

**OPTIMALISASI PRODUKSI SENYAWA ANTIBAKTERI FUNGI  
ENDOFIT *Penicillium sp* DARI ALGA HIJAU *Ulva reticulata* Forsskal**

*OPTIMIZATION OF PRODUCTION ANTIBACTERIAL COMPOUNDS OF  
ENDOPHYTIC FUNGI *Penicillium sp* FROM *Ulva reticulata* Forsskal*

**NIELMA AULIAH**



**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2013**

## TESIS

### OPTIMALISASI PRODUKSI SENYAWA ANTIBAKTERI FUNGI ENDOFIT *PENICILLIUM sp* DARI ALGA HIJAU *Ulva reticulata Forsskal*

Disusun dan diajukan oleh

NIELMA AULIAH

Nomor Pokok P2500211001

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

pada tanggal 04 November 2013

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasihat

---

Dr. Hj. Sartini, MS  
Ketua

Ketua Program Studi  
Farmasi

---

Prof.Dr. H.M. Natsir Djide, M.S., Apt.

---

Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si  
Anggota

Direktur Program Pascasarjana  
Universitas Hasanuddin,

---

Prof. Dr. Ir. Mursalim

**OPTIMALISASI PRODUKSI SENYAWA ANTIBAKTERI  
FUNGI ENDOFIT *PENICILLIUM sp* DARI  
ALGA HIJAU *Ulva reticulata Forsskal***

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Farmasi

Disusun dan Diajukan Oleh

NIELMA AULIAH

Kepada

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2013**

## **PERNYATAAN KEASLIAN TESIS**

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Nielma Auliah

Nomor Mahasiswa : P2500211001

Program Studi : Farmasi

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Oktober 2013

Yang Menyatakan

Nielma Auliah

## PRAKATA

Alhamdulillah rabbil alamin, tiada kata yang paling pantas diucapkan oleh penyusun selain rasa syukur dan terima kasih kepada Allah SWT yang telah memberi banyak nikmat, kesehatan, dan petunjuk serta kesabaran sehingga penyusun dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Optimalisasi Produksi Senyawa Antibakteri Isolat Fungi Endofit *Penicillium* sp dari Alga Hijau *Ulva reticulata* Forsskal”** sebagai salah satu syarat menyelesaikan Pendidikan Magister Farmasi pada Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin. Shalawat dan salam serta shalawat kepada Nabi junjungan kita Muhammad SAW, para sahabat, serta keluarganya.

Dalam menyelesaikan tesis ini, banyak pihak yang telah memberikan arahan dan bimbingan dari berbagai pihak, baik secara moril maupun materil. Oleh karena itu patutlah kiranya jika penulis mengucapkan terimakasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada Dr. Hj. Sartini, MS selaku ketua komisi penasehat dan Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si. selaku sekretaris komisi penasehat yang banyak memberikan bantuan dan pengarahan serta meluangkan waktu, tenaga dan pikirannya dalam membimbing penulis sejak awal perencanaan penelitian sampai selesainya penyusunan tesis ini.

.Pada kesempatan ini, penulis juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Mursalim, selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
2. Ibu Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar atas segala bantuan, arahan dan bimbingannya.
3. Bapak Prof. Dr. H. M. Natsir Djide, M.S., Apt. Ketua Program Studi Farmasi Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar.
4. Ibu Dr. Mufidah, S.Si., M.Si., Ibu Dr. Hj. Latifah Rahman, DESS dan Bapak Prof. Dr. Tadjuddin Naid, M.Sc. selaku dosen penguji atas segala bantuan dan arahnya.
5. Bapak/ Ibu dosen Program Studi Farmasi Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar.
6. Seluruh staf Program Studi Farmasi Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar.
7. Teman-teman Angkatan 2011 Program Studi Farmasi Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar: Muh. Rusydi, Muh. Ikhlas, Besse Yuliana, Faisal Mustamin, M. Arifuddin, Kak M. Alfian, Muammar Fawwaz, Kak Mukhriani, Kak Wahyuni, Kak Yustina Siama dan Kak Safaruddin atas segala bantuan dan semangatnya selama menjalani pendidikan.
8. Teman-teman seperjuangan di Lab Mikrobiologi dan Lab Biofarmaka : K' Lia, Afni, Ismail, dan Acay atas kebersamaan dan ilmu yang telah di bagi.

Doa yang tulus dan terima kasih yang setinggi-tingginya penulis sampaikan kepada Ayahanda tercinta Drs. H. Alimin Umar dan Ibunda tercinta Dra. Hj. Nurbaya Kaco yang menjadi sumber inspirasi dan semangat dan senantiasa menyebut nama penulis disetiap doa-doa beliau dan tak pernah lelah dengan doa dan restunya. Terimakasih kepada saudara dan ponakanku tercinta Rahmansyah Dermawan, Desi Saraswati, Alamsyah Kurniawan, Euis Komariah, Ahmad Rais Fardin, Ahmad Tsakib, dan Dzikra Zahratunnisa atas segala dukungan cinta, pertolongan, dan motivasinya. Terimakasih untuk keluarga besar yang selalu memberikan dukungan moril dan materil bagi penyusun selama menempuh pendidikan.

Penulis menyadari bahwa tesis ini tentunya masih jauh dari kesempurnaan karena kesempurnaan hanyalah milik Allah SWT. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkat dan rahmat-Nya. Akhir kata penulis berharap penelitian ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya dalam bidang mikrobiologi dan bahan alam, sekarang maupun di masa akan datang.

Makassar, Oktober 2013

Nielma Auliah

## ABSTRAK

**NIELMA AULIAH.** Optimalisasi Produksi Senyawa Antibakteri Fungi Endofit *Penicillium sp* dari Alga Hijau *Ulva reticulata Forsskal* (dibimbing oleh **Sartini, Gemini Alam**).

Penelitian ini bertujuan untuk: (1) Menentukan lama fermentasi optimal untuk produksi senyawa antibakteri fungi endofit *Penicillium sp*, (2) Menentukan komposisi media produksi yang optimal untuk kandungan senyawa antibakteri dari fungi endofit *Penicillium sp*, dan (3) Mencari kemiripan komponen kimia yang terdapat dalam fungi endofit *Penicillium sp* dan ekstrak tanaman *Ulva reticulata* yang bersifat antibakteri.

Sampel yang digunakan adalah isolat fungi endofit *Penicillium sp* dari Alga Hijau *Ulva reticulata* Forsskal. Metode yang digunakan adalah *submerged fermentation*, dengan optimasi produksi melalui lama fermentasi dan variasi konsentrasi media NaCl, ekstrak yeast, dan induser. Data aktivitas antibakteri dianalisis menggunakan metode kuantitatif deskriptif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa: (1) Lama fermentasi optimal untuk produksi senyawa antibakteri dari fungi endofit *Penicillium sp* adalah 9 hari, (2) Media fermentasi optimal yang memberikan aktivitas antibakteri terbesar adalah NaCl 1% b/v, ekstrak yeast 1% b/v, dan induser 2% v/v, dan (3) Komponen kimia yang terdeteksi antara isolat fungi *Penicillium sp* dengan ekstrak tanaman *Ulva reticulata* memiliki kemiripan berdasarkan nilai Rt (waktu retensi) masing-masing ekstrak, dalam hal ini ekstrak heksan, etil asetat, dan metanol. Golongan senyawa yang terdeteksi adalah alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid.

Kata kunci : Optimalisasi, antibakteri, *Penicillium sp*, *Ulva reticulata Forsskal*



## ABSTRACT

**NIELMA AULIAH.** Optimization of an anti-bacterial isolate *Penicillium sp* production compound from Fungi Endofit *Ulva reticulata Forsskal* (supervised by **Sartini, Gemini Alam**)

This study aims to optimize the anti-bacterial isolate *Penicillium sp* production compound from fungi Endofit *Ulva reticulata Forsskal* using fermentation time and the variation of fermentation medium.

The sample is chosen from filtered isolate from Fungi Endofit *Ulva reticulata Forsskal*. Submerged formation has been carried out as the methodology in which the spore or mycelium is injected and mixed into the production medium therefore its growth is thorough the production medium.

The results show that the fermentation time and the optimum of production medium are NaCl 1% b/v, yeast extract 1% b/v and inducer 2% v/v in PDB media during 9 days of incubation times. The characteristic of chemical components suggest that there is similarity in the chemical components between the outcome of anti-bacterial isolate *Penicillium sp* fermentation isolate and the extract of *Ulva reticulata* Forsskal. This can be seen from preparative KLT test using UV ray of 254 nm and 366 nm with spray reagent of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The results of present study also indicate that there are alkaloid, flavonoid and triterpenoid compounds.

**Keyword:** Optimization of an anti-bacterial production compound, *Penicillium sp*, *Ulva reticulata Forsskal*

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iii
PRAKATA	iv
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	5
II TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Alga Hijau <i>Ulva reticulata</i> Forsskal	6
1. Uraian Umum	6
2. Alga Sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba	8
B. Fungi Endofit	9
1. Uraian Umum	9

2.	Metabolit yang Dihasilkan oleh Fungi Endofit	12
3.	Teknik Isolasi Fungi Endofit	13
C.	Fermentasi	16
D.	Penicillium	22
E.	Antibakteri	23
1.	Uraian Umum	23
2.	Uraian Bakteri	24
F.	Kerangka Pikir	26
G.	Hipotesis	27
III	METODE PENELITIAN	28
A.	Waktu dan Lokasi Penelitian	28
B.	Alat dan Bahan	28
C.	Prosedur Kerja	29
1.	Pengambilan Sampel	29
2.	Produksi Metabolit Sekunder dari Fungi Endofit	29
	<i>Penicillium sp</i>	
a.	Peremajaan Fungi Endofit	29
b.	Pembuatan Kultur Starter	29
c.	Penentuan Lama Fermentasi Terhadap	30
	Produksi <i>Penicillium sp</i>	
d.	Pengujian Aktivitas Antibakteri	30
3.	Optimalisasi Media Produksi dari Hasil Fermentasi	31
	Fungi Endofit <i>Penicillium sp</i>	

a.	Pembuatan Media Produksi dengan Variasi Konsentrasi NaCl	31
b.	Pembuatan Media Produksi dengan Variasi Konsentrasi Ekstrak <i>Yeast</i>	31
c.	Pembuatan Media Produksi dengan Variasi Konsentrasi Induser	32
d.	Karakterisasi Komponen Kimia	33
IV	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	35
A.	Hasil Penelitian	35
1.	Optimalisasi Produksi	35
a.	Penentuan Waktu Fermentasi Produksi Senyawa Antibakteri	35
b.	Pengaruh NaCl Terhadap Produksi Senyawa Antibakteri dari Hasil Fermentasi Fungi Endofit <i>Penicillium sp</i>	36
c.	Pengaruh Ekstrak <i>Yeast</i> Terhadap Produksi Senyawa Antibakteri dari Hasil Fermentasi Fungi Endofit <i>Penicillium sp</i>	38
d.	Pengaruh Induser Terhadap Produksi Senyawa Antibakteri dari Hasil Fermentasi Fungi Endofit <i>Penicillium sp</i>	39
2.	Karakterisasi Komponen Kimia	41
a.	Hasil Profil KLT	41

	b. Hasil Analisis HPLC	43
	c. Identifikasi Komponen Kimia	46
	B. Pembahasan	47
V	KESIMPULAN DAN SARAN	56
	A. Kesimpulan	56
	B. Saran	56
	DAFTAR PUSTAKA	57
	LAMPIRAN	62

## DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Pengaruh lama fermentasi terhadap produksi senyawa antibakteri dari hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium sp.</i> terhadap bakteri uji	36
2.	Pengaruh konsentrasi NaCl terhadap produksi senyawa antibakteri dari hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium sp</i>	37
3.	Pengaruh konsentrasi ekstrak yeast terhadap produksi senyawa antibakteri dari hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium sp</i>	39
4.	Pengaruh penambahan induser terhadap produksi senyawa antibakteri dari hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium sp</i>	40
5.	Perbandingan nilai Rt (waktu retensi) hasil analisis HPLC ekstrak tanaman dan hasil fermentasi fungi endofit <i>Ulva reticulata</i>	46
6.	Hasil Identifikasi Komponen Kimia Ekstrak Tanaman <i>Ulva reticulata</i> dan Hasil Fermentasi Fungi Endofit <i>Penicillium sp</i>	47
7.	Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambatan Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Produksi Senyawa Anti-bakteri Fungi Endofit <i>Penicillium sp</i>	66
8.	Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambatan Pengaruh Media Fermentasi Terhadap Produksi Senyawa Anti-bakteri Fungi Endofit <i>Penicillium sp</i>	67

## DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Gambar <i>Penicillium</i> sp	22
2.	Kerangka pikir penelitian	26
3.	Hasil pengamatan zona hambat fungi endofit <i>Penicillium</i> sp terhadap pengaruh lama fermentasi	35
4.	Hasil pengamatan zona hambatan hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium</i> sp terhadap pengaruh konsentrasi NaCl terhadap bakteri uji	37
5.	Hasil pengamatan zona hambat hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium</i> sp terhadap pengaruh konsentrasi ekstrak yeast terhadap bakteri uji	38
6.	Hasil pengamatan zona hambat hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium</i> sp terhadap pengaruh konsentrasi induser terhadap bakteri uji	40
7.	Perbandingan Hasil Profil KLT ekstrak heksan tanaman dan hasil fermentasi fungi endofit <i>Ulva reticulata</i> (Heksan : Etil = 5:1)	41
8.	Perbandingan Hasil Profil KLT ekstrak etil asetat tanaman dan hasil fermentasi fungi endofit <i>Ulva reticulata</i> (Etil : Metanol = 1 : 1)	41
9.	Perbandingan Hasil Profil KLT ekstrak etil asetat tanaman dan hasil fermentasi fungi endofit <i>Ulva reticulata</i> (Heksan : Etil = 4 : 1)	42
10.	Perbandingan hasil profil KLT ekstrak metanol tanaman dan hasil fermentasi fungi endofit <i>Ulva reticulata</i> (Etil : Metanol = 1:1)	42
11.	Perbandingan hasil analisis HPLC ekstrak heksan tanaman dan hasil fermentasi isolat fungi endofit <i>Ulva reticulata</i>	43
12.	Perbandingan hasil analisis HPLC ekstrak etil asetat tanaman dan hasil fermentasi fungi endofit <i>Ulva reticulata</i>	44

13.	Perbandingan hasil analisis HPLC ekstrak metanol tanaman dan hasil fermentasi fungi endofit <i>U. reticulata</i>	45
14.	Foto hasil identifikasi komponen kimia hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium</i> sp menggunakan pereaksi semprot sitroborat	69
15.	Foto hasil identifikasi komponen kimia hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium</i> sp menggunakan pereaksi semprot <i>Lieberman bocharat</i>	70
16.	Foto hasil identifikasi komponen kimia hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium</i> sp menggunakan pereaksi semprot Dragendroft	70
17.	Isolat <i>Penicillium</i> sp dalam media PDA miring (inkubasi 5 hari)	71
18.	Isolat <i>Penicillium</i> sp dalam media PDA (inkubasi 5 hari)	71
19.	Starter PDY 0,1%	72
20.	Foto hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium</i> sp dengan variasi konsentrasi NaCl (inkubasi 9 hari)	72
21.	Foto hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium</i> sp dengan variasi konsentrasi ekstrak yeast (inkubasi 9 hari)	73
22.	Foto hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium</i> sp dengan variasi induser (infus <i>U. reticulata</i> ) inkubasi 9 hari	73



## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Produksi metabolit sekunder dari fungi endofit <i>Penicillium</i> sp	62
2.	Optimalisasi Media Produksi dari Hasil Fermentasi Fungi Endofit <i>Penicillium</i> sp	63
3.	Pengujian aktivitas antibakteri terhadap hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium</i> sp	64
4.	Skema karakterisasi komponen kimia ekstrak tanaman <i>Ulva reticulata</i> dan hasil fermentasi fungi endofit <i>Penicillium</i> sp	65
5.	Komposisi dan Cara Pembuatan Media Produksi	68

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Indonesia terkenal sebagai negara yang kaya akan bahan hayati laut. Di Indonesia ada 56 jenis alga yang ditemukan berpotensi, yaitu terdiri atas 16 alga hijau, 9 alga coklat, dan 31 alga merah (Khurniasari, 2004). Alga merupakan sumber yang kaya akan produk alami bioaktif dan telah diteliti sebagai bahan biosidal dan farmasi. Dalam beberapa tahun terakhir, ada banyak laporan penelitian dari senyawa turunan makroalga yang memiliki berbagai aktivitas biologis seperti antibakteri (Karthikaidevi *et al*, 2009; Yung *et al*, 2011; Kolanjinathan, 2011; Rebecca *et al*, 2012;), antijamur (Kolanjinathan, 2011); dan antioksidan (Tamat dkk, 2007).

Penelitian yang mengarah kepada pencarian dan penemuan antimikroba baru terus berkembang pesat. Salah satu sumber yang berpotensi sebagai penghasil antimikroba adalah biota laut, salah satunya adalah makroalga atau alga. Del Val *et al* (2009) menemukan bahwa ada 28 spesies alga yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Salah satu jenis alga hijau yang mempunyai potensi sebagai antimikroba adalah *Ulva reticulata*. Jenis ini memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, dan *Salmonella typhi* (Karthikaidevi *et al*, 2009; Aruna *et al*, 2010).

Beberapa hasil penelitian mengenai *Ulva reticulata*, menunjukkan bahwa kandungan senyawa yang terdapat di dalam tanaman ini adalah triterpenoid. Dalam penelitian ini juga, dilaporkan bahwa ekstrak metanol, kloroform, dan air *Ulva reticulata* memiliki aktivitas antioksidan dan toksisitas yang sangat lemah (Tamat dkk, 2007). Penelitian lain menunjukkan bahwa aktivitas antimikroba dari ekstrak metanol *Ulva reticulata* dengan konsentrasi 5% menunjukkan diameter zona hambat sebesar  $16 \pm 0,3$  mm (Kolanjinathan and Stella, 2011).

Rendahnya kandungan senyawa aktif yang dihasilkan oleh makroorganisme laut, menyebabkan banyak penelitian yang beralih ke mikroorganisme laut (Kelecom, 2002). Zheng *et al* (2005) menemukan bahwa mikroorganisme laut yang bersimbiosis dengan makroorganisme laut seperti invertebrata dan alga memiliki potensi sebagai sumber antimikroba, contohnya *Micromonospora* sp. dan *Streptomyces* sp. yang bersimbiosis dengan alga *Gracilaria verrucosa*. Fungi yang bersimbiosis dengan organisme inangnya disebut fungi simbiosis dan menghasilkan metabolit sekunder yang umumnya sama dengan inangnya, antara lain yang bersifat sebagai antimikroba. (Strobel and Daisy, 2003).

Hasil penelitian Suryadi (2011) mengenai fungi endofit yang bersifat antimikroba dari tanaman *Ulva reticulata*, diperoleh 4 jenis isolat fungi, yaitu FSUr-1 (*Aspergillus* sp.), FSUr-2 (*Penicillium* sp.), FSUr-3 (*Cladosporium* sp.), dan FSUr-4 (khamir). Dari ke empat jenis isolat ini, isolat FSUr-2 (*Penicillium* sp.) memiliki aktivitas antimikroba yang sangat

tinggi terhadap mikroba uji, sedangkan berdasarkan penelitian lainnya didapatkan bahwa *Penicillium* sp memiliki beberapa manfaat seperti penelitian yang dilakukan oleh Leitao. AL (2009) bahwa *Penicillium* sp memiliki kemampuan untuk mendegradasi komponen xenobiotik dan transformasi polutan, dan juga terkhusus pada *Penicillium notatum* dan *Penicillium chrysogenum* yang memproduksi penicillin, sedangkan *Penicillium camneberti* dan *Penicillium reguefort*, dimanfaatkan untuk meningkatkan kualitas keju.

Hasil penelitian Suryadi (2011), aktivitas antimikroba yang dihasilkan oleh *Penicillium* sp terhadap bakteri (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella thyposa*) berkisar 13-22 mm, sedangkan untuk fungi (*Candida albicans*, *Mallasezia furfur*) sebesar 25 mm. Berdasarkan literatur (Ibstissam *et al*, 2009) kisaran daya hambat yang diperoleh memiliki aktivitas antimikroba yang sangat baik. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimalisasi produksi dari *Penicillium* sp khususnya terhadap senyawa antibakteri yang dihasilkan. Adapun optimalisasi yang dilakukan menggunakan dua parameter yaitu waktu fermentasi dan media fermentasi. Parameter media fermentasi terbagi atas 3, yaitu (1) NaCl, (2) ekstrak yeast, dan (3) induser, yang digunakan adalah infus dari tanaman *Ulva reticulata*.

## **B. Rumusan Masalah**

1. Apakah lama fermentasi berpengaruh pada produksi senyawa antibakteri dari fungi endofit *Penicillium* sp?
2. Bagaimana pengaruh konsentrasi NaCl, ekstrak yeast, dan infus *Ulva reticulata* dalam media produksi terhadap kandungan senyawa antibakteri dari fungi endofit *Penicillium* sp?
3. Apakah ada kemiripan komponen kimia yang terdapat dalam fungi endofit *Penicillium* sp dengan ekstrak tanaman *Ulva reticulata* yang bersifat antibakteri?

## **C. Tujuan Penelitian**

1. Menentukan lama fermentasi optimal untuk produksi senyawa antibakteri dari fungi endofit *Penicillium* sp.
2. Menentukan komposisi media produksi yang optimal untuk kandungan senyawa antibakteri dari fungi endofit *Penicillium* sp.
3. Mencari kemiripan komponen kimia yang terdapat dalam fungi endofit *Penicillium* sp dan ekstrak tanaman *Ulva reticulata* yang bersifat antibakteri?

#### **D. Manfaat Penelitian**

Diharapkan dari hasil penelitian ini memberikan kontribusi terhadap:

1. Pemanfaatan isolat fungi endofit dari alga laut sebagai penghasil senyawa antifungi.
2. Optimalisasi produksi suatu senyawa yang diperoleh dari biota laut.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Alga Hijau *Ulva reticulata* Forsskal

##### 1. Uraian Umum

Klasifikasi Alga Hijau *Ulva reticulata*

Regnum : Plantae

Divisio : Chlorophyta

Classis : Chlorophyceae

Ordo : Ulvales

Familia : Ulvaceae

Genus : *Ulva*

Species : *Ulva reticulata* Forsskal

Tallus *Ulva reticulata* memiliki diameter 5 mm dan berombak pada bagian atas. Panjang tallus *Ulva reticulata* seharusnya 8 – 12 cm tetapi karena bentuk tallus berombak dan membentuk helaian maka terlihat lebih pendek. Bagian bawah (yaitu tangkai) tallusnya sedikit berongga. Lebar tallus lebih besar di bagian tengah daripada di pangkal. *Ulva reticulata* biasanya ditemukan di perairan laut tetapi terkadang ditemukan juga di perairan payau.

Alga merupakan salah satu organisme laut yang berperan dalam siklus rantai makanan sebagai produsen primer. Secara umum definisi alga atau rumput laut adalah kelompok tanaman tingkat rendah bersifat fototrof yang tidak mempunyai akar, daun dan batang sebenarnya, namun memiliki tallus yang berfungsi sebagai alat vegetatif (Thallophyta). Bentuk tallus alga ada bermacam-macam, ada yang bulat seperti tabung, pipih, gepeng bulat seperti kantong, rambut dan sebagainya. Tallus ini ada yang tersusun oleh hanya satu sel (*unicellular*) dan ada yang terdiri dari banyak sel (*multicellular*). Ada beberapa jenis percabangan pada tallus yaitu tallus *dichotomus* (dua-dua terus menerus), *pinnate* (dua-dua berlawanan sepanjang tallus utama), *pectinate* (berderet searah pada satu sisi tallus utama) dan yang tidak bercabang. Sifat substansi tallus beraneka ragam yaitu lunak seperti gelatin (*gelatinous*), keras karena mengandung zat kapur (*calcareous*), lunak bagaikan tulang rawan (*cartilagenous*), berserabut (*spongy*) dan sebagainya (Van den Hoek *et al*, 1995).

Para ahli mengklasifikasikan alga berdasarkan pigmentasinya, menjadi empat kelas, yaitu alga hijau (Chlorophyta), alga coklat (Phaeophyta), alga biru-hijau (Cyanophyta), dan alga merah (Rhodophyta). Selain mengandung klorofil, alga juga mengandung zat warna lainnya sesuai dengan namanya, sehingga bersifat autotrof (Pratiwi, 2008).



## **Kandungan Kimia**

Secara kimia alga mengandung air, karbohidrat, protein, lemak, serat dan abu yang sebagian merupakan senyawa garam natrium dan kalium. Selain kandungan tersebut di atas, alga juga mengandung enzim, asam nukleat, asam amino, vitamin (A,B,C,D,E, dan K) dan makro-mineral seperti nitrogen, oksigen, dan kalsium; serta mikro-mineral seperti zat besi, iodin, selenium, mangan, kobal, magnesium dan natrium. Kandungan asam amino, vitamin dan mineral pada alga mencapai 10 – 20 kali dibandingkan pada tanaman darat. Beberapa senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam alga hijau *Ulva reticulata* diantaranya terpenoid, asam amino, phlorotannin, n-tetratriacontane, 1-heptadecanamine, docosane, dan sebagainya (Sukatar, 2006).

## **2. Alga Sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba**

Menurut Reskika (2011) alga hijau *Enteromorpha linza* memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Vibrio alginoliticus*, dan alga coklat *Dictyopteris acrostichoides* memiliki aktivitas terhadap *Vibrio alginoliticus* dan *Vibrio harveyi*. Demikian pula dengan penelitian yang dilakukan oleh Vallinayagam *et al* (2009) yang menemukan aktivitas dari alga *Gracilaria edulis* terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Taskin *et al* (2007). juga menemukan bahwa alga merah *Corallina officinalis* memiliki aktivitas terhadap *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, dan *Escherichia coli*, sedangkan alga hijau *Ulva rigida* memiliki aktivitas terhadap *Staphylococcus aureus*.

## **B. Fungi Endofit**

### **1. Uraian Umum**

Mikroba endofit merupakan mikroba yang hidup berkoloni dalam jaringan tumbuhan tanpa menimbulkan gejala penyakit pada tumbuhan inangnya (Simanjuntak dkk, 2002; Radji, 2005). Istilah endofit diperkenalkan pertama kali oleh De Bary pada tahun 1866 sebagai mikroorganisme yang hidup dalam jaringan tanaman yang menyebabkan infeksi asimtomatis tetapi tidak berupa simtom penyakit (Wang *et al*, 2008).

