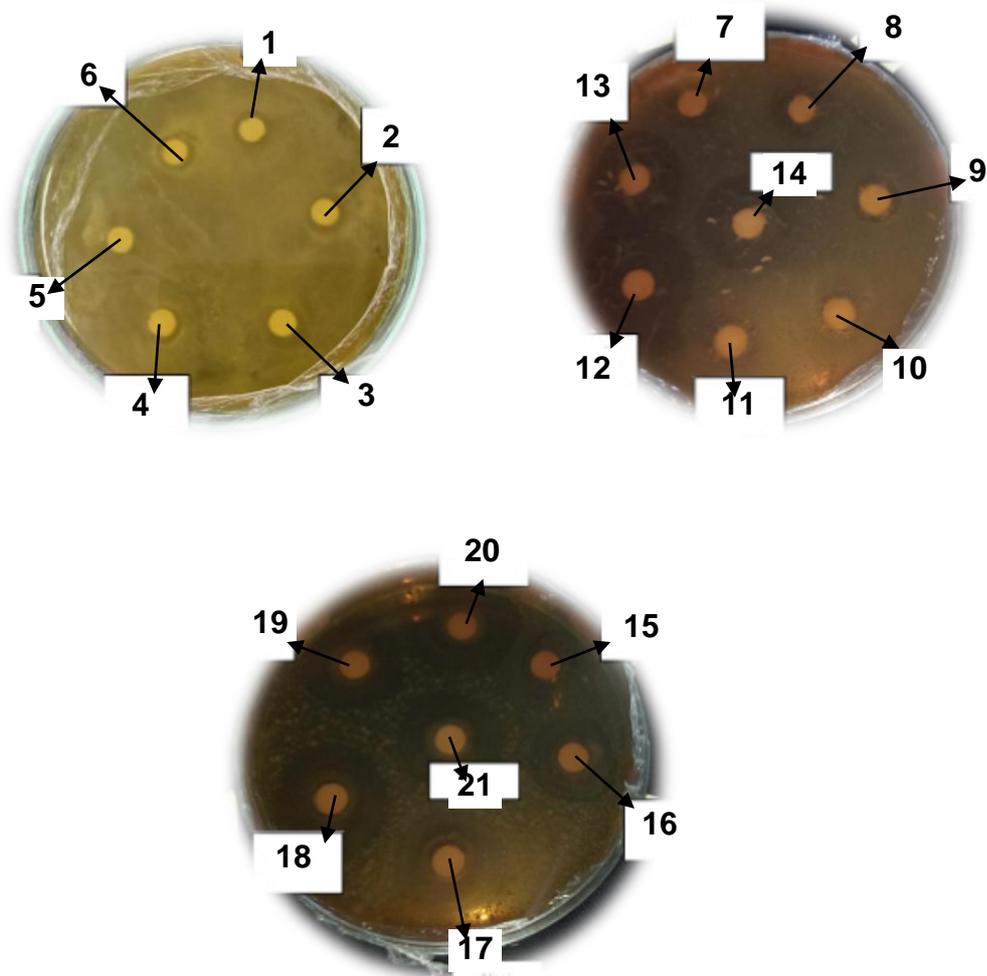


Keterangan :

1. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 1 terhadap *Propionibacterium acnes*
2. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 2 terhadap *Propionibacterium acnes*
3. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 3 terhadap *Propionibacterium acnes*
4. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 4 terhadap *Propionibacterium acnes*
5. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 5 terhadap *Propionibacterium acnes*
6. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 6 terhadap *Propionibacterium acnes*

7. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 7 terhadap *Propionibacterium acnes*
8. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 8 terhadap *Propionibacterium acnes*
9. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 9 terhadap *Propionibacterium acnes*
10. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 10 terhadap *Propionibacterium acnes*
11. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 11 terhadap *Propionibacterium acnes*
12. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 12 terhadap *Propionibacterium acnes*
13. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 13 terhadap *Propionibacterium acnes*
14. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 14 terhadap *Propionibacterium acnes*
15. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 15 terhadap *Propionibacterium acnes*
16. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 16 terhadap *Propionibacterium acnes*
17. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 17 terhadap *Propionibacterium acnes*
18. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 18 terhadap *Propionibacterium acnes*
19. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 19 terhadap *Propionibacterium acnes*
20. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 20 terhadap *Propionibacterium acnes*
21. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 21 terhadap *Propionibacterium acnes*

