

**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 patogen 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

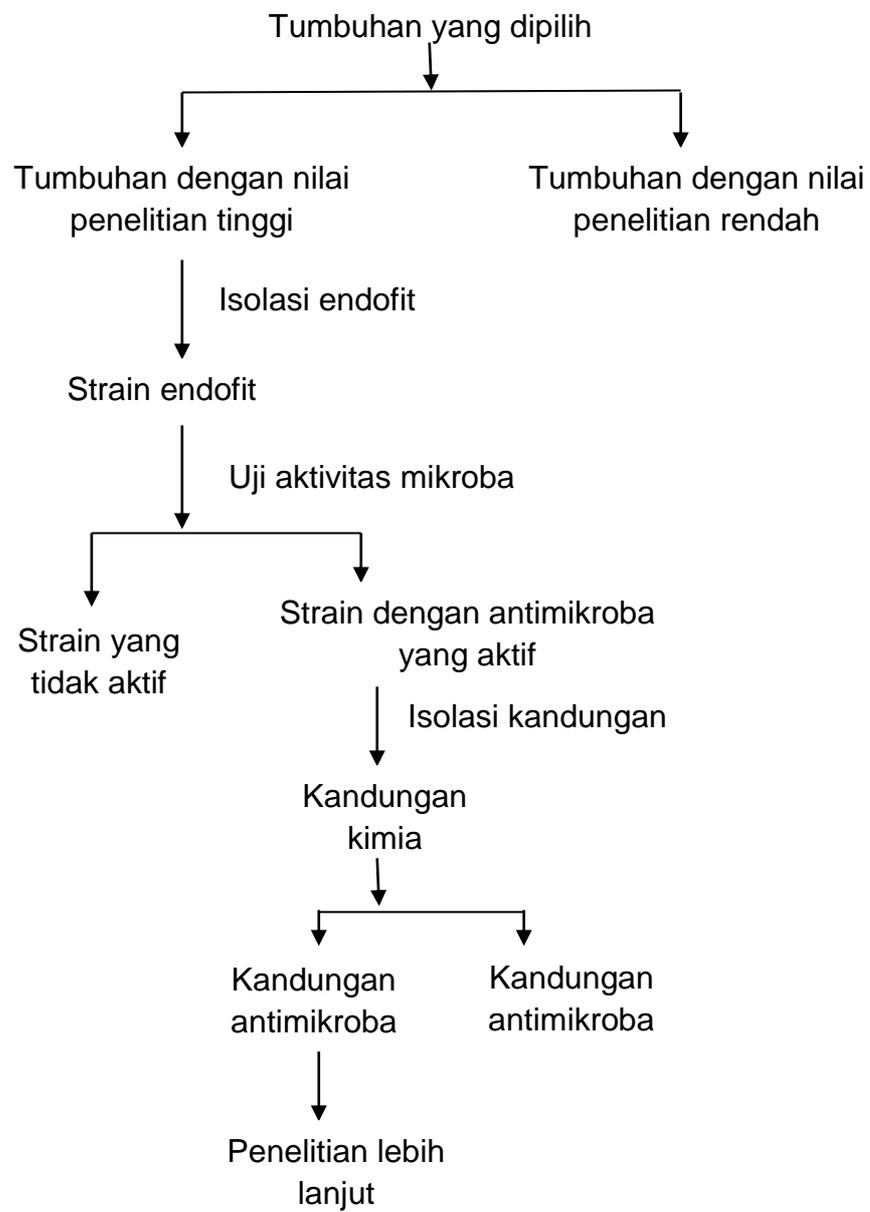
Antibiotik merupakan produk organik alami dengan berat molekul rendah yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang aktif pada konsentrasi rendah pada mikroorganisme lain. Seringkali, endofit merupakan sumber antibiotik ini. Produk alami dari mikroba endofit telah diamati untuk menghambat atau membunuh penyebab 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

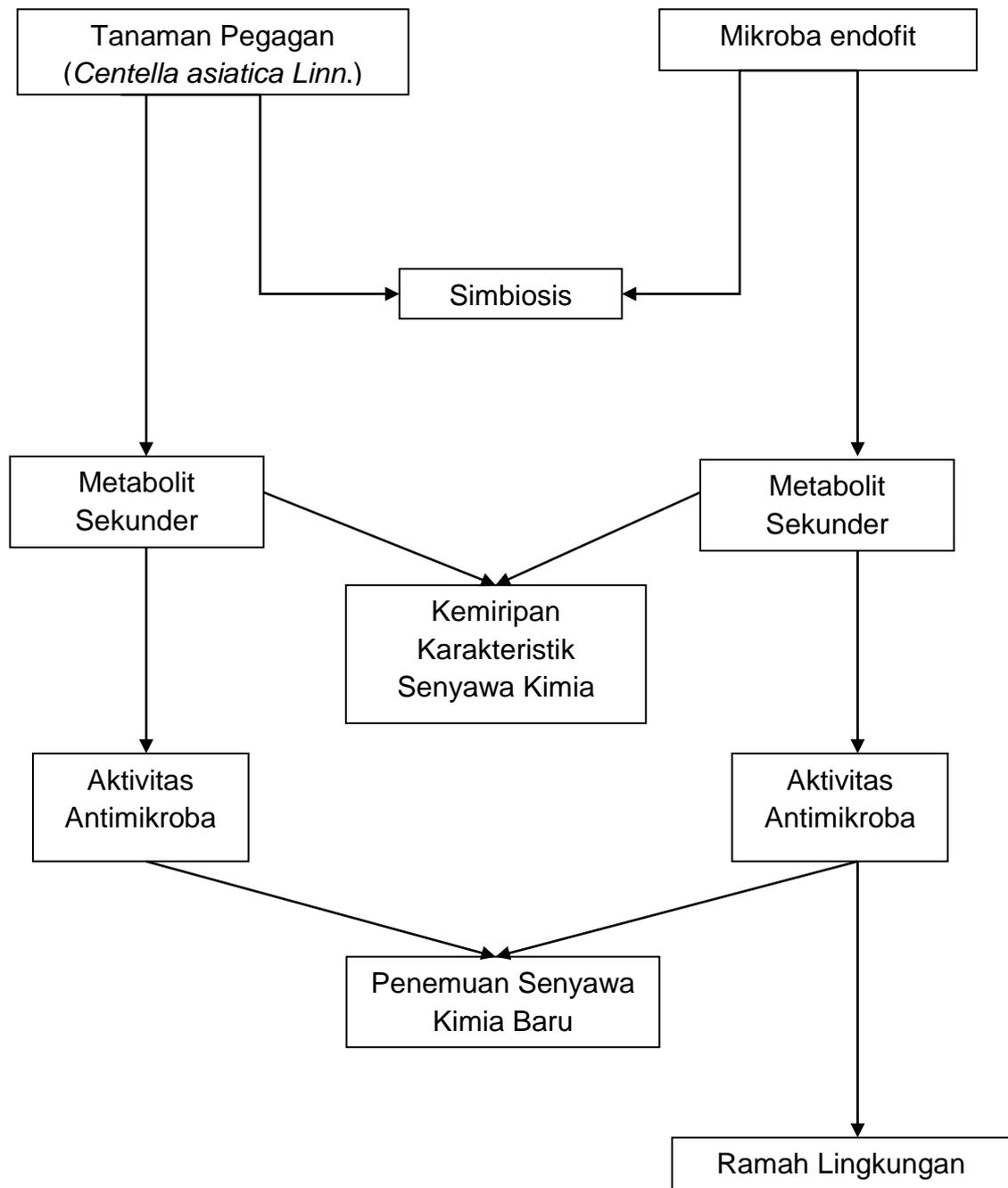
dalam mikrobiologi adalah deteksi agen infeksius dan diskriminasi nonpathogenik dari strain patogen berdasarkan gen tertentu. PCR digunakan untuk memperkuat bagian untai DNA yang pendek dan terdefinisi dengan baik. Ini bisa menjadi gen tunggal, atau hanya bagian dari gen. Berbeda dengan organisme hidup, 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

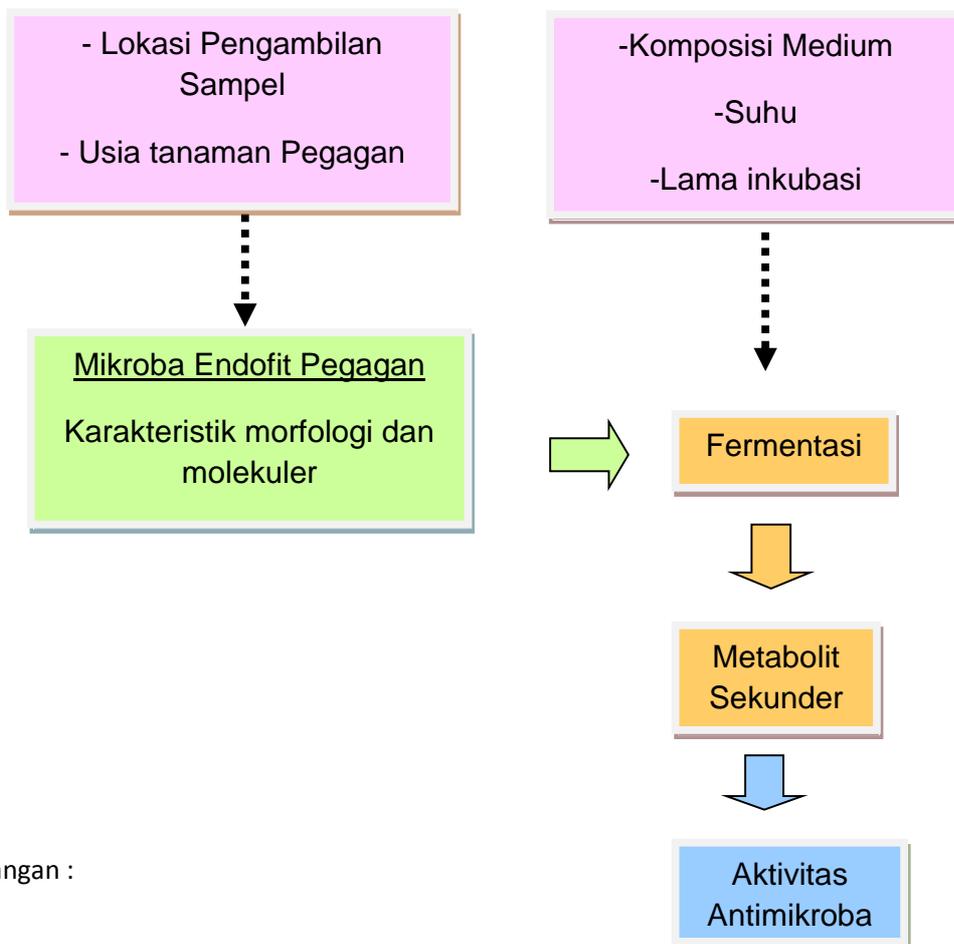
Filogenetik adalah bidang penelitian yang berkaitan dengan menemukan hubungan genetik antar spesies. Ide dasarnya adalah membandingkan karakter spesifik (fitur) spesies, dengan asumsi alami bahwa spesies serupa (yaitu, spesies dengan karakter serupa) secara genetik dekat. Istilah filogeni mengacu pada 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