Hampir semua jaringan tanaman mengandung mikroba endofit (Faeth, 2002), termasuk ganggang laut dan lumut (Tan and Zou, 2001). Hasil berbagai penelitian menunjukkan bahwa sebagian besar mikroba endofit yang ditemukan adalah fungi (Strobel *et al*, 2004). Identifikasi fungi endofit yang banyak dilakukan adalah dengan mengamati morfologi dari miselia dan konidianya (Wang *et al*, 2008).

Hubungan antara fungi endofit dan tumbuhan inang dapat terjadi melalui infeksi yang tidak menimbulkan gejala penyakit sampai hubungan simbiosis mutualisme. Mikroba endofit dalam jaringan tanaman memperoleh nutrisi dan perlindungan dari inang, sebaliknya mikroba endofit membantu kehidupan inang dengan cara memproduksi metabolit yang dibutuhkan inang tersebut. Fungi endofit adalah fungi yang terdapat di dalam sistem jaringan tumbuhan seperti daun, batang, ranting ataupun akar tumbuhan. Fungi ini menginfeksi tumbuhan sehat pada jaringan

tertentu dan mampu menghasilkan mikotoksin, enzim, dan antibiotik. (Worang, 2003)

Fungi endofit merupakan kelompok mikroorganisme yang menarik perhatian dikarenakan adanya hubungan yang terjadi antara mikroorganisme tersebut dengan berbagai jaringan tanaman. Fungi ini hidup bersimbiosis saling menguntungkan, dalam hal ini mikroorganisme mendapatkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman dan memproteksi tanaman melawan herbivora, serangga, atau jaringan yang pathogen sedangkan tanaman mendapatkan derivat nutrisi dan senyawa aktif yang diperlukan selama hidupnya (Tanaka *et al*, 1999)

Keberadaan fungi endofit memberikan kontribusi terhadap tanaman inangnya, fungi endofit ini menghasilkan suatu senyawa yang potensial digunakan dalam pengobatan modern, pertanian, dan industri seperti penghasil antibiotika, antivirus, antikanker, antioksidan, insektisida (Strobel and Daisy, 2003). Endofit menarik perhatian sebagai biokatalis dalam transformasi produk alam dan obat-obatan, karena mempunyai kemampuan untuk memodifikasi struktur kimia dengan derajat stereospesifik yang tinggi dan untuk menghasilkan enzim baru maupun enzim yang sudah diketahui yang memfasilitasi produksi senyawa-senyawa yang diinginkan.

Asosiasi fungi endofit dengan tumbuhan inangnya digolongkan dalam 2 kelompok (Worang, 2003):

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

Fungi endofit memiliki arti ekonomis penting di masa depan karena menyimpan potensi tak terbatas yang saat ini belum banyak diaplikasikan dalam bidang industri farmasi sebagai sumber bahan baku obat dan senyawa biologis berkhasiat lainnya. Arti penting ditemukannya mikroorganisme yang mampu memproduksi senyawa berkhasiat ini dapat mengubah paradigma dalam hal pencarian bahan baku farmasi yang efektif dari bahan alam. Mengingat kebutuhan bahan baku obat yang semakin meningkat baik jumlah maupun macamnya maka potensi sumber daya alam Indonesia khususnya mikroorganisme dalam hal ini endofit perlu digali dan dikembangkan. (Sugijanto dkk, 2004)

## 2. Metabolit yang Dihasilkan oleh Fungi Endofit

### a. Antimikroba/Antibiotika

Dari beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa fungi endofit dapat menghasilkan senyawa antimikroba golongan alkaloid, peptide, steroid, fenol, flavonoid, terpenoid (Pimentel *et al*, 2011).

*Cryptocandin* adalah antifungi yang dihasilkan oleh mikroba endofit *Cryptosporiopsis quercina* yang berhasil diisolasi dari tanaman obat *Tripterigenium wilfordii*, dan berkhasiat sebagai antijamur terhadap *Candida albicans* dan *Trichopyton sp.* (Strobel, 2002).

### b. Antikanker

Taxol/Paclitaxel (Diterpenoid) dan derivatnya merupakan zat yang berefek sebagai antikanker yang pertama kali ditemukan yang di produksi oleh mikroba endofit *Pestalotiopsis microspora*, yang diisolasi dari tanaman *Taxus andreanae*, *T. brevifolia*, dan *T. wallichiana* (Strobel and Daisy, 2003; Pimentel *et al*, 2011).

### c. Antimalaria

*Colletotrichum sp.*, fungi endofit yang diisolasi dari tanaman *Artemisia annua*, menghasilkan metabolit artermisinin sebagai antimalaria (Lu *et al*, 2000; Purwanto, 2011)

### d. Antioksidan

Pestacin dan isopestacin merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh endofit *Pestalotiopsis microspora*. Endofit ini berhasil diisolasi dari tanaman *Terminalia morobensis*. (Strobel, 2002).

Senyawa flavonoid juga dihasilkan dari fungi endofit yang diisolasi dari *Ginkgo biloba* L. (Min *et al*, 2010).

e. Enzim

Enzim asparaginase yang berefek antitumor juga berhasil diproduksi dari fungi endofit beberapa tanaman obat di Thailand (Theantana *et al*, 2007). Enzim polifenol oksidase yang berhasil di produksi dari fungi endofit dari kulit buah kakao (Sartini, 2011).

### **3. Teknik Isolasi Fungi Endofit**

Skrining atau penapisan mikroorganisme dapat diartikan sebagai prosedur yang sangat selektif untuk mendeteksi dan mengisolasi hanya mikroorganisme tertentu yang menguntungkan dari suatu populasi mikroorganisme. Oleh karena itu, agar skrining lebih efektif maka perlu melewati tahapan-tahapan tertentu untuk dapat mengesampingkan mikroorganisme yang kurang bermanfaat.

Teknik isolasi dan inokulasi kultur murni fungi merupakan prosedur penting yang menjadi dasar dalam mengembangkan studi tentang struktur, perkembang biakan, efek patogenitas, serta aktivitas fisiologis dari fungi. Berbagai macam prosedur telah dikembangkan guna mengisolasi kultur murni fungi. Dasar pemilihan metode ini tergantung pada beberapa faktor antara lain: jenis fungi, tahapan pertumbuhan, tipe kultur yang diinginkan, dan utamanya adalah pada tingkat kemampuan individu, keterampilan dan ketelitiannya (Wolf, 1969).

Ada beberapa metode isolasi yang dapat diterapkan dalam mengisolasi fungi (fungi epifit maupun fungi endofit). Untuk isolasi fungi endofit umumnya menggunakan sterilisasi permukaan untuk meminimalisir ataupun menghilangkan kontaminan pada permukaan sampel. Sterilisasi permukaan dapat dilakukan dengan merendam sampel pada etanol 70% selama beberapa detik ataupun dengan natrium hipoklorit 0,5 – 3,5% selama 1 – 2 menit, kemudian dibilas dengan air steril sebelum menempatkannya pada media isolasi fungi (Bacon, 2006).

Umumnya bakteri dapat memanfaatkan substrat yang sama dengan fungi. Oleh karena itu, ke dalam media isolasi perlu dilakukan beberapa tindakan pencegahan yaitu dengan mengatur pH medium pada kisaran 3,5 hingga 5,5, dengan cara penambahan asam tartrat 0,5%, ataupun asam laktat 0,1% setelah medium disterilkan, dengan menambahkan antibiotik seperti streptomisin, neomisin, kanaisin, tetrasiklin, kloramfenikol, dan penisilin. Selain itu, kontaminasi bakteri dapat pula dicegah dengan menambahkan kristal violet 10mg/L atau kalium telurit 100mg/L (Labela, 1990).

Untuk mendapatkan isolat murni mikroba dari suatu bahan yang mengandung campuran beberapa mikroba dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu : (Fardiaz, 1988)

a. Isolasi pada agar cawan

Kebanyakan bakteri, kapang dan khamir dapat membentuk koloni pada medium padat, sehingga mudah diisolasi dengan cara menyebarkan

sel-sel tersebut pada agar cawan sedemikian rupa sehingga tumbuh koloni-koloni yang terpisah. Konsentrasi agar yang digunakan 1-2%, tetapi terkadang digunakan agar yang lebih lunak untuk mengisolasi beberapa mikroba tertentu. Prosedur isolasinya dapat menggunakan metode gores yaitu dengan menggosokkan sampel di permukaan medium agar atau metode tuang yaitu dengan cara mengencerkan kultur yang kemudian dituang ke dalam cawan dan kemudian menambahkan medium agar.

b. Isolasi dalam medium cair

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

c. Isolasi sel tunggal

Untuk mengisolasi sel mikroba yang ukurannya besar dan tidak dapat diisolasi dengan metode agar cawan dan pengenceran, ada suatu cara isolasi yang disebut dengan isolasi sel tunggal. Sel mikroba yang dapat dilihat dengan perbesaran 100 kali atau kurang, setiap selnya dapat dipisahkan dan diambil dengan menggunakan pipet kapiler yang sangat



halus, kemudian dicuci beberapa kali di dalam medium steril untuk menghilangkan mikroba kontaminan yang ukurannya lebih kecil.

### **C. Fermentasi**

Fermentasi adalah proses yang dilakukan oleh mikroorganisme baik melalui proses aerobik ataupun anaerobik yang menyebabkan terjadinya perubahan kimia spesifik dari suatu substrat organik dan menghasilkan produk yang bernilai ekonomis (Pelczar and Chan, 1988).

Dalam proses fermentasi mikroorganisme, pemilihan medium sangat penting terhadap keberhasilan proses fermentasi karena medium menyediakan nutrisi untuk pertumbuhan, energi, zat pembangun sel, dan substrat biosintesis selama fermentasi. Medium yang digunakan untuk menumbuhkan fungi mengandung sumber karbon (umumnya glukosa), sumber nitrogen (umumnya ammonia atau nitrat terkadang asam amino), fosfat, sulfat, magnesium, potassium, dan unsur mikro seperti besi, mangan, zink, tembaga. Dan sebagai tambahan, terkadang juga ditambahkan bahan alam pada medium seperti air rendaman jagung, ekstrak khamir, jus buah-buahan, dan protein terhidrolisa (Pelczar and Chan, 1988).

Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam proses fermentasi adalah: a) Kecepatan aerasi sering tidak sesuai dengan jumlah oksigen yang dibutuhkan dan oksigen yang terlarut dalam media. Hal ini dapat diatasi dengan penggunaan detektor untuk mengontrol oksigen yang terlarut; b) Jumlah sumber karbon dan nutrisi lain harus sesuai baik dalam

jumlah dan komposisi dengan mikroba dan produk yang diinginkan; c) Toksin yang terakumulasi dan dapat menghambat pertumbuhan; d) Perubahan pH selama proses fermentasi. Hal ini dapat diatasi dengan melakukan titrasi pH selama fermentasi berlangsung; e) Busa yang mungkin timbul. Busa dapat disebabkan oleh : kandungan garam, pH, suhu, komposisi media, aliran udara, agitasi, dan penambahan antibusa yang berlebihan. Anti busa yang ditambahkan dalam media fermentasi dapat mengurangi jumlah oksigen yang terlarut media. (Purwanto, 2010)

Ada beberapa metode yang dapat digunakan dalam proses fermentasi mikroorganisme antara lain (Purwanto, 2010) :

a. Fermentasi permukaan (*surface fermentation*)

Metode ini dilakukan dengan cara menginokulasikan spora atau miselium fungi ke dalam medium. Miselium akan tumbuh diseluruh permukaan medium cair dan membentuk suatu koloni bervariasi. Metode ini merupakan metode yang paling mudah dan murah, tetapi memiliki beberapa kerugian yaitu pertumbuhan fungi yang tidak homogen (koloni terdiri dari beberapa miselium yang pertumbuhan dan lingkungan tumbuhnya berbeda. Miselium yang berada diatas permukaan koloni bersifat lebih aerobik dibandingkan yang berada dibawah permukaan koloni.

b. Fermentasi terendam (*submerged fermentation*)

Pada metode ini spora atau miselium diinokulasikan ke dalam medium kemudian dikocok sehingga pertumbuhan akan tampak pada

seluruh medium. Kelebihan metode ini dibandingkan dengan metode kultur permukaan yaitu pemanfaatan medium oleh mikroorganisme lebih efisien, mempercepat pertumbuhan dan pertumbuhannya lebih homogen.

c. Fermentasi dengan pengocokan dan pengaliran udara (*stirred aerate fermentation*)

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

d. Fermentasi berkelanjutan (*continuous fermentation*)

Metode ini menggunakan fermentor yang berfungsi untuk mengganti medium fermentasi yang lama dengan medium fermentasi yang baru secara berkala yang dapat menyebabkan proses fermentasi akan terus berlangsung. Metode ini akan sangat bermanfaat karena dengan menjaga ketersediaan medium baru kita dapat menjaga proses fermentasi hingga tahapan yang diinginkan.

