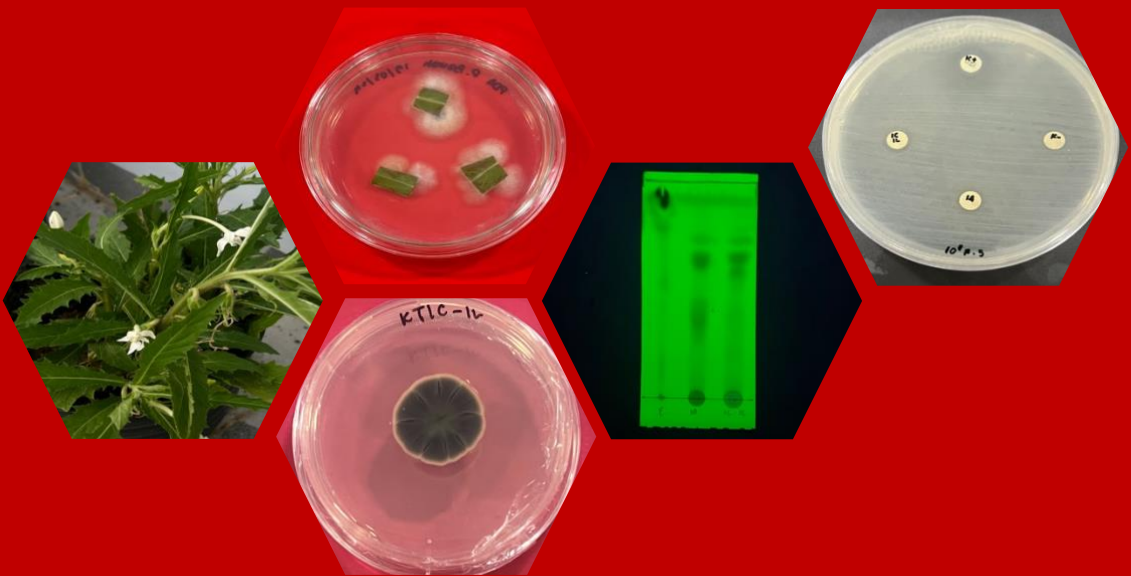


**ISOLASI DAN SKRINING FUNGI ENDOFIT DARI
KITOLOD (*Hippobroma longiflora* [L.] G. Don) SEBAGAI PENGHASIL
ANTIBAKTERI TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa***



**ISTI MURIA SUHARMAN
N011201013**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ISOLASI DAN SKRINING FUNGI ENDOFIT DARI
KITOLOD (*Hippobroma longiflora* [L.] G. Don) SEBAGAI PENGHASIL
ANTIBAKTERI TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa***

**ISTI MURIA SUHARMAN
N011201013**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ISOLASI DAN SKRINING FUNGI ENDOFIT DARI
KITOLOD (*Hippobroma longiflora* [L.] G. Don) SEBAGAI PENGHASIL
ANTIBAKTERI TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa***

ISTI MURIA SUHARMAN
N011201013

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Farmasi

pada

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

SKRIPSI

ISOLASI DAN SKRINING FUNGI ENDOFIT DARI
KITOLOD (*Hippobroma longiflora* [L.] G. Don) SEBAGAI PENGHASIL
ANTIBAKTERI TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa*

ISTI MURIA SUHARMAN

N011201013

Skripsi,

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Farmasi pada 19
Agustus 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan
pada

Program Studi Farmasi
Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt.
NIP. 19611111 198703 2 001



Nana Juniarti Natsir Djide, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19900602 201504 2 002

Mengetahui:

Ketua Program Studi,




Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19860116 201012 2 009

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi yang berjudul "Isolasi dan Skrining Fungi Endofit dari Kitolod (*Hippobroma longiflora* [L.] G. Don) sebagai Penghasil Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt. dan Nana Juniarti Natsir Djide, S.Si., M.Si., Apt). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.