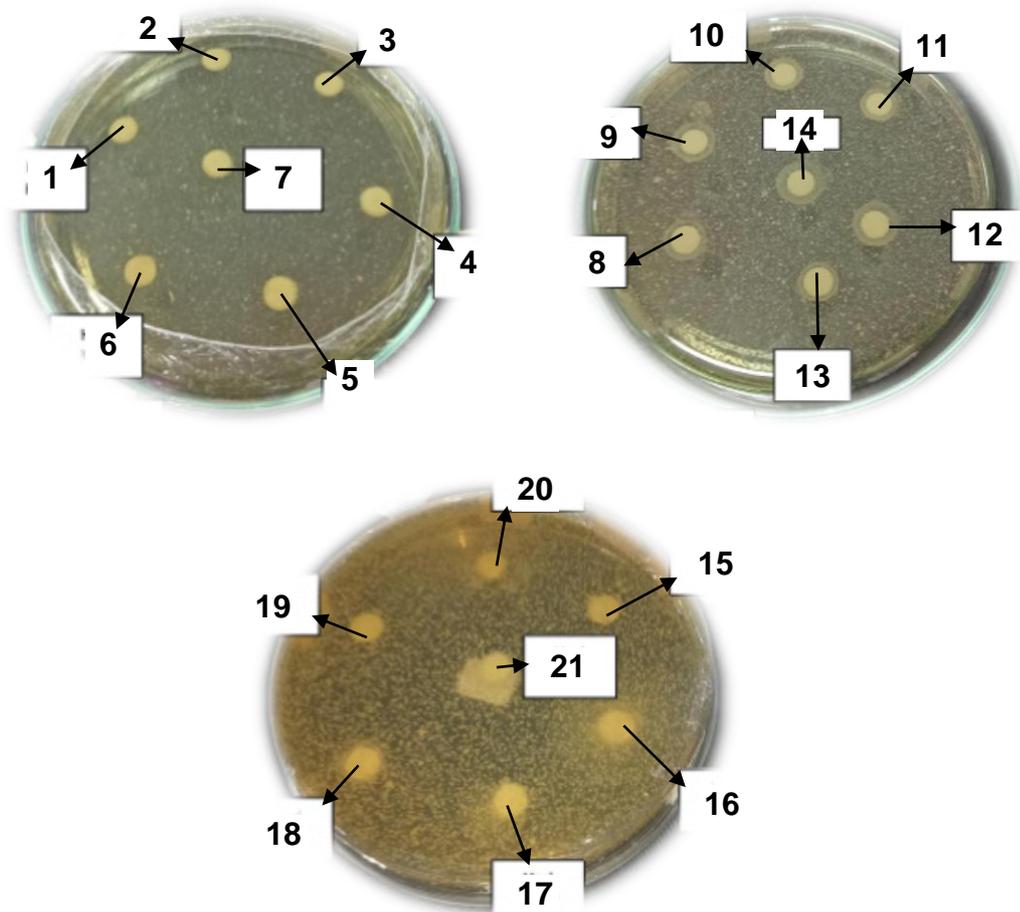
Lampiran 8. Gambar uji aktivitas antimikroba cairan hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 terhadap *Salmonella thyposa*



Keterangan :

1. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 1 terhadap *Salmonella thyposa*
2. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 2 terhadap *Salmonella thyposa*
3. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 3 terhadap *Salmonella thyposa*
4. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 4 terhadap *Salmonella thyposa*
5. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 5 terhadap *Salmonella thyposa*

6. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 6 terhadap *Salmonella thyposa*
7. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 7 terhadap *Salmonella thyposa*
8. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 8 terhadap *Salmonella thyposa*
9. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 9 terhadap *Salmonella thyposa*
10. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 10 terhadap *Salmonella thyposa*
11. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 11 terhadap *Salmonella thyposa*
12. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 12 terhadap *Salmonella thyposa*
13. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 13 terhadap *Salmonella thyposa*
14. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 14 terhadap *Salmonella thyposa*
15. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 15 terhadap *Salmonella thyposa*
16. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 16 terhadap *Salmonella thyposa*
17. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 17 terhadap *Salmonella thyposa*
18. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 18 terhadap *Salmonella thyposa*
19. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 19 terhadap *Salmonella thyposa*
20. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 20 terhadap *Salmonella thyposa*
21. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 21 terhadap *Salmonella thyposa*