Pertumbuhan mikrobia di dalam media terjadi melalui 4 tahap, yaitu :

a) Fase Lag, merupakan fase adaptasi, fase penyesuaian mikroba pada lingkungan baru. Ciri fase lag adalah tidak adanya peningkatan jumlah sel, tetapi hanya terjadi peningkatan ukuran sel. Lama fase lag tergantung pada kondisi dan jumlah awal mikrobia dan media pertumbuhan; b) Fase

Log/eksponensial, mikroba tumbuh dan membelah dengan kecepatan maksimum, tergantung pada genetika mikrobia, sifat media, dan kondisi pertumbuhan; c) Fase stasioner, pertumbuhan mikroba terhenti dan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang membelah dan sel yang mati. Pada fase ini terjadi akumulasi buangan yang toksik; d) Fase kematian, jumlah sel yang mati meningkat. Faktor penyebabnya adalah ketidak-tersediaan nutrisi dan akumulasi produk toksik.

### **Media fermentasi**

Secara umum, harus tersedia semua nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroba untuk memperoleh energi, pertumbuhan, bahan pembentuk sel dan biosintesis produk-produk. Dalam pemeriksaan laboratorium mikrobiologi penggunaan media sangat penting untuk isolasi, identifikasi maupun diferensiasi. Media merupakan kumpulan zat makanan (nutrisi) yang digunakan untuk pertumbuhan mikroba dengan syarat-syarat tertentu.

Berdasarkan komposisinya, media dibedakan menjadi 3, yaitu : a) Media sintetik. Media ini komposisinya tertentu dan diketahui, serta berasal dari bahan kimia; b) Media semi sintetik. Media ini sama dengan media sintetik, hanya ditambah dengan bahan-bahan tertentu yang jumlahnya diketahui tetapi komposisinya tidak pasti, seperti ekstrak yeast, *bacto pepton*; c) Media kompleks. Media ini tidak mempunyai komposisi yang tetap dan sama dari *batch* ke *batch*. Contoh media

golongan ini adalah *corn steep liquor*, *soya bean meals*, molase, dan hidrolisat amilum (McNeil and Harvey, 2008).

Menurut konsistensinya, media dibedakan menjadi 3 macam, yaitu:

- a) Media cair, contohnya media gula, media kaldu, media pepton, dan kaldu darah;
- b) Media semi padat, contohnya antara lain SSS (*Semi Solid Sucrose*), *Corry & Blair medium*, dan *Fletcher's medium*;
- c) Media padat, pada media padat digunakan suatu bahan pembeku (*solidifying agent*) supaya media dapat memadat, contohnya adalah agar (Pratiwi, 2008).

Melalui media fermentasi ini, dapat dilakukan optimalisasi produksi untuk memperoleh komposisi media produksi yang cocok dalam menghasilkan suatu senyawa yang bersifat antimikroba. Salah satu caranya adalah dengan melakukan variasi media fermentasi, baik dari sumber C, sumber N, mineral, vitamin, dan induser.

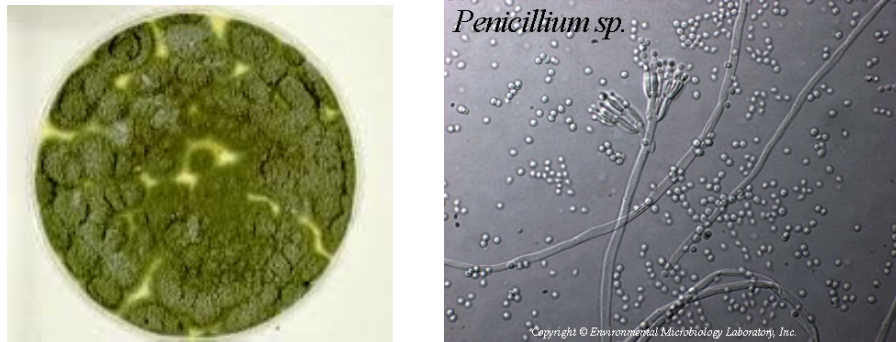
Dalam proses fermentasi mikroorganisme, pemilihan medium sangat penting terhadap keberhasilan proses fermentasi karena medium menyediakan nutrisi untuk pertumbuhan, energi, zat pembangun sel, dan substrat biosintesis selama fermentasi. Medium yang digunakan untuk menumbuhkan fungi mengandung sumber karbon (umumnya glukosa), sumber nitrogen (umumnya ammonia, nitrat, asam amino), fosfat, sulfat, magnesium, potassium, dan unsur mikro seperti besi, mangan, zink, tembaga. Dan sebagai tambahan, terkadang juga ditambahkan bahan alam pada médium seperti air rendaman jagung, ekstrak khamir, jus buah-buahan, dan protein terhidrolisa (Fardiaz, 1988; Pelczar and Chan, 1988).

Penelitian yang dilakukan Acikel et al (2011) menyatakan bahwa kondisi optimum untuk produksi lipase oleh *R. delemar* belum dijelaskan secara rinci dan dilakukan penelitian yang dalam kaitannya dengan komposisi medium pertumbuhan, termasuk pemilihan inducer atau surfaktan optimum, dan kondisi fermentasi, seperti kuantitas inducer dan surfaktan, dan pengadukan serta tingkat aerasi.

Nitrogen merupakan bioelement penting yang dibutuhkan oleh banyak mikroorganisme selama fermentasi untuk sintesis protein. Demikian pula, sumber karbohidrat yang dibutuhkan sebagai sumber energi untuk respirasi untuk melepaskan energy yang dibutuhkan untuk pertumbuhan. Pengurangan pasokan karbohidrat akan menurunkan pertumbuhan jamur. (Ul-haq et al, 2008).

Penambahan zat inducer juga telah banyak digunakan untuk menstimulasi pertumbuhan mikroba endofit dalam memproduksi senyawa bioaktif sebagai hasil metabolisme sekunder (Gumbira, 1987). Zat inducer adalah suatu zat yang memiliki komponen nutrisi yang serupa dengan tanaman inangnya dan merupakan senyawa yg bersifat menginduksi sistem biosintesis produk enzim. Penelitian Simanjuntak dkk (2002) menunjukkan bahwa dengan penambahan serbuk kayu tanaman *Cinchona succirubra* sebagai inducer terhadap produksi senyawa kuinina oleh mikroba endofit memberikan pengaruh yang sangat baik dengan peningkatan produksi 2,2 kali lipat.

## D. *Penicillium*



Gambar 1. *Penicillium* sp

### Klasifikasi:

- Kingdom : Fungi
- Kelas : Deuteromycetes
- Bangsa : Eurotiales
- Suku : Trichocomaceae
- Genus : *Penicillium*

*Penicillium* merupakan genus dari ascomycetes yang berperan penting dalam lingkungan hidup dan produksi makanan dan obat-obatan. Kelompok dari genus ini menghasilkan penisilin, sebuah molekul yang digunakan sebagai antibiotik, yang membunuh atau menghentikan pertumbuhan beberapa jenis bakteri di dalam tubuh.

Koloni yang cepat tumbuh, berwarna hijau kadang putih. Secara mikroskopis konidia bersel tunggal (ameroconidia). Untuk identifikasi, isolat diinokulasi dalam media PDA dan di inkubasi pada suhu 25°C. sebagian besar menghasilkan spora dalam waktu 7 hari. Pertumbuhan

Penicillium masih dapat terjadi di dalam ruangan bahkan jika kelembaban relatif rendah, asalkan ada kelembaban yang cukup tersedia pada permukaan yang diberikan.

## **E. Antibakteri**

### **1. Uraian Umum**

Bakteri merupakan mikroorganisme yang bersifat uniseluler yang termasuk kelas schizomycetes. Sifat-sifat bakteri yang dapat dicatat antara lain : ada yang hidup bebas, parasit, saprofit atau sebagai patogen pada manusia, hewan dan tumbuh-tumbuhan, beberapa diantaranya bersifat fotosintetik.

#### **a. Bakteriostatik**

Zat atau bahan yang dapat menghambat atau menghentikan pertumbuhan mikroorganisme (bakteri). Dalam keadaan seperti ini jumlah mikroorganisme menjadi stasioner, tidak dapat lagi bermultiplikasi dan berkembang biak. Contoh sulfonamida, tetrasiklin, kloramfenikol, dan eritromisin.

#### **b. Bakteriosida**

Zat atau bahan yang dapat membunuh mikroorganisme (bakteri). Dalam hal ini jumlah mikroorganisme (bakteri) akan berkurang atau bahkan habis, tidak dapat lagi melakukan multiplikasi atau berkembang biak. Contoh penisilin, sefalosporin, dan neomisin (Djide, M. N.dan Sartini, 2008).



## 2. Uraian Bakteri

### a. *Staphylococcus aureus*

#### **Klasifikasi**

Domain : Bacteria

Phylum : Firmicutes

Class : Bacilli

Ordo : Bacillales

Familia : Staphylococcaceae

Genus : Staphylococcus

Spesies : *Staphylococcus aureus*

(Garrity, *et al.*,2004)

**Sifat dan morfologi.** *Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif. Sel-sel berbentuk bola, berdiameter 0,5 – 1,5 µm, terdapat dalam tunggal dan berpasangan dan secara khas membelah diri pada lebih dari satu bidang sehingga membentuk gerombolan yang tak teratur. Non motil. Tidak diketahui adanya stadium istirahat. Dinding sel mengandung dua komponen utama yaitu peptidoglikan dan asam teikoat yang berkaitan dengannya. Kemoorganotrof. Metabolisme dengan respirasi dan fermentatif. Anaerob fakultatif, tumbuh lebih cepat dan lebih banyak dalam keadaan aerobik. Suhu optimum 35°C – 40°C. Terutama berasosiasi dengan kulit, dan selaput lendir hewan berdarah panas. Kisaran inangnya luas, dan banyak galur merupakan patogen potensial (Pelczar *et al*, 2008).

## **b. *Escherichia coli***

### **Klasifikasi**

Domain : Bacteria  
Phylum : Proteobacteria  
Class : Gammaproteobacteria  
Ordo : Enterobacteriales  
Familia : Enterobacteriaceae  
Genus : *Escherichia*  
Spesies : *Escherichia coli*

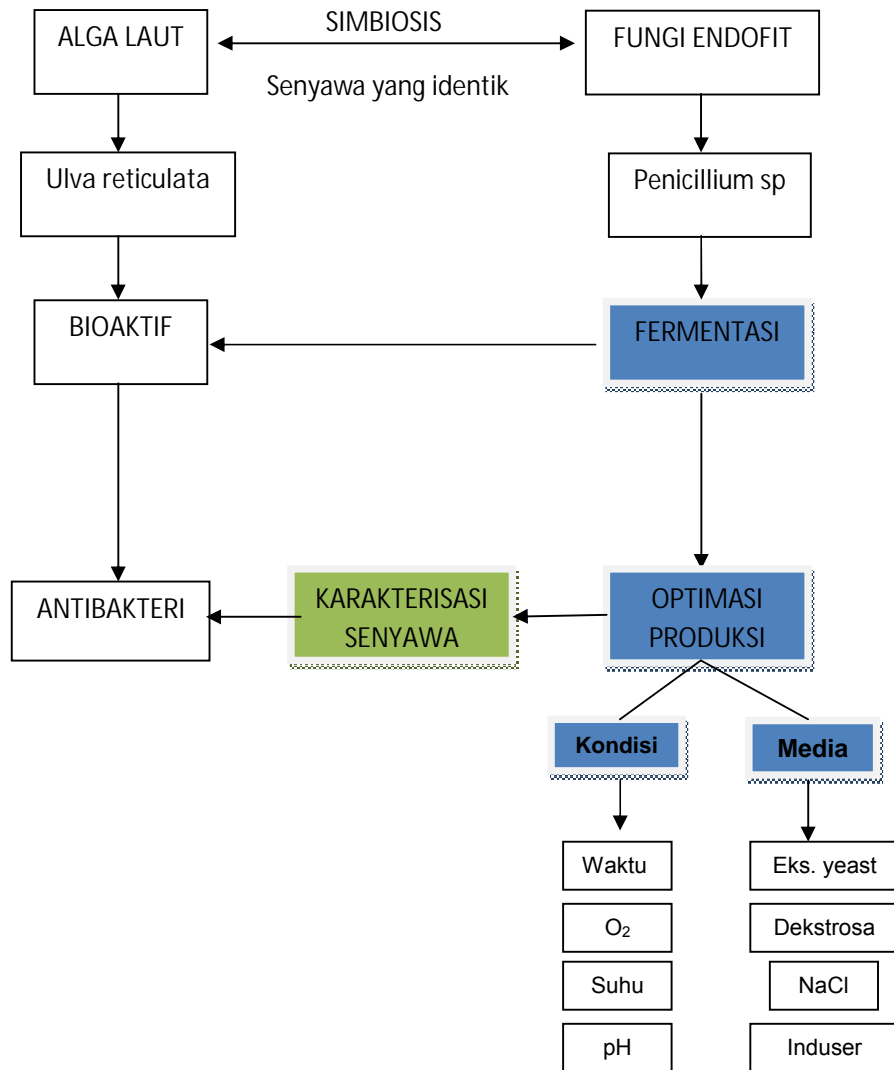
(Garrity, *etal.*, 2004)

### **Sifat dan Morfologi** (Brooks, *et al.* 2001, Pelczar and Chan, 1998)


Berbentuk batang lurus, berukuran 1,1-1,5 x 2,0-6,0  $\mu\text{m}$ , terdapat dalam bentuk berpasangan atau tunggal, sel-selnya peritrik (flagella secara merata tersebar di seluruh permukaan sel) atau non motil, gram negatif, fakultatif anaerobik dan kemoorganotropik. Memiliki metabolisme tipe fermentatif dan respirasi. Suhu optimum 37°C. Mengandung enterotoksin dan faktor-faktor virulen lainnya termasuk faktor-faktor perpindahan dan faktor kolonisasi.