ISTI MURIA SUHARMAN
N011201013

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji syukur atas kehadiran Allah SWT, Tuhan semesta alam, yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini tepat pada waktunya. Penyelesaian tugas akhir ini sangat dipengaruhi oleh keterbatasan pengetahuan penulis. Penulis menyadari bahwa tanpa dukungan dan dorongan dari berbagai pihak, pencapaian ini tidak akan mungkin terwujud. Oleh karena itu, dengan tulus dan rendah hati, penulis ingin mengungkapkan rasa terima kasih yang besar kepada Ibu Prof. Dr. Sartini, M. Si., Apt. selaku pembimbing utama dan Ibu Nana Juniarti Natsir Djide, S. Si., M. Si., Apt. selaku pembimbing pendamping atas semua bimbingan, arahan, dan ilmu yang diperlukan oleh penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Ucapan terima kasih juga diberikan kepada Ibu Dr. Herlina Rante, S. Si., M. Si., Apt. dan Bapak Muhammad Raihan, S. Si., M.Sc.Stud., Apt. selaku penguji yang telah memberikan masukan dan saran dalam penyempurnaan skripsi ini. Kepada Ibu Dr. Risfah Yulianty, S. Si., M. Si., Apt. selaku pembimbing akademik penulis yang telah membimbing selama proses penyelesaian studi penulis. Penghargaan yang sebesar-besarnya juga penulis sampaikan kepada Dekan, seluruh dosen, serta staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas kontribusinya dalam meningkatkan kualitas dan fasilitas, serta mempermudah proses administrasi selama penulis menjalani studi dan penelitian. Kepada Ibu Haslia, S. Si., selaku Laboran Laboratorium Mikrobiologi Farmasi FFUH, yang telah membantu dan memberikan saran selama proses penelitian ini.

Demikian pula penulis menyampaikan terima kasih kepada teman penelitian, Amelynda, Aliyyah dan Alfaujan yang selalu saling mendukung dan saling membantu selama penyelesaian penelitian dan penyusunan skripsi ini. Kepada Samuel, teman-teman "Vanilla" dan korps asisten Mikrobiologi Farmasi yang senantiasa membantu dan memberi dukungan kepada penulis. Serta semua pihak yang telah membantu dan tidak dapat disebutkan namanya satu per satu.

Akhirnya, dengan rasa syukur yang mendalam, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada kedua orang tua, dan saudara-saudara penulis yang selalu memberikan motivasi, arahan, serta dukungan moral dan materi kepada penulis dalam penyusunan skripsi ini.

Penulis meyakini bahwa tanpa bantuan dari berbagai pihak, penulisan skripsi ini tidak akan bisa terselesaikan. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu dalam penulisan skripsi ini.

Penulis,



Isti Muria Suharman

ABSTRAK

ISTI MURIA SUHARMAN. **Isolasi dan Skrining Fungi Endofit dari Kitolod (*Hippobroma longiflora* [L.] G. Don) sebagai Penghasil Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*** (dibimbing oleh Sartini dan Nana Juniarti Natsir Djide).

Latar belakang. *Pseudomonas aeruginosa* termasuk salah satu bakteri yang menyebabkan infeksi pada mata, seperti konjungtivitis. Secara tradisional kitolod (*Hippobroma longiflora* [L.] G. Don) telah digunakan oleh masyarakat untuk mengobati penyakit pada mata dan beberapa kali telah dilaporkan mengandung senyawa antibakteri. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi potensi senyawa antibakteri dari fungi endofit *H. longiflora* terhadap *P. aeruginosa* dan mengetahui perbedaan kandungan golongan senyawa dari ekstrak hasil fermentasi isolat fungi endofit *H. longiflora* dengan ekstrak etil asetat *H. longiflora*. **Metode.** Isolasi fungi endofit dari daun *H. longiflora* dilakukan dengan metode tanam langsung pada medium *Potato Dextrose Agar* selama 7 hari, dilanjutkan skrining antibakteri fungi endofit dengan metode agar blok. Isolat aktif difermentasi dengan metode *Submerged Fermentation* (SmF) menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Hasil fermentasi diekstraksi dan dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa*. Identifikasi metabolit sekunder pada ekstrak hasil fermentasi dan ekstrak etil asetat *H. longiflora* dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). **Hasil.** Sebanyak tujuh isolat diperoleh dari hasil isolasi fungi endofit dan didapatkan dua isolat aktif (KT1A dan KT1C-IL) yang memiliki penampakan aktivitas antibakteri paling besar terhadap *P. aeruginosa*. Hasil uji aktivitas antimikroba pada ekstrak hasil fermentasi isolat KT1A dan KT1C-IL masing-masing sebesar $6,61 \pm 0,69$ mm dan $7,36 \pm 0,50$ mm. Skrining fitokimia menunjukkan kedua ekstrak hasil fermentasi dan ekstrak etil asetat *H. longiflora* mengandung golongan senyawa yang sama, yaitu terpenoid. **Kesimpulan.** Fungi endofit *H. longiflora* mampu menghambat aktivitas *P. aeruginosa* serta ditemukan kesamaan kandungan golongan senyawa pada ekstrak hasil fermentasi isolat KT1A dan KT1C-IL dengan ekstrak etil asetat *H. longiflora*.