Keterangan :

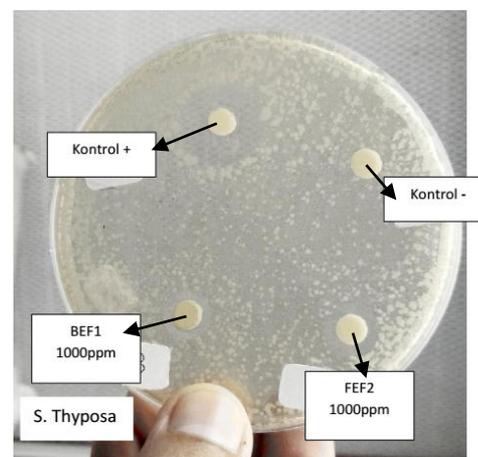
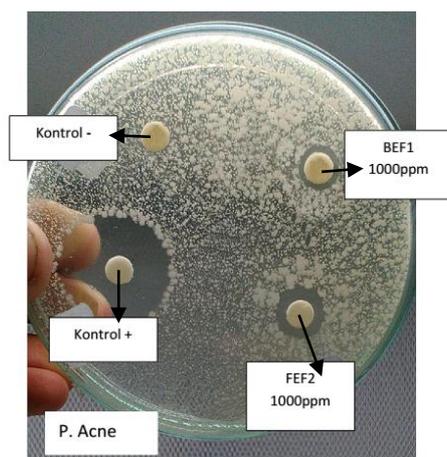
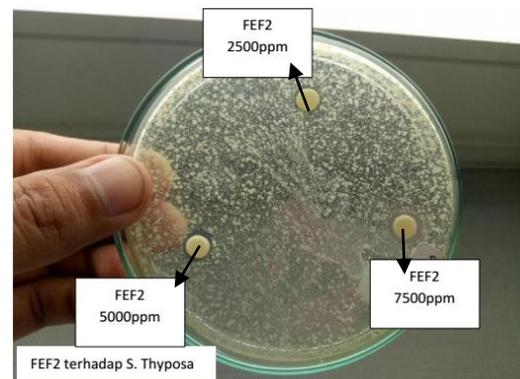
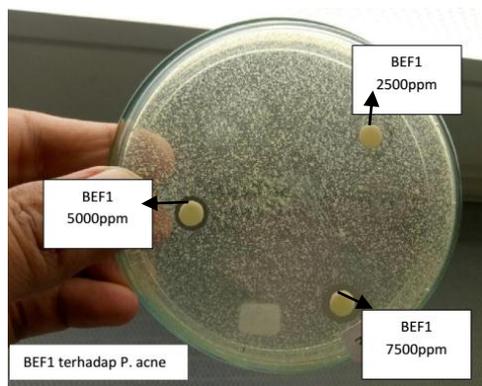
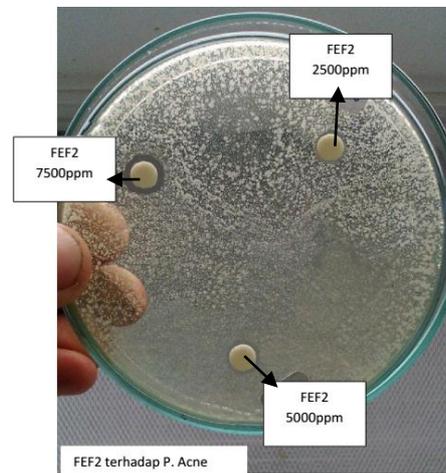
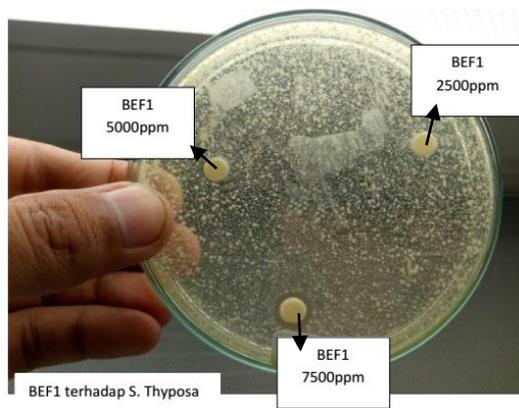
1. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 1 terhadap *Candida albicans*
2. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 2 terhadap *Candida albicans*
3. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 3 terhadap *Candida albicans*
4. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 4 terhadap *Candida albicans*
5. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 5 terhadap *Candida albicans*
6. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 6 terhadap *Candida albicans*
7. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 7 terhadap *Candida albicans*

8. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 8 terhadap *Candida albicans*
9. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 9 terhadap *Candida albicans*
10. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 10 terhadap *Candida albicans*
11. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 11 terhadap *Candida albicans*
12. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 12 terhadap *Candida albicans*
13. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 13 terhadap *Candida albicans*
14. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 14 terhadap *Candida albicans*
15. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 15 terhadap *Candida albicans*
16. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 16 terhadap *Candida albicans*
17. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 17 terhadap *Candida albicans*
18. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 18 terhadap *Candida albicans*
19. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 19 terhadap *Candida albicans*
20. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 20 terhadap *Candida albicans*
21. Hasil fermentasi isolat fungi endofit FEF2 hari ke 21 terhadap *Candida albicans*

Lampiran 10. Hasil pengukuran bobot sel kering miselia isolat fungi endofit FEF2

Hari	Bobot kertas saring kosong (gram)	Bobot kertas saring + isolat (gram)	Bobot sel kering miselia (gram)
1	0.507	0.516	0.009
2	0.495	0.565	0.07
3	0.463	0.551	0.088
4	0.487	0.579	0.092
5	0.471	0.565	0.094
6	0.46	0.556	0.096
7	0.524	0.623	0.099
8	0.489	0.589	0.1
9	0.489	0.597	0.108
10	0.57	0.678	0.108
11	0.487	0.603	0.116
12	0.485	0.604	0.119
13	0.453	0.573	0.12
14	0.45	0.585	0.135
15	0.463	0.605	0.142
16	0.505	0.65	0.145
17	0.447	0.599	0.152
18	0.485	0.67	0.185
19	0.467	0.69	0.223
20	0.471	0.698	0.227
21	0.511	0.732	0.221
22	0.493	0.718	0.225
23	0.478	0.701	0.223
24	0.457	0.676	0.219
25	0.501	0.721	0.22

Lampiran 11. Gambar Uji aktivitas ekstrak etil asetat isolat bakteri endofit BEF1 dan isolat fungi endofit FEF2



Lampiran 7. Determinasi tumbuhan

 **LABORATORIUM FARMAKOGNOSI**
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
KAMPUS UNHAS TAMALANREA, JL. PERINTIS KEMERDEKAAN KM 10
Telp. 0411-588566, 586200, 580216, Ext.1093, Fax. (0411)585188,
MAKASSAR 90245

DETERMINASI TUMBUHAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Muhammad Hidayat
Nim : P25000215014

Telah melakukan determinasi tumbuhan di laboratorium Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dengan berpedoman pada Buku Flora of Java (Backer, C. A., and van den Brink, R.C.B., 1963). Dengan hasil kunci determinasi sebagai berikut :

Suku : 148. Apiacea
1b..., 18b..., 19a..., 20b (2. Centella)

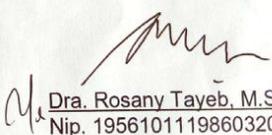
Marga : 2. Centella

Jenis : 1 (*Centella asiatica* (L.) Urb.)