*Escherichia coli* merupakan flora normal dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. *Escherichia coli* dapat menyebabkan diare dan juga penyebab utama infeksi saluran kencing dan nosokomial termasuk septemia dan meningitis.

## KERANGKA PIKIR



Keterangan:

 = variabel bebas

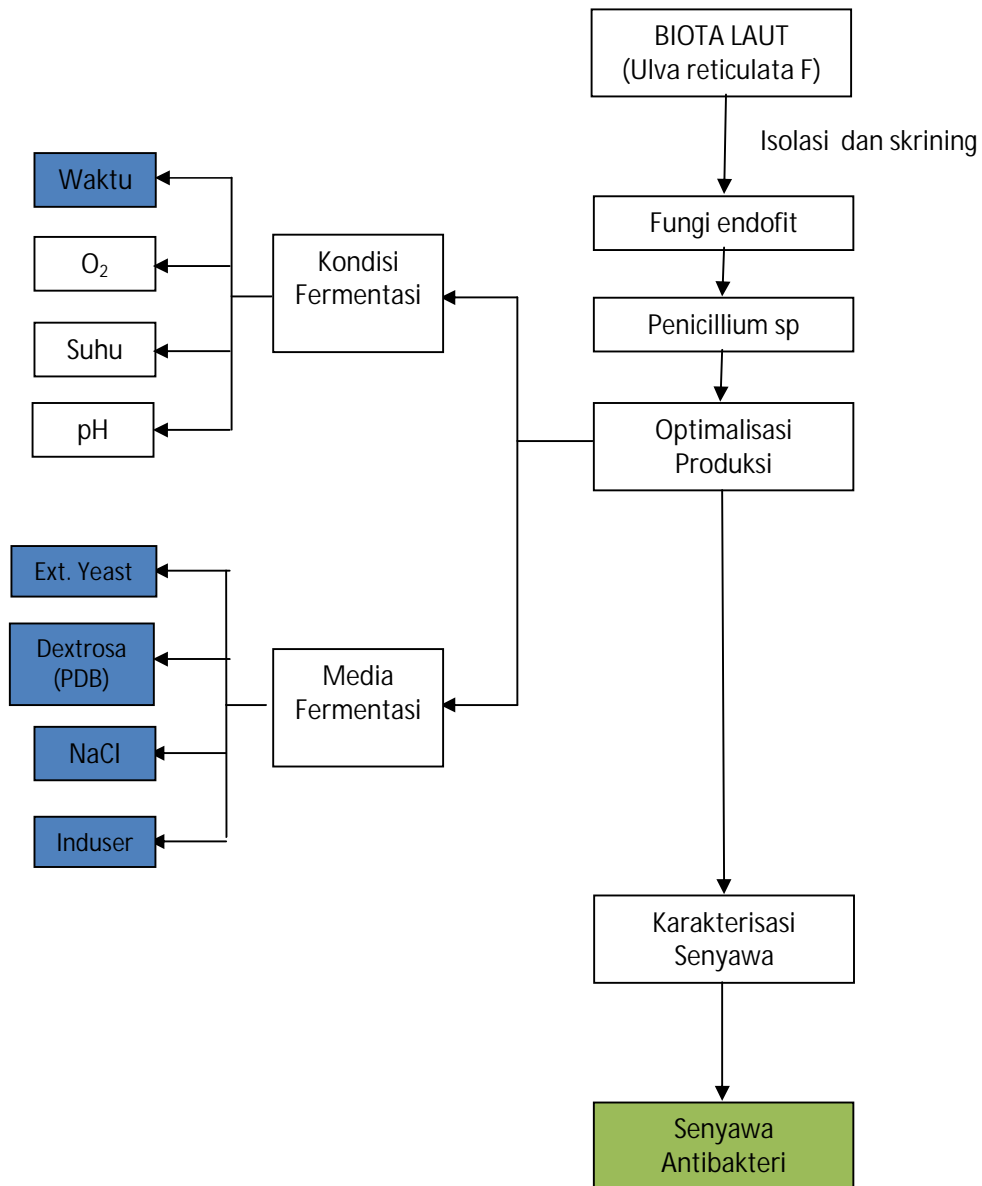
 = variabel tergantung

Gambar 2. Kerangka Pikir Penelitian

## F. Hipotesis

1. Lama fermentasi berpengaruh pada produksi senyawa antibakteri dari fungi endofit *Penicillium* sp.
2. Produksi senyawa antibakteri dari fungi endofit *Penicillium* sp dapat dioptimalisasikan melalui variasi konsentrasi NaCl, ekstrak yeast, dan infus *Ulva reticulata*.
3. Ada kemiripan komponen kimia yang terdapat dalam fungi endofit *Penicillium* sp dengan ekstrak tanaman *Ulva reticulata*, yang bersifat antibakteri.

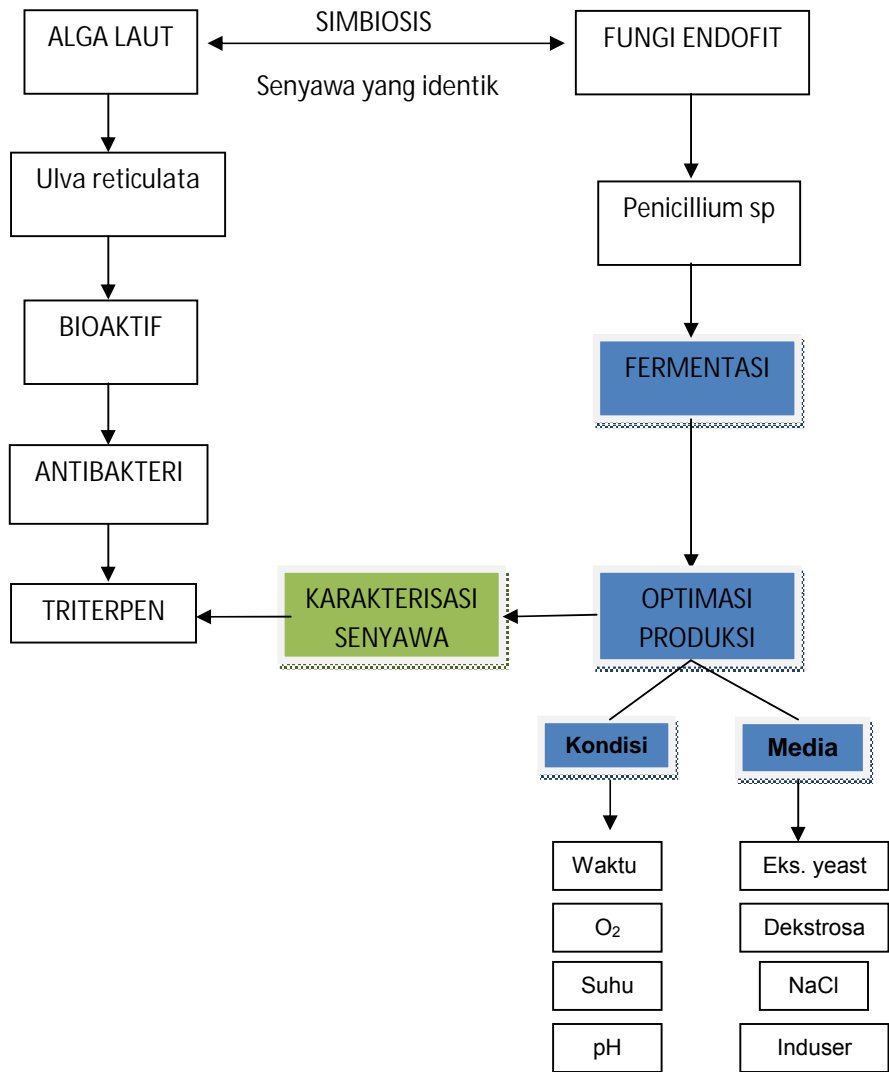
## KERANGKA PIKIR



Keterangan:

= variabel tergantung

= variabel bebas



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dimulai Maret 2013 sampai selesai, penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi, Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi UNHAS, dan Laboratorium Biofarmaka PKP UNHAS.

#### **B. Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan adalah inkubator (Memmert), *Enkas*, LAF (*Laminar Air Flow*), autoklaf (All American), oven (WTB Binder E115), shaker (Gemmy orbit model VRN-480), sonikator (Soniclean), cawan petri, sentrifugator (model DKC-1006T), Erlenmeyer, gelas ukur (Pyrex), jangka sorong (Tricle Brand), jarum ose bulat, lampu spiritus, lemari pendingin (Pannasonic), mikropipet, pinset, tabung sentrifuse, tabung reaksi, timbangan analitik (Chyo), tip.

Bahan-bahan yang digunakan adalah isolat *Penicillum* sp, akuadest, etanol 70 %, kapas, kasa steril, paperdisc (Oxoid), NaCl, medium MHA (*Muller Hilton Agar*), medium PDY (*Potato Dextrose Broth + Extract Yeast*), medium PDB (Potato Dextrosa Broth), medium NA (Nutrient Agar), dan medium Agar.

## C. Prosedur Kerja

### 1. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan, *Penicillium* sp merupakan isolat fungi endofit terpilih dari tanaman *Ulva reticulata* yang telah diisolasi oleh Suryadi (2011).

### 2. Produksi metabolit sekunder dari fungi endofit *Penicillium* sp

Isolat fungi endofit terpilih yaitu *Penicillium* sp yang memperlihatkan aktivitas yang baik terhadap mikroba uji, dilanjutkan pada tahap produksinya.

Tahap-tahapnya sebagai berikut:

#### a. Peremajaan Fungi Endofit

Isolat fungi *Penicillium* sp sebanyak 1 ose digoreskan diatas permukaan medium PDA miring yang telah memadat dan diinkubasi pada suhu kamar (27°C) selama 3-5 hari. Setelah 5 hari, dilakukan pengamatan dengan terbentuknya koloni warna hijau tua.

#### b. Pembuatan Kultur Starter

Isolat fungi yang terbentuk dari medium PDA miring disuspensikan dengan NaCl 0,9% sebanyak 10 ml, kemudian sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam 50 ml medium starter (medium PDY 0,1%, *Potato Dextrosa Broth* dan Ekstrak Yeast 0,1% (lihat lampiran 5)), kemudian di inkubasi pada suhu kamar (27°C) selama 3 hari. Setelah 3 hari, akan terbentuk lapisan putih diatas permukaan medium starter.



### **c. Penentuan Lama Fermentasi Terhadap Produksi *Penicillium sp***

Kultur starter sebanyak 10% v/v diinokulasi ke dalam media produksi (media PDY 0,5%, *Potato Dextrosa Broth* dan Ekstrak Yeast 0,5% (lihat lampiran 5)), lalu di inkubasi pada suhu kamar (27°C) dengan variasi lama fermentasi 3, 5, 7, 9, dan 11 hari. Untuk menentukan lama fermentasi yang optimal dilihat dari diameter zona hambat yang diberikan pada pengujian aktivitas antibakteri.

Secara skematis, prosedur produksi metabolit sekunder dari fungi endofit *Penicillium sp* dapat dilihat pada lampiran 1.

### **d. Pengujian Aktivitas Antibakteri**

- Sebelum dilakukan uji aktivitas antibakteri, hasil fermentasi dari *Penicillium sp* terlebih dahulu di sonikasi selama 5 menit untuk memecahkan massa miselium fungi dan dilanjutkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan freeze dryer. Supernatan kering sebanyak 0,05 g disuspensikan dengan 1 ml aquadest steril kemudian diuji aktivitas antibakterinya.
- Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Sebanyak 20 µL suspensi supernatan hasil fermentasi diteteskan pada *paper disc* kemudian dikeringanginkan hingga kering kemudian diletakkan di atas permukaan medium padat MHA 10 ml yang telah diinokulasi bakteri uji 0,2 ml. Inkubasi selama 24 jam

pada suhu kamar 27°C. Zona bening yang terbentuk di sekitar *paper disc* di amati dan diukur diameter zona hambatnya.

Secara skematis, pengujian aktivitas antibakteri terhadap hasil fermentasi *Penicillium* sp dapat dilihat pada lampiran 3.

### **3. Optimalisasi Media Produksi dari Hasil Fermentasi Fungi Endofit *Penicillium* sp**

#### **a. Pembuatan Media Produksi dengan Variasi Konsentrasi NaCl**

Kultur starter sebanyak 10% v/v diinokulasi ke dalam media produksi (medium PDY 0,5%, *Potato Dextrosa Broth* dan Ekstrak Yeast 0,5%), dengan penambahan NaCl konsentrasi 0 %, 0,5%, 1%, dan 2% lalu di inkubasi pada suhu kamar selama 9 hari. Hasil fermentasi kemudian di sonikasi selama 5 menit dan dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *freeze dryer*. Supernatan kering sebanyak 0,05 g disuspensikan dengan 1 ml aquadest steril kemudian diuji aktivitas antibakterinya untuk melihat konsentrasi NaCl yang memberikan daya hambat terbesar.