Kata kunci: Kitolod; *Hippobroma longiflora* [L.] G. Don; fungi endofit; antibakteri; *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

ISTI MURIA SUHARMAN. **Isolation and Screening of Endophytic Fungi from Kitolod (*Hippobroma longiflora* [L.] G. Don) as Antibacterial Producer Against *Pseudomonas aeruginosa*** (supervised by Sartini dan and Juniarti Natsir Djide).

Background. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the bacteria that causes eye infections, such as conjunctivitis. Traditionally, kitolod (*Hippobroma longiflora* [L.] G. Don) has been used by communities to treat eye diseases, and it has been reported several times to contain antibacterial compounds. **Aim.** This study aims to explore the potential antibacterial compounds from endophytic fungi of *H. longiflora* against *P. aeruginosa* and to identify the classes of compounds between the fermented extracts of endophytic fungi *H. longiflora* and the ethyl acetate extract of *H. longiflora*. **Methods.** Endophytic fungi were isolated from *H. longiflora* leaves using the direct planting method on Potato Dextrose Agar medium for 7 days, followed by antibacterial screening of the endophytic fungi using the agar block method. The active isolates were fermented using the Submerged Fermentation (SmF) method with a shaker at 150 rpm. The fermentation products were extracted and then tested for antibacterial activity against *P. aeruginosa*. Secondary metabolite identification in the fermentation extract and the ethyl acetate extract of *H. longiflora* was performed using Thin Layer Chromatography (TLC). **Results.** Seven isolates were obtained from the isolation of endophytic fungi, and two active isolates (KT1A and KT1C-IL) showed the highest antibacterial activity against *P. aeruginosa*. Antimicrobial activity tests on the fermented extracts of isolates KT1A and KT1C-IL showed inhibition zones of 6.61 ± 0.69 mm and 7.36 ± 0.50 mm, respectively. Phytochemical screening indicated that both fermented and ethyl acetate extract of *H. longiflora* contained the same class of compounds, namely terpenoids. **Conclusion.** Endophytic fungi of *H. longiflora* were able to inhibit the activity of *P. aeruginosa*, and similarities were found in the compound groups between the fermentation extracts of isolates KT1A and KT1C-IL and the ethyl acetate extract of *H. longiflora*.

Keywords: Kitolod; *Hippobroma longiflora* [L.] G. Don; endophytic fungi; antibacterial; *Pseudomonas aeruginosa*

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah	2
1.3 Tujuan penelitian	2
BAB II METODE PENELITIAN	3
2.1 Alat dan bahan	3
2.2 Metode kerja	3
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN	7
3.1 Hasil	7
3.2 Pembahasan	14
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	20
4.1 Kesimpulan	20
4.2 Saran	20
DAFTAR PUSTAKA	21
LAMPIRAN	26

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Karakteristik isolat fungi endofit	9
2. Hasil skrining isolat fungi endofit <i>H. longiflora</i> terhadap <i>P.aeruginosa</i>	9
3. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak hasil fermentasi terhadap <i>P.aeruginosa</i>	12
4. Nilai R _f fitokimia ekstrak etil asetat <i>H. longiflora</i> dan ekstrak hasil fermentasi isolat KT1A dan KT1C-IL	13
5. Hasil skrining fitokimia ekstrak etil asetat <i>H. longiflora</i> dan ekstrak hasil fermentasi isolat KT1A dan KT1C-IL	14
6. Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi isolat KT1A	27
7. Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi isolat KT1C-IL	27
8. Hasil pengukuran diameter zona hambat kontrol positif	28
9. Komposisi medium <i>Potato Dextrose Agar</i>	28
10. Komposisi medium <i>Nutrient Agar</i>	28
11. Komposisi medium <i>Potato Dextrose Yeast</i>	28
12. Komposisi medium <i>Mueller Hinton Agar</i>	28