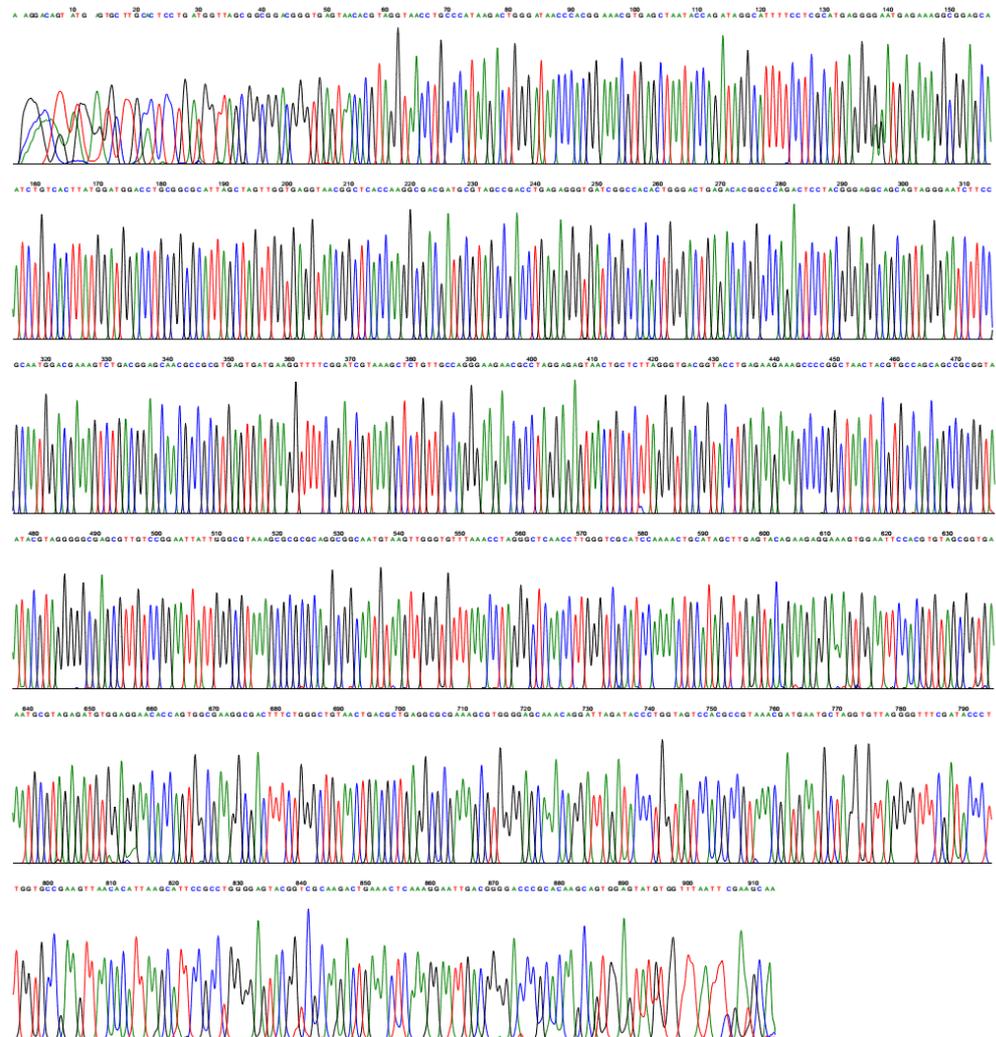
Berdasarkan hasil determinasi tersebut maka diperoleh kepastian bahwa tumbuhan yang dideterminasi dan digunakan dalam penelitian adalah ***Centella asiatica* (L.) Urb.**

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan.

an. Kepala Laboratorium
Farmakognosi
Fak. Farmasi UNHAS


Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt
Nip. 195610111986032002

Lampiran 8. Hasil sekuensing isolat bakteri endofit BEF1



Keterangan:

■ : Guanin

■ : Sitosin

■ : Timin

■ : Adenin

Lampiran 9. Hasil sekuensing isolat fungi endofit FEF2



Keterangan:

█ : Guanin

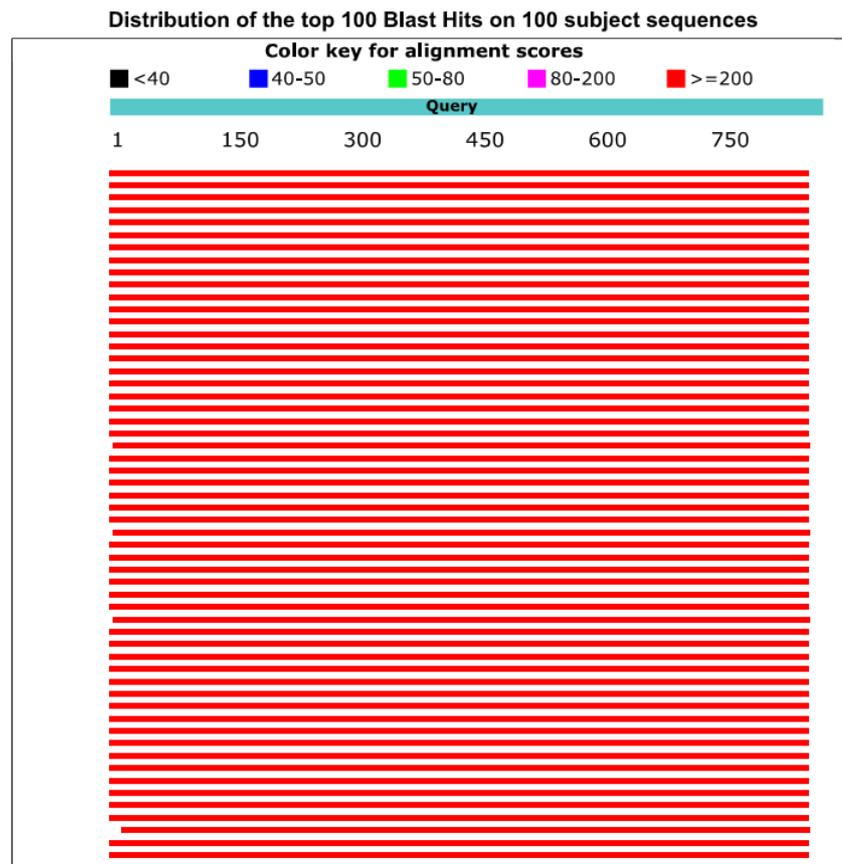
█ : Sitosin

█ : Timin

█ : Adenin

Lampiran 10. Hasil BLAST isolat bakteri endofit BEF1

RID [5SG9K1U4015](#) (Expires on 01-16 12:50 pm)
Query ID Id|Query_6051
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 848
Database Name nr
Description Nucleotide collection (nt)
Program BLASTN 2.7.1+

Graphic Summary

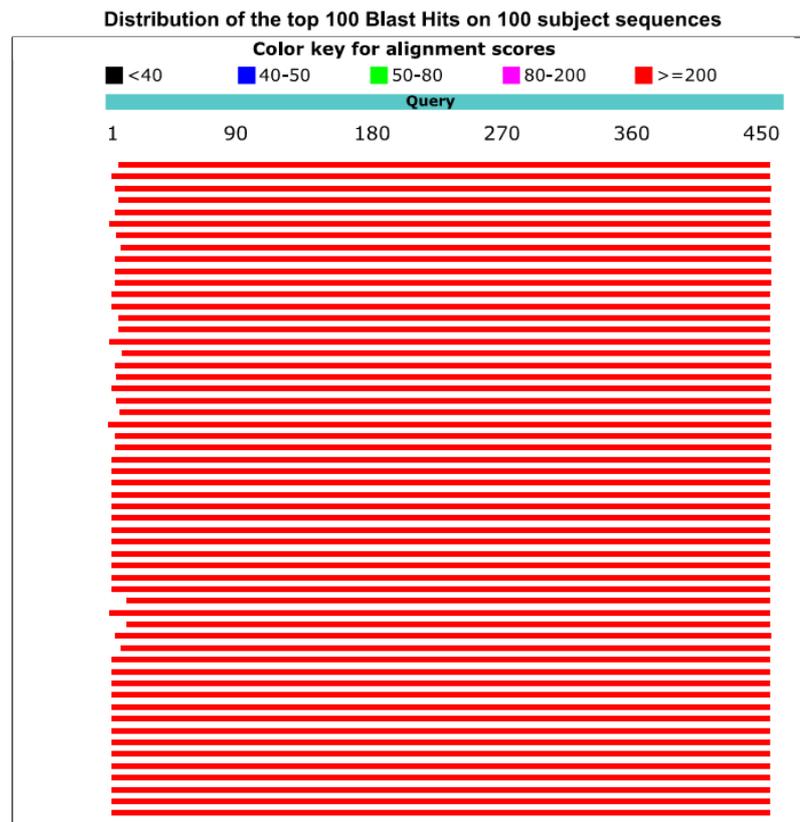
Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Paenibacillus alvei strain mv82 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1567	1567	100%	0.0	100%	MF187643.1
Paenibacillus alvei strain m420 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1567	1567	100%	0.0	100%	MF187642.1
Paenibacillus alvei strain m291a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1567	1567	100%	0.0	100%	MF187632.1
Paenibacillus alvei strain HPB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1567	1567	100%	0.0	100%	KY681448.1
Paenibacillus alvei strain Y2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1567	1567	100%	0.0	100%	KX266960.1
Paenibacillus sp. 4RB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1567	1567	100%	0.0	100%	KT150190.1
Paenibacillus alvei strain 3309O2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1567	1567	100%	0.0	100%	KF600394.1
Paenibacillus alvei strain 3297O2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1567	1567	100%	0.0	100%	KF600388.1
Paenibacillus sp. EE-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1567	1567	100%	0.0	100%	JF742969.1
Paenibacillus alvei strain Sp33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	1561	100%	0.0	99%	MG650050.1
Paenibacillus alvei strain Oa17A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	1561	100%	0.0	99%	MG461561.1
Paenibacillus alvei strain KN3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	1561	100%	0.0	99%	MG283305.1
Paenibacillus sp. strain BAB-6059 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	1561	100%	0.0	99%	KY672900.1
Paenibacillus alvei 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	1561	100%	0.0	99%	KT934806.1
Paenibacillus alvei strain 0215 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	1561	100%	0.0	99%	KP236340.1
Paenibacillus sp. 3281O2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	1561	100%	0.0	99%	KF600376.1
Paenibacillus alvei strain RMS01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	1561	100%	0.0	99%	JX437031.1
Paenibacillus alvei strain NBRC 3343 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	1561	100%	0.0	99%	NR_113577.1
Uncultured bacterium clone 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	1561	100%	0.0	99%	JF830167.1
Paenibacillus sp. ASCD2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	1561	100%	0.0	99%	HM452162.1
Paenibacillus alvei strain NP75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1561	1561	100%	0.0	99%	FJ151508.1
Paenibacillus alvei gene for 16S rRNA, partial sequence	1561	1561	100%	0.0	99%	AB073200.1
Paenibacillus sp. 3298O2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1559	1559	99%	0.0	100%	KF600389.1
Paenibacillus sp. PNS-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1559	1559	100%	0.0	99%	JF742757.1
Paenibacillus sp. PNS-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1557	1557	100%	0.0	99%	JF700524.1