#### **b. Pembuatan Media Produksi dengan Variasi Konsentrasi Ekstrak Yeast**

Kultur starter sebanyak 10% v/v diinokulasi ke dalam media produksi (media PDY 0,5%, *Potato Dextrosa Broth* dan Ekstrak Yeast 0,5% serta konsentrasi NaCl yang optimal), dengan penambahan ekstrak yeast dengan konsentrasi 0 %, 0,5%, 1%,

dan 2% lalu di inkubasi pada suhu kamar selama 9 hari. Hasil fermentasi kemudian di sonikasi selama 5 menit dan dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *freeze dryer*. Supernatan kering sebanyak 0,05 g disuspensikan dengan 1 ml aquadest steril kemudian diuji aktivitas antibakterinya untuk melihat konsentrasi ekstrak yeast yang memberikan daya hambat terbesar.

**c. Pembuatan Media Produksi dengan Variasi Konsentrasi Induser (Infus tanaman *Ulva reticulata*)**

Kultur starter sebanyak 10% v/v diinokulasi ke dalam media produksi (media PDY, *Potato Dextrosa Broth* dan konsentrasi Ekstrak Yeast dan NaCl yang optimal), dengan penambahan induser konsentrasi 0 %, 0,5%, 1%, dan 2% (pembuatan infus *Ulva reticulata* 1% v/v dapat dilihat pada lampiran 5) lalu di inkubasi pada suhu kamar selama 9 hari. Hasil fermentasi kemudian di sonikasi selama 5 menit dan dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *freeze dryer*. Supernatan kering sebanyak 0,05 g disuspensikan dengan 1 ml aquadest steril kemudian diuji aktivitas antibakterinya untuk melihat konsentrasi infus tanaman *U. reticulata* yang memberikan daya hambat terbesar.

Secara skematis, pengujian aktivitas antibakteri terhadap hasil fermentasi *Penicillium* sp dapat dilihat pada lampiran 2.

#### **d. Karakterisasi Komponen Kimia**

Karakterisasi komponen kimia dilakukan berdasarkan sifat fisikokimia dengan penampak bercak KLT pada sinar UV 254 nm dan 366 nm, analisis HPLC, dan respon senyawa terhadap berbagai deteksi reagen kimia. Dimana sebagai pembanding yaitu ekstrak tanaman *Ulva reticulata*. Tahap-tahapnya sebagai berikut:

- Sebanyak 5 gram serbuk kering *Ulva reticulata* di maserasi menggunakan pelarut metanol, kemudian diuapkan. Ekstrak metanol yang diperoleh (100 ml) kemudian dipartisi cair-cair menggunakan pelarut heksan yang dilanjutkan dengan etil asetat (perbandingan 1:1). Masing-masing ekstrak kemudian dikeringanginkan hingga kering dan diperoleh masing-masing ekstrak heksan, etil asetat, dan metanol.
- Media produksi optimal sebanyak 1 liter yang telah diinokulasikan sebanyak 100 ml medium starter dan diinkubasi selama 9 hari, kemudian disonikasi selama 10 menit dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 15 menit. Kemudian supernatan yang diperoleh dikeringkan dengan *freeze dryer* hingga diperoleh supernatan kering. Supernatan kering kemudian disuspensikan dengan sedikit air, kemudian di partisi cair-cair dengan pelarut heksan. Lapisan heksan yang diperoleh, selanjutnya dipartisi dengan etil asetat hingga diperoleh lapisan etil

asetat. Masing-masing ekstrak (heksan dan etil asetat) diuapkan hingga kering, kemudian dilakukan karakterisasi komponennya.

- Masing-masing ekstrak (heksan, etil asetat, metanol) tanaman *U. reticulata* dan hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium* sp yang diperoleh kemudian dilakukan karakterisasi komponennya melalui profil KLT, dimana masing-masing ekstrak ditotolkan pada lempeng KLT dan dilihat kemiripan senyawanya dengan adanya noda yang terlihat pada UV 254 nm dan 366 nm serta nilai Rf-nya. Setelah itu dilanjutkan dengan analisis HPLC, untuk melihat kemiripan senyawa yang terbentuk berdasarkan waktu retensinya (Rt).
- Identifikasi komponen kimia dilanjutkan dengan melihat golongan senyawa yang terbentuk menggunakan reagen kimia.

Secara skematis, karakterisasi komponen kimia ekstrak tanaman *U. reticulata* dan hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium* sp dapat dilihat pada lampiran 4.

## BAB IV

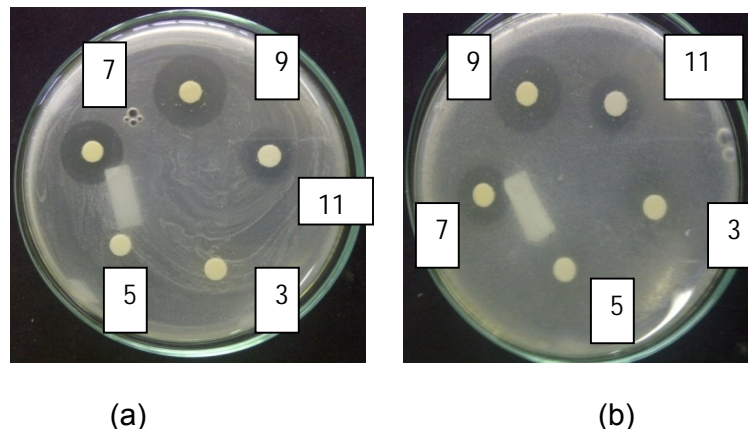
### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Hasil Penelitian

##### 1. Optimalisasi Produksi

###### a. Penentuan lama fermentasi produksi senyawa antibakteri

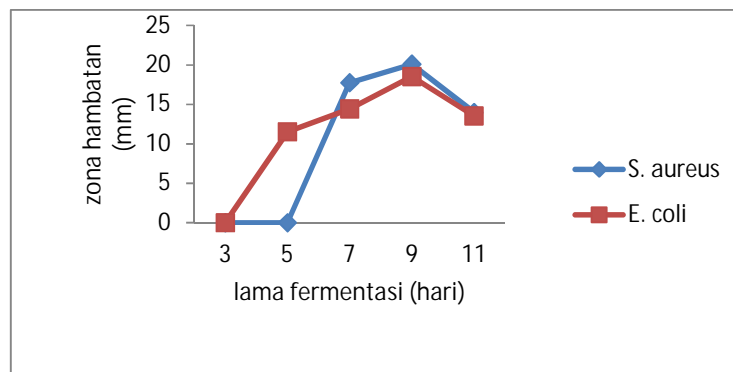
Tujuan penentuan lama fermentasi adalah untuk menentukan lama fermentasi optimal yang menghasilkan metabolit sekunder terbanyak, dengan asumsi bahwa semakin besar daya hambat yang diberikan semakin tinggi metabolit sekunder yang dihasilkan. Media fermentasi yang digunakan mengandung bahan-bahan dasar, yaitu: NaCl 1 %, ekstrak Yeast 0,5% dalam media PDB, suhu fermentasi 25°C. Hasil dapat dilihat pada gambar 3 dan tabel 1.



(a) (b)  
Gambar 3. Hasil pengamatan zona hambat fungi endofit *Penicillium* sp terhadap pengaruh lama fermentasi  
Keterangan: a. *S. aureus* ; b. *E. coli*  
3,5,7,9,11 = lama fermentasi (hari)

Tabel 1. Pengaruh lama fermentasi terhadap produksi senyawa anti-bakteri dari fungi endofit *Penicillium sp.* terhadap bakteri uji

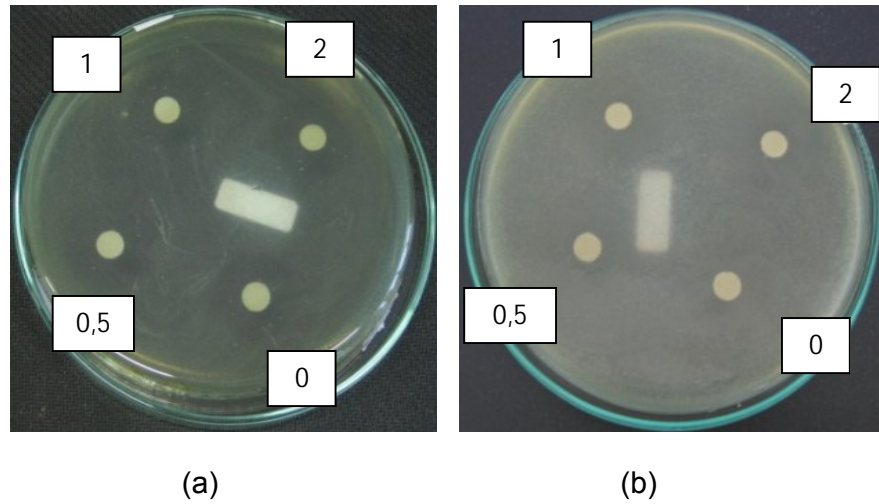
Diameter zona hambatan isolat fungi <i>Penicillium sp</i> terhadap bakteri uji		
Waktu fermentasi (hari)	<i>S. aureus</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)
3	-	-
5	-	11,53
7	17,75	14,43
9	20,1	18,52
11	13,98	13,55



Grafik 1. Pengaruh lama fermentasi terhadap produksi senyawa antibakteri fungi endofit *Penicillium sp.*

- b. Pengaruh NaCl terhadap produksi senyawa antibakteri dari hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium sp.*

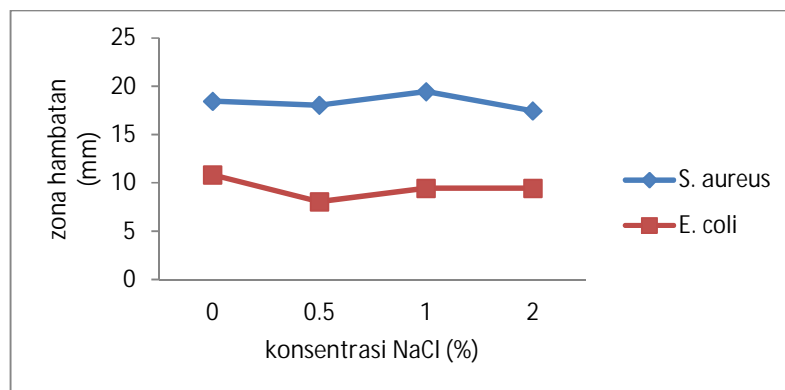
Produksi senyawa antibakteri khususnya biota laut sangat berpengaruh terhadap kandungan garamnya, dalam hal ini adalah NaCl. Oleh karena itu dilakukan pengujian terhadap konsentrasi NaCl terhadap produksi senyawa antibakteri dari isolat fungi *Penicillium sp.* Pada penelitian ini digunakan konsentrasi 0 %, 0,5 %, 1 %, dan 2 % dalam media PDB yang mengandung ekstrak yeast 0,5 %. Suhu fermentasi 25°C (suhu kamar) selama 9 hari. Hasil dapat dilihat pada gambar 4 dan tabel 2.



Gambar 4. Hasil pengamatan zona hambatan hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium sp* terhadap pengaruh konsentrasi NaCl terhadap bakteri uji  
Keterangan: a. *S. aureus* ; b. *E.coli*  
0;0,5;1;2 = konsentrasi NaCl (% b/v)

Tabel 2. Pengaruh konsentrasi NaCl terhadap produksi senyawa antibakteri dari hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium sp*

Diameter zona hambat fungi endofit <i>Penicillium sp</i> terhadap bakteri uji		
NaCl (%)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
0	18,45	10,83
0,5	18,05	8,05
1	19,45	9,45
2	17,45	9,45

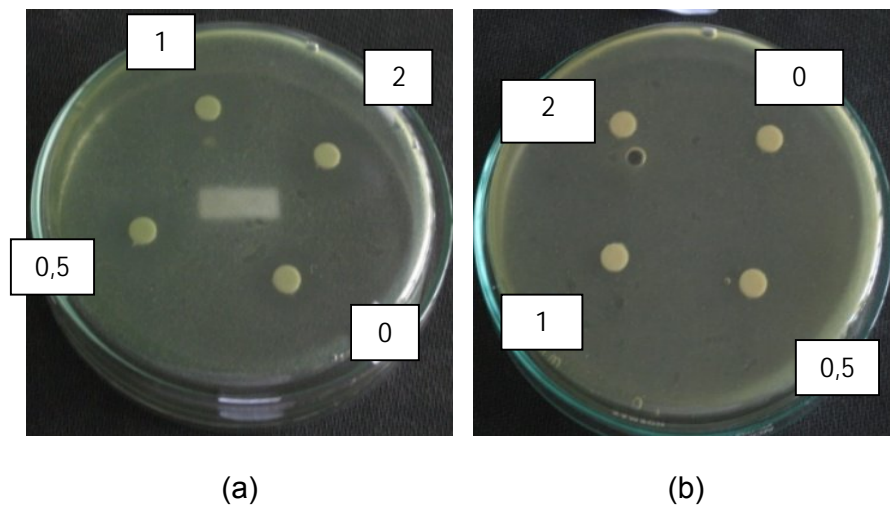


Grafik 2. Pengaruh konsentrasi NaCl terhadap produksi senyawa antibakteri fungi endofit *Penicillium sp*.



- c. Pengaruh ekstrak yeast terhadap produksi senyawa antibakteri dari hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium sp.*

Produksi suatu senyawa antibakteri dari fungi endofit sangat dipengaruhi oleh komposisi media fermentasi, seperti sumber C (karbon), sumber N (nitrogen), dan mineral. Fungi untuk pertumbuhannya membutuhkan sumber N untuk pembentukan asam amino, asam nukleat dan protein, tetapi konsentrasi yang dibutuhkan tidak sebanyak pada bakteri (UI-Haq, dkk. 2008). Pada penelitian ini digunakan sumber N dari ekstrak yeast pada konsentrasi 0%, 0,5%, 1%, dan 2%. Dengan media produksi yaitu NaCl 1% dalam media PDB. Suhu fermentasi 25°C (suhu kamar) selama 9 hari. Hasil dapat dilihat pada gambar 5 dan tabel 3.



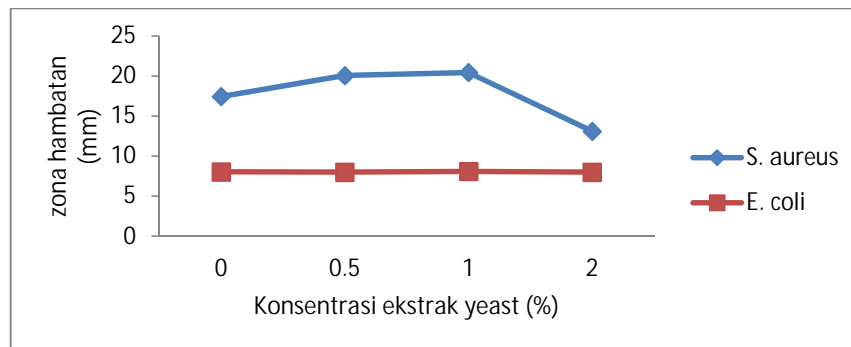
Gambar 5. Hasil pengamatan zona hambat hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium sp* pengaruh konsentrasi ekstrak yeast terhadap bakteri uji

Keterangan: a. *S. aureus* ; b. *E.coli*

0;0,5;1;2 = konsentrasi ekstrak yeast (% b/v)

Tabel 3. Pengaruh konsentrasi ekstrak yeast terhadap produksi senyawa antibakteri dari hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium sp.*

Diameter zona hambat fungi endofit <i>Penicillium sp</i> terhadap bakteri uji		
Ekstrak yeast (%)	<i>S. aureus</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)
0	17,45	8,05
0,5	20,05	8,00
1	20,45	8,10
2	13,10	8,00



Grafik 3. Pengaruh konsentrasi ekstrak yeast terhadap produksi senyawa antibakteri hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium sp*

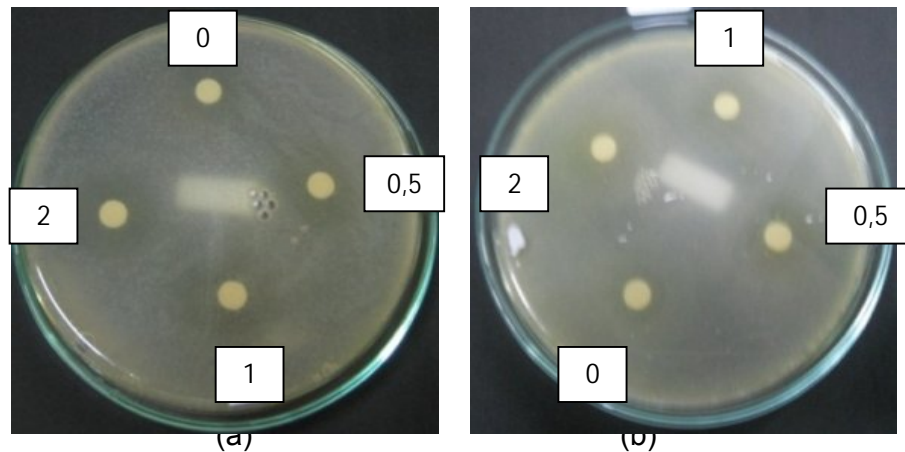
- d. Pengaruh penambahan infus tanaman *Ulva reticulata* terhadap produksi senyawa antibakteri dari hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium sp.*

Untuk menghasilkan enzim penghasil senyawa yang diperlukan dibutuhkan sebuah substrat, yang dalam hal ini adalah induser. Menurut Wang *et al*, induser yang ditambahkan ke dalam media pertumbuhan dapat berupa induser substrat, induser analog substrat, induser produk atau yang berupa koenzim.

Dalam penelitian ini, induser yang digunakan adalah infus tanaman *Ulva reticulata* dengan variasi konsentrasi 0%, 0,5%, 1%,

dan 2% v/v. Suhu fermentasi 25°C dengan lama fermentasi 9 hari.

Hasil penelitian dapat dilihat pada gambar 6 dan tabel 4.



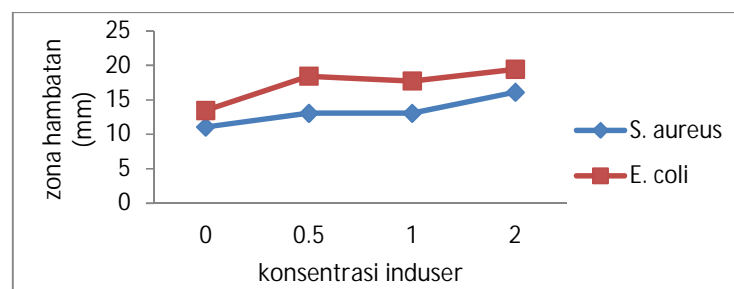
Gambar 6. Hasil pengamatan zona hambat hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium sp* terhadap pengaruh konsentrasi induser terhadap bakteri uji

Keterangan: a. *E. coli* ; b. *S. aureus*

0;0,5;1;2 = konsentrasi induser (% v/v)

Tabel 4. Pengaruh penambahan induser (infus tanaman *U. reticulata*) terhadap produksi senyawa antibakteri dari hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium sp*

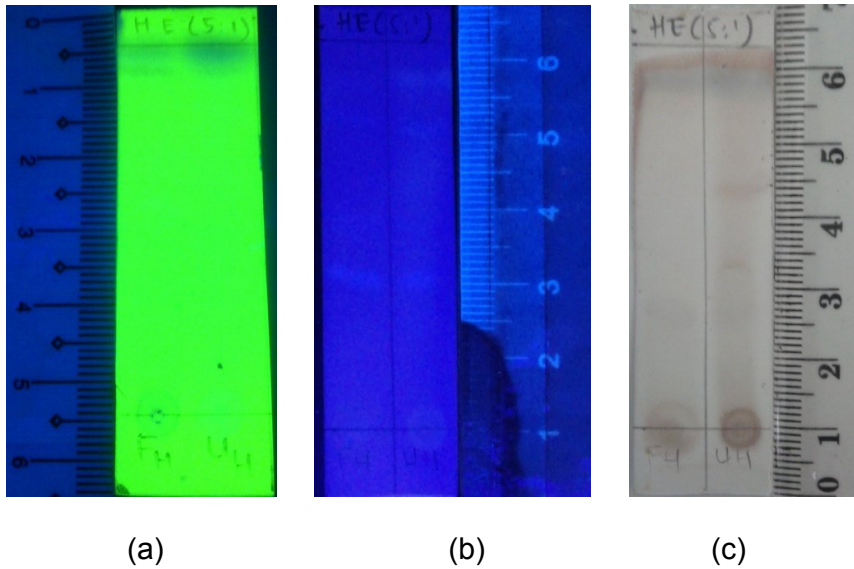
Diameter zona hambat fungi endofit <i>Penicillium sp</i> terhadap bakteri uji		
Induser (% v/v)	<i>S. aureus</i> (mm)	<i>E. coli</i> (mm)
0	11,05	13,45
0,5	13,05	18,45
1	13,05	17,75
2	16,10	19,45



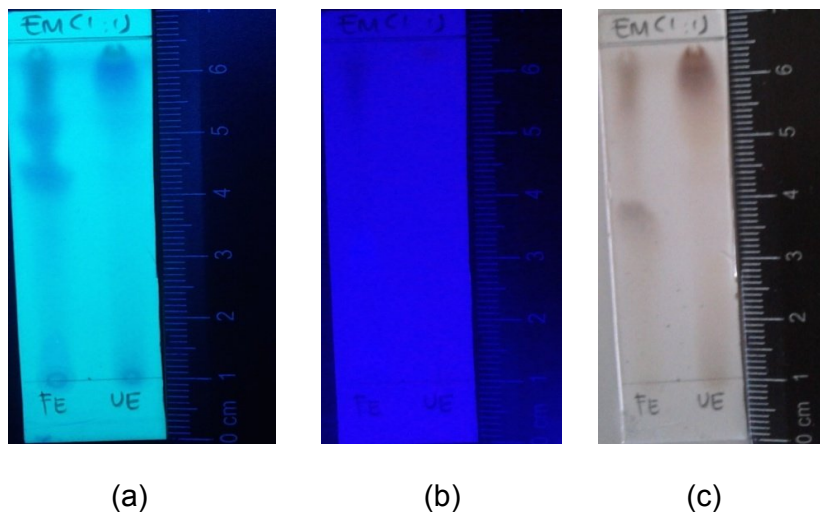
Grafik 4. Pengaruh penambahan induser (infus *Ulva reticulata*) terhadap produksi senyawa antibakteri hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium sp*.

## 2. Karakterisasi Komponen Kimia

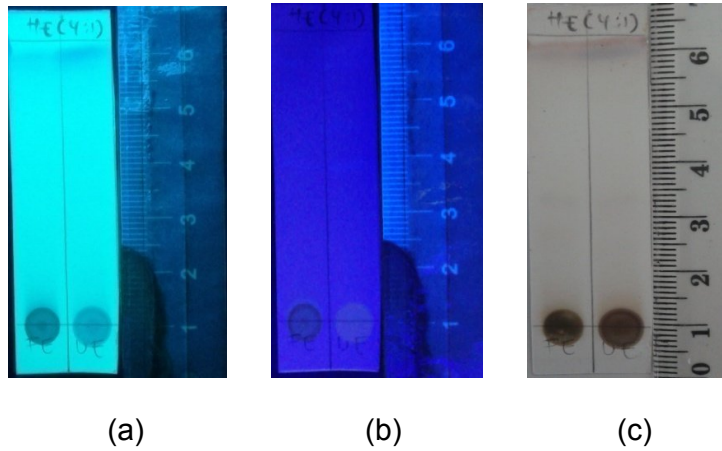
### a. Hasil Profil KLT



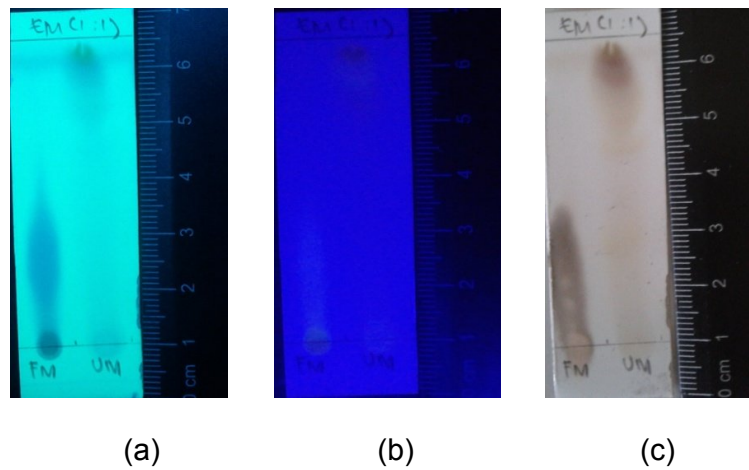
Gambar 7. Perbandingan Hasil Profil KLT ekstrak heksan tanaman dan hasil fermentasi fungi endofit *Ulva reticulata* (Heksan : Etil = 5:1)  
Keterangan: (a) = UV 254 (b) = UV 366 (c) = H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



Gambar 8. Perbandingan Hasil Profil KLT ekstrak etil asetat tanaman dan hasil fermentasi fungi endofit *Ulva reticulata* (Etil : Metanol = 1:1)  
Keterangan: (a) = UV 254 (b) = UV 366 (c) = H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

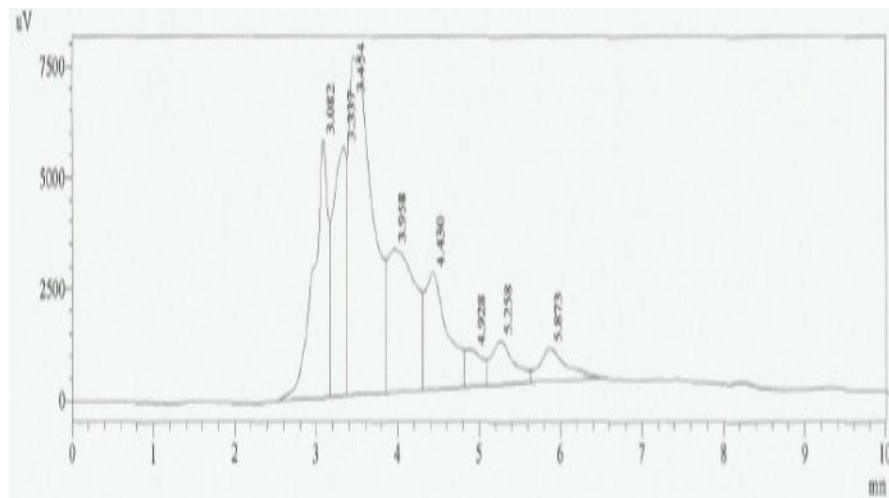


Gambar 9. Perbandingan Hasil Profil KLT ekstrak etil asetat tanaman dan hasil fermentasi fungi endofit *Ulva reticulata* (Heksan : Etil = 4:1)  
Keterangan: (a) = UV 254 (b) = UV 366 (c) = H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

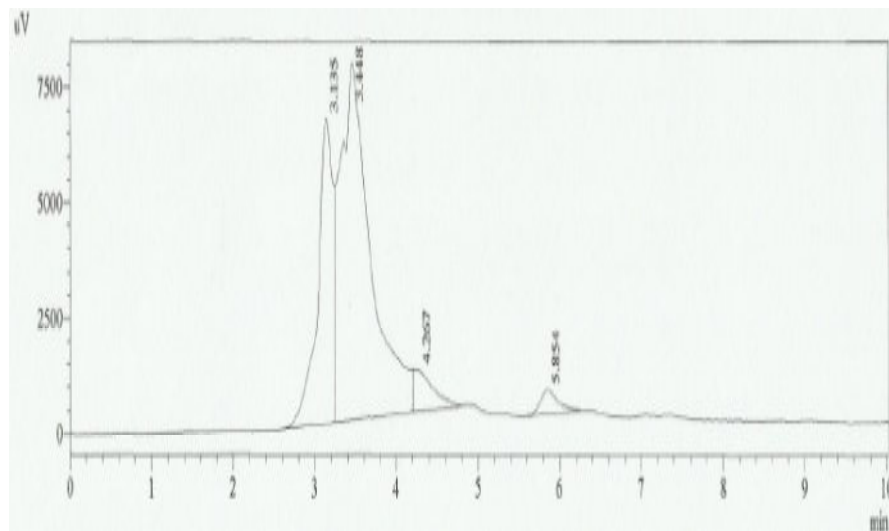


Gambar 10. Perbandingan hasil profil KLT ekstrak metanol tanaman dan hasil fermentasi fungi endofit *Ulva reticulata* (Etil : Metanol = 1:1)  
Keterangan: (a) = UV 366 (b) = UV 254 (c) = H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## b. Hasil Analisis HPLC

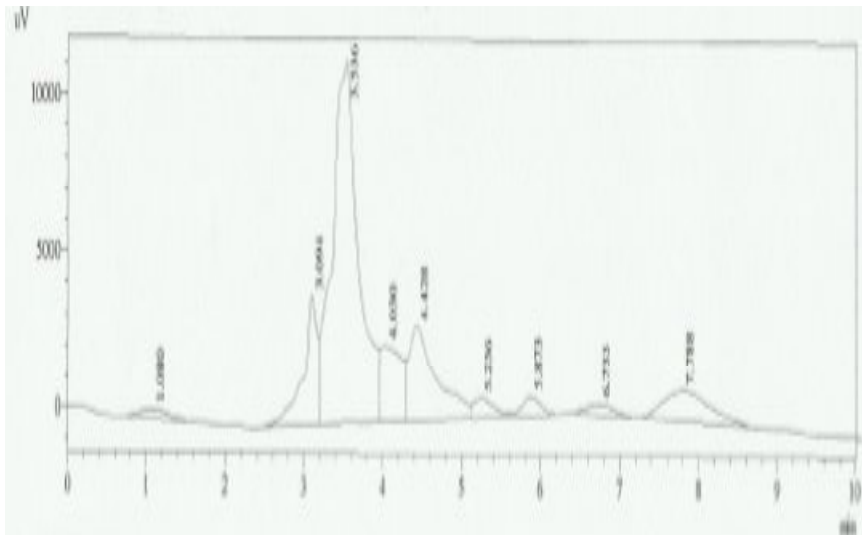


(a)

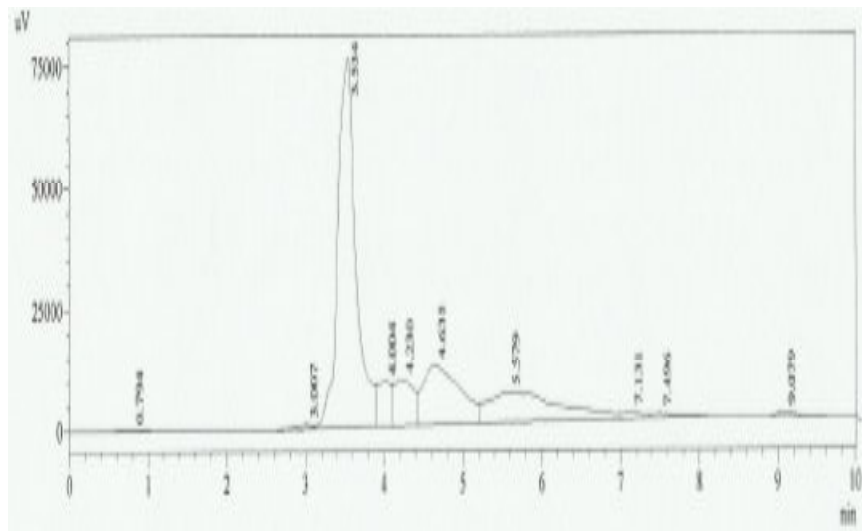


(b)

Gambar 11. Perbandingan hasil analisis HPLC ekstrak heksan tanaman dan hasil fermentasi fungi endofit *U. reticulata*  
Keterangan: (a) tanaman *U. reticulata*  
(b) fungi endofit *Penicillium* sp

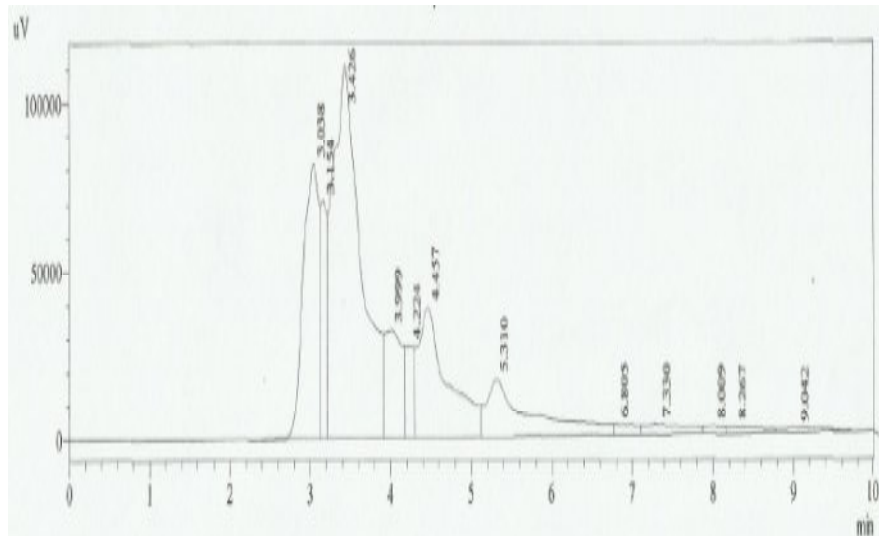


(a)

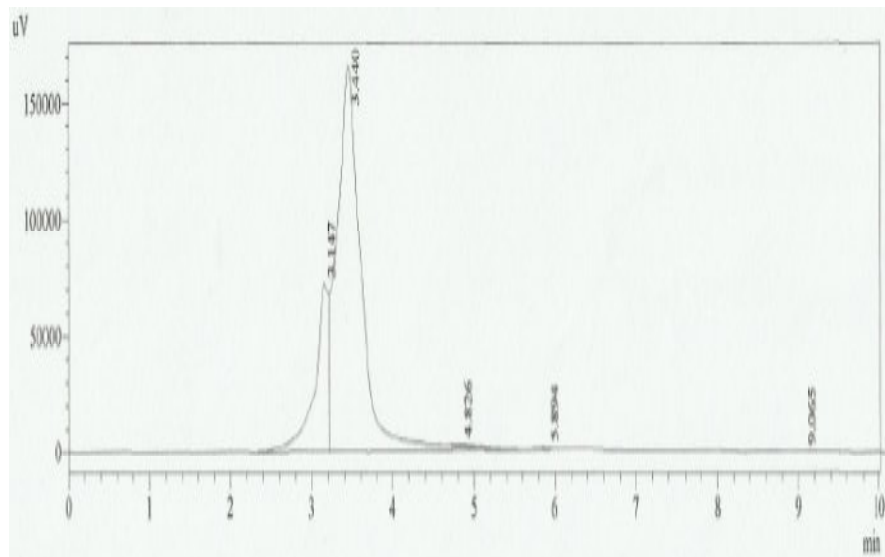


(b)

Gambar 12. Perbandingan hasil analisis HPLC ekstrak etil asetat tanaman dan hasil fermentasi fungi endofit *U. reticulata*  
 Keterangan: (a) tanaman *U. reticulata*  
 (b) fungi endofit *Penicillium* sp



(a)



(b)

Gambar 13. Perbandingan hasil analisis HPLC ekstrak metanol tanaman dan hasil fermentasi fungi endofit *Ulva reticulata*  
 Keterangan: (a) tanaman *U. reticulata*  
 (b) fungi endofit *Penicillium* sp



Tabel 5. Perbandingan Nilai Rt Hasil Analisis HPLC Ekstrak Tanaman dan Hasil Fermentasi Fungi Endofit *Ulva reticulata*

No.	Waktu retensi					
	Ekstrak Heksan		Ekstrak Etil asetat		Ekstrak Metanol	
	T	F	T	F	T	F
1	3.082	3.153	1.080	0.794	3.038	3.147
2	3.337	3.448	3.094	3.007	3.154	3.440
3	3.454	4.267	3.536	3.534	3.426	4.826
4	3.958	5.854	4.030	4.004	3.999	5.894
5	4.430		4.428	4.230	4.224	9.065
6	4.928		5.236	4.635	4.457	
7	5.258		5.873	5.579	5.310	
8	5.873		6.733	7.131	6.805	
9			7.788	7.496	7.330	
10				9.079	8.009	
11					8.267	
12					9.042	

Keterangan: T = ekstrak tanaman *U. reticulata*

F = hasil fermentasi *Penicillium* sp

  = nilai waktu retensi (Rt) yang mendekati

### c. Identifikasi Komponen Kimia

Tabel 6. Hasil Identifikasi Komponen Kimia Ekstrak Tanaman *Ulva reticulata* dan Hasil Fermentasi Fungi Endofit *Penicillium* sp

Ekstrak	Identifikasi Komponen Kimia																			
	Tanaman										Fungi									
	A	Rf	F	Rf	Fl	Rf	K	Rf	T	Rf	A	Rf	F	Rf	Fl	Rf	K	Rf	T	Rf
Heksan	-	-	-	-	+	0,9	-	-	+	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etil Asetat	+	0,5	-	-	+	0,6	-	-	+	0,9	+	0,7	-	-	+	0,7	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0,7	-	-	+	0,6

Keterangan:

A = Alkaloid

F = Fenol

Fl = Flavonoid

K = Kumarin

T = Triterpenoid

(+) = positif

(-) = negatif

## B. Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk: 1) Menentukan lama fermentasi optimal untuk produksi senyawa antibakteri fungi endofit *Penicillium* sp, (2) Menentukan komposisi media produksi yang optimal untuk kandungan senyawa antibakteri dari fungi endofit *Penicillium* sp, dan (3) Mencari kemiripan komponen kimia yang terdapat dalam fungi endofit *Penicillium* sp dan ekstrak tanaman *Ulva reticulata* yang bersifat antibakteri. Metode penelitian yang digunakan adalah *submerged fermentation*, dimana miselium dimasukkan ke dalam medium produksi diselingi dengan pengocokan sehingga pertumbuhannya merata pada seluruh medium (Hamzah dkk, 2009).

Isolat *Penicillium* sp diperoleh dari hasil skrining fungi endofit tanaman *Ulva reticulata* yang dilakukan oleh Suryadi (2011). Dari hasil penelitian sebelumnya, diperoleh 4 jenis isolat yang bersifat antimikroba, yaitu FSUr-1 (*Aspergillus* sp.), FSUr-2 (*Penicillium* sp.), FSUr-3 (*Cladosporium* sp.), dan FSUr-4 (khamir, yeast). Isolat *Penicillium* sp menunjukkan aktivitas antimikroba yang sangat baik terhadap beberapa mikroba uji, yaitu terhadap bakteri (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella thyposa*) berkisar 13-22 mm, dimana kisaran diameter ini memiliki aktivitas yang sangat baik. Sedangkan untuk fungi (*Candida albicans*, *Mallasezia furfur*) memiliki aktivitas yang sangat baik dengan diameter zona hambat 25 mm.

Dari hasil pengukuran diameter zona hambat terhadap beberapa mikroba uji, menunjukkan bahwa aktivitas antimikroba dari isolat *Penicillium* sp sangat baik (Ibtissam, *et al*, 2009). Adapun optimalisasi yang dilakukan menggunakan dua parameter yaitu waktu fermentasi dan media fermentasi. Parameter media fermentasi terbagi atas 3, yaitu (1) NaCl, (2) ekstrak yeast, dan (3) induser, yang digunakan adalah infus