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Hasil isolasi fungi endofit	7
2. Hasil pemurnian fungi endofit	8
3. Hasil skrining antibakteri fungi endofit	10
4. Ekstrak hasil fermentasi isolat	11
5. Hasil uji aktivitas antibakteri	11
6. Hasil uji KLT	12
7. Hasil skrining fitokimia	13
8. Sampel kitolod (<i>Hippobroma longiflora</i> [L.] G. Don	29
9. Proses fermentasi	29
10. Hasil fermentasi	29
11. Hasil sonikasi	29
12. Hasil liofilisasi isolat KT1A	29
13. Hasil liofilisasi isolat KT1C-IL	29
14. Kontrol pengerjaan isolasi	29
15. Replikasi hasil uji aktivitas antibakteri	30
16. Hasil identifikasi senyawa alkaloid	30
17. Hasil identifikasi tanaman	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema kerja penelitian	26
2. Perhitungan	27
2a Konsentrasi ekstrak	27
2b Diameter zona hambat	27
3. Komposisi medium	28
4. Dokumentasi penelitian	29

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Konjungtivitis merupakan salah satu jenis penyakit infeksi mata yang banyak terjadi di Indonesia. Dari 1,2 juta pasien rawat jalan yang tercatat di Kabupaten Bandung, pasien yang mengalami konjungtivitis ditemukan sebanyak 14.291 (1,16%) kasus (DINKES Kab. Bandung, 2019). Konjungtivitis dapat terjadi karena adanya alergi serta infeksi dari bakteri, virus, maupun jamur (Shams *et al.*, 2022). 50-70% konjungtivitis terjadi karena adanya infeksi bakteri dan *Pseudomonas aeruginosa* menjadi salah satu penyebab konjungtivitis yaitu sekitar 40,0% (Deepthi & Prabakaran, 2020; Junior *et al.*, 2023). Selain konjungtivitis, infeksi *P. aeruginosa* pada mata juga dapat menyebabkan keratitis dan endoftalmitis yang dapat mengganggu penglihatan hingga menyebabkan kebutaan (Mohamed *et al.*, 2023). Infeksi *P. aeruginosa* pada mata dapat terjadi karena adanya pemakaian *contact lens*, penyakit pada permukaan mata, trauma mata serta riwayat operasi mata (Sajjad *et al.*, 2023).

Pemberian antibiotik dilakukan untuk mengobati infeksi, namun beberapa golongan antibiotik seperti aminoglikosida, kuinolon, dan β -laktam telah dilaporkan resisten terhadap *P. aeruginosa* (Pang *et al.*, 2019). Hal ini mendorong dilakukannya penemuan obat baru dari bahan alam yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Prakoso *et al.*, 2023). Salah satu tumbuhan yang mungkin dapat digunakan sebagai antibakteri ialah kitolod (*Hippobroma longiflora* [L.] G. Don).

Menurut Yuliana *et al.* (2023), kitolod secara tradisional telah digunakan oleh masyarakat untuk mengobati penyakit pada mata, hal ini juga didukung dari beberapa penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa kitolod mengandung senyawa-senyawa bioaktif yang dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri, antiinflamasi, analgesik, dan antifungi. Wardani *et al.* (2022) melaporkan bahwa fraksi air dari ekstrak etanol daun *H. longiflora* memiliki aktivitas antibakteri yang paling besar terhadap *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 30% dengan diameter zona hambat 19,0 mm. Hal ini terjadi karena ekstrak daun *H. longiflora* mengandung beberapa golongan senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid dan saponin yang mampu bertindak sebagai antibakteri (Wardani *et al.*, 2022).

Senyawa bioaktif dapat diperoleh dari tumbuhan secara langsung maupun dari mikroorganisme yang tumbuh dalam jaringan tumbuhan seperti fungi endofit (Yuliani & Ismail, 2023). Kemampuan fungi endofit dalam menghasilkan senyawa bioaktif dan metabolit sekunder yang sama dengan tumbuhan inangnya menjadi peluang yang sangat besar dalam penemuan antibiotik baru karena memiliki siklus hidup yang lebih pendek dari tumbuhan sehingga mudah ditumbuhkan (Asnita *et al.*, 2020). Fungi endofit melalui proses fermentasi mampu menghasilkan senyawa bioaktif dalam waktu yang cepat dan dalam jumlah yang besar dengan aktivitas yang sama bahkan lebih besar dari tumbuhan inangnya (Asnita *et al.*, 2020). Selain itu, fungi endofit juga

dapat menghasilkan senyawa unik yang tidak diproduksi oleh tumbuhan inang (Jagannath *et al.*, 2021). Fungi endofit banyak ditemukan di alam sehingga keberadaannya dalam suatu tumbuhan tidak dapat diprediksi dan sangat bervariasi (Jamilatun & Shufiyani, 2019).

Produksi senyawa metabolit sekunder oleh fungi endofit sangat dipengaruhi oleh faktor habitat dan kondisi lingkungannya (Muharini *et al.*, 2022). Tumbuhan *H. longiflora* dapat tumbuh pada daerah yang memiliki iklim tropis dan subtropis, umumnya tumbuhan ini ditemukan pada daerah dataran rendah dengan kondisi lingkungan yang lembab (Gloriana *et al.*, 2021). Menurut Yumna *et al.* (2023), Bone merupakan daerah yang beriklim tropis dengan tingkat kelembaban udara sekitar 95%-99% yang sesuai dengan kondisi tumbuh *H. longiflora*. Melihat adanya potensi *H. longiflora* dalam terapi infeksi mata dan belum adanya penelitian mengenai aktivitas antibakteri isolat fungi endofit dari *H. longiflora* terhadap *P. aeruginosa* menjadi alasan dilakukan penelitian mengenai isolasi dan skrining fungi endofit dari *H. longiflora* sebagai penghasil antibakteri terhadap *P. aeruginosa*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah fungi endofit dari tumbuhan kitolod (*H. longiflora*) dapat menghasilkan senyawa antibakteri terhadap *P. aeruginosa*?
2. Apakah ekstrak hasil fermentasi isolat fungi endofit *H. longiflora* memiliki kandungan golongan senyawa yang sama dengan ekstrak etil asetat *H. longiflora*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui kemampuan isolat fungi endofit *H. longiflora* dalam menghasilkan senyawa antibakteri terhadap *P. aeruginosa*
2. Untuk mengetahui perbedaan kandungan golongan senyawa antara ekstrak hasil fermentasi isolat fungi endofit *H. longiflora* dengan ekstrak etil asetat *H. longiflora*

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

2.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya ialah, autoklaf (*All American Model 25X-2*[®]), *Biosafety Cabinet* (*Thermo Scientific*[®]), inkubator (*Memmert*[®]), *Laminar Air Flow* (*Labolytic*[®]), *shaker* (*IKA*[®]), oven (*Ecocell*[®]), *rotary evaporator* (*Banchll*[®]), sonikator (*Delta68H*[®]), timbangan analitik (*Ohaus*[®]), pipet mikro (*Dragonlab*[®]), jangka sorong (*Tricle Brand*[®]), dan alat gelas lainnya.

2.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain, daun kitolod (*Hippobroma longiflora* [L.] G. Don.), Ekstrak etil asetat *H. longiflora*, mikroba uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, medium *Potato Dextrose Agar* (*Merck*[®]), medium *Mueller Hinton Agar* (*Oxoid*[®]), medium *Potato Dextrose Broth* (*Difco*[®]), medium *Nutrient Agar* (*Merck*[®]), ekstrak yeast (*Prondisa*[®]), aquades, etanol 70%, etanol 96%, etil asetat, metanol, NaOCl 1%, kloramfenikol *disc* (*Oxoid*[®]), *paper disc blank* (*Oxoid*[®]), lempeng silika GF254 (*Merck*[®]), reagen Dragendorff, reagen AlCl₃, reagen FeCl₃, reagen Vanilin-H₂SO₄, dan lain-lain.

2.2 Metode Kerja

2.2.1 Penyiapan alat

Alat-alat berbahan gelas dicuci bersih terlebih dahulu dengan menggunakan deterjen, kemudian dibersihkan dengan menggunakan air mengalir dan keringkan. Sterilisasi alat-alat yang berbahan gelas dan berskala dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sementara sterilisasi untuk alat-alat yang tahan terhadap pemanasan tinggi dan tidak berskala dapat disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam (Parrot, 1971).

2.2.2 Penyiapan medium

Pembuatan medium PDA, MHA, dan NA dilakukan dengan menimbang serbuk medium sesuai jumlah yang tertera pada etiket. Serbuk medium yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquades sedikit demi sedikit hingga mencapai volume akhir. Medium kemudian dipanaskan sambil diaduk hingga larut sempurna. Sterilisasi medium dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Zimbro *et al.*, 2009).

Pembuatan medium PDY sebagai medium starter dilakukan dengan melarutkan 1,92 gram serbuk PDB dan 1% ekstrak yeast dalam 80 mL aquades. Pembuatan medium PDY untuk proses fermentasi dilakukan dengan melarutkan 5,4 gram serbuk PDB dan 1% ekstrak yeast dalam 225 mL aquades untuk masing-masing labu Erlenmeyer 500 mL. Serbuk PDB dan ekstrak yeast yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquades sedikit demi sedikit sambil dihomogenkan. Setelah serbuk PDB larut, aquades ditambahkan hingga mencapai volume akhir, kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit

2.2.3 Preparasi sampel

Sampel daun *H. longiflora* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Kecamatan Kahu, Kabupaten Bone, Provinsi Sulawesi Selatan. Sampel daun segar tersebut dibersihkan dengan melakukan pencucian sampel di bawah air mengalir untuk menghilangkan kotoran-kotoran. Sterilisasi permukaan dilakukan pada sampel dengan merendam sampel ke dalam larutan etanol 70% selama 1 menit, kemudian dikeringkan dan direndam kembali dalam NaOCl 1% selama 5 menit. Kemudian, direndam kembali menggunakan larutan etanol 70% selama 30 detik dan dibilas menggunakan aquades steril, lalu dikeringkan menggunakan tisu steril (Widjajanti *et al.*, 2022).

2.2.4 Isolasi fungi endofit

Sampel yang telah disterilisasi permukaan kemudian dipotong pada bagian terdalam helai daun menggunakan gunting steril dengan ukuran 1 x 1 cm. Bagian yang telah dipotong ditanam secara aseptik pada permukaan medium PDA, kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 -7 hari (Widjajanti *et al.*, 2022). Pada tahapan isolasi fungi endofit ini, beberapa kontrol digunakan, meliputi kontrol ruang, kontrol medium, kontrol air bilasan terakhir dan kontrol sampel tanpa sterilisasi permukaan.

Koloni yang tumbuh pada medium setelah proses isolasi yang menunjukkan morfologi fungi (bentuk, tepi biakan, permukaan, warna miselium substrat dan miselium udara serta pigmen terlarut) dengan karakteristik yang berbeda kemudian dimurnikan ke dalam medium PDA yang baru menggunakan tusuk sate steril. Tahapan ini dilakukan berulang hingga diperoleh koloni murni.

2.2.5 Skrining antibakteri fungi endofit

Metode yang digunakan dalam melakukan skrining antibakteri fungi endofit yaitu metode agar *block/plug*. Medium PDA yang telah ditumbuhi oleh isolat fungi endofit selama 5-7 hari kemudian dipotong menggunakan sedotan plastik steril dan dipindahkan ke dalam cawan petri berisi medium MHA yang telah diinokulasikan bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 (setara 10⁸ CFU/ml) secara bertumpuk. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Aktivitas antibakteri fungi endofit

dapat dilihat dari zona hambat yang terbentuk di sekitar potongan isolat fungi endofit (Pratama *et al.*, 2018).

2.2.6 Fermentasi isolat fungi endofit dan ekstraksi metabolit sekunder

Fungi endofit difermentasi menggunakan metode fermentasi cair dengan menggunakan medium PDY. Isolat fungi endofit yang telah tumbuh pada medium PDA diinokulasikan ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL yang berisi medium PDY 80 mL, kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 7 hari sebagai *starter*. Sebanyak 3 labu Erlenmeyer 500 mL yang berisi 225 mL medium PDY disiapkan untuk proses fermentasi. Selanjutnya, *starter* yang telah diinkubasi dimasukkan sebanyak 25 mL ke dalam labu Erlenmeyer hingga total volume untuk tiap labu Erlenmeyer mencapai 250 mL, kemudian difermentasi menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm (putaran/menit) selama 7 hari (Situmorang *et al.*, 2021; Melliawati & Sunifah, 2017).

Hasil fermentasi disatukan dan ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan 1:1, kemudian disonikasi selama 4 x 15 menit menggunakan sonikator (48 kHz). Hasil fermentasi yang telah disonikasi disaring menggunakan kertas saring steril, setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan selanjutnya diliofilisasi. Hasil fermentasi fungi endofit *H. longiflora* yang telah dipekatkan disimpan untuk tahapan selanjutnya.

2.2.7 Penyiapan bakteri uji

Peremajaan bakteri uji *P. aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan dengan menginokulasikan bakteri uji sebanyak 1 ose bulat kemudian digoreskan pada tabung reaksi berisi medium NA miring. Selanjutnya, tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam (Oktaviani *et al.*, 2023).

Bakteri *P. aeruginosa* yang telah diremajakan diinokulasikan menggunakan ose bulat ke dalam tabung reaksi berisi NaCl fisiologis 0,9% hingga setara kekeruhannya dengan standard McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) (Pratama *et al.*, 2018).

2.2.8 Uji daya hambat

Uji daya hambat dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan *paper disc*. Medium MHA disiapkan dan dituang ke dalam cawan petri, setelah memadat suspensi bakteri *P. aeruginosa* ATCC 27853 (setara 10^8 CFU/ml) diinokulasikan secara menumpuk pada permukaan medium menggunakan *cotton swab*. Ekstrak hasil fermentasi yang telah dipekatkan kemudian diencerkan menggunakan aquades hingga diperoleh konsentrasi 10% b/v. Ekstrak hasil fermentasi beserta aquades steril (kontrol negatif) dicuplik sebanyak 20 μ L ke *paper disc blank* menggunakan pipet mikro. Masing-masing *paper disc* dan kloramfenikol *disc* 30 μ g (kontrol positif) kemudian diletakkan di permukaan medium MHA yang telah diinokulasikan biakan

uji dan diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Adanya aktivitas sebagai antibakteri dilihat dari adanya zona bening yang terbentuk yang kemudian dihitung luas zona bening tersebut (Wardani *et al.*, 2022).

2.2.9 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak hasil fermentasi isolat fungi endofit dan ekstrak etil asetat *H. longiflora* masing-masing ditotolkan pada 6 lempeng silika gel GF254 yang berbeda (2 lempeng untuk pengukuran nilai R_f dan 4 lempeng untuk skrining fitokimia). Kemudian, lempeng KLT dielusi dengan menggunakan etil asetat, metanol dan air dengan perbandingan 8:2:1 hingga diperoleh pola kromatogram. Untuk melakukan pengukuran nilai R_f , lempeng KLT diamati pada UV 254 nm dan 366 nm kemudian dilakukan penyemprotan menggunakan H_2SO_4 10% untuk memperjelas noda yang terbentuk.

2.2.10 Skrining fitokimia

Skrining fitokimia pada pengujian ini dilakukan dengan melakukan penyemprotan beberapa pereaksi pada lempeng KLT yang telah dilakukan penotolan. Beberapa pereaksi disemprotkan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa, meliputi pereaksi Vanilin H_2SO_4 untuk identifikasi golongan senyawa terpenoid, pereaksi $FeCl_3$ untuk identifikasi golongan senyawa polifenol, pereaksi Dragendorff untuk identifikasi golongan senyawa alkaloid, dan pereaksi $AlCl_3$ untuk identifikasi golongan senyawa flavonoid. Kemudian, lempeng KLT diamati di bawah sinar UV dan dilakukan pemanasan apabila diperlukan (Imrawati *et al.*, 2023).

2.2.11 Identifikasi alkaloid dengan metode tabung

Ekstrak hasil fermentasi dan ekstrak etil asetat *H. longiflora* dilarutkan dengan pelarut yang sesuai kemudian ditambahkan 5 tetes HCl 2N dan dipanaskan. Setelah didinginkan, ditambahkan 3 tetes reagen Dragendorff. Apabila terbentuk endapan dan berwarna jingga maka sampel yang diuji mengandung alkaloid (Suleman, *et al.*, 2022).

2.2.12 Analisis data

Data yang telah diperoleh selanjutnya dianalisis dan dibahas kemudian dilakukan penarikan kesimpulan