Lampiran 11. Hasil BLAST isolat fungi endofit FEF2

RID [GR65HTVN014](#) (Expires on 05-29 13:50 pm)
Query ID Id|Query_73083
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 457
Database Name nr
Description Nucleotide collection (nt)
Program BLASTN 2.8.0+

Graphic Summary

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Colletotrichum gloeosporioides 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	828	828	98%	0.0	100%	GQ119342.1
Fungal endophyte strain I12F-00498 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	824	824	98%	0.0	99%	KR080830.1
Fungal endophyte strain I12F-01943 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	822	822	98%	0.0	99%	KR080855.1
Colletotrichum gloeosporioides strain GAL14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	822	822	98%	0.0	99%	KF358713.1
Colletotrichum gloeosporioides strain HT72 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	822	822	98%	0.0	99%	FJ455526.1
Colletotrichum gloeosporioides strain HT31 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	822	822	99%	0.0	99%	FJ455525.1
Colletotrichum gloeosporioides isolate CAUG19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	821	821	98%	0.0	99%	KP145432.1
Colletotrichum gloeosporioides clone h5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	819	819	97%	0.0	99%	HM016794.1
Colletotrichum gloeosporioides isolate Colletotrichum gloeosporioides A566 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence	817	817	98%	0.0	99%	KX463021.1

Lampiran 12. Pembuatan larutan stok dan pengenceran pada uji aktivitas larutan stok ekstrak etil asetat

Pembuatan konsentrasi 10.000 ppm = 10.000 mg/L

$$= 10.000 \text{ mg} / 1000 \text{ ml}$$

$$= 10 \text{ mg/ml}$$

Ditimbang 20 mg ekstrak etil asetat dan dilarutkan dalam 2 ml etil asetat.

Konsentrasi 7500 ppm : $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$

$$7500 \text{ ppm} \times 1 \text{ ml} = 10.000 \text{ ppm} \times V_2$$

$$V_2 = 0.75 \text{ ml}$$

Diambil 0.75 ml ekstrak 10.000ppm dicukupkan hingga 1 ml

Konsentrasi 5000 ppm : $5000 \text{ ppm} \times 1 \text{ ml} = 10.000 \text{ ppm} \times V_2$

$$V_2 = 0.5 \text{ ml}$$

Diambil 0.5 ml ekstrak 10000 ppm dicukupkan hingga 1 ml

Konsentrasi 2500 ppm : $2500 \text{ ppm} \times 1 \text{ ml} = 5000 \text{ ppm} \times V_2$

$$V_2 = 0.5 \text{ ml}$$

Diambil 0.5 ml ekstrak 5000 ppm dicukupkan hingga 1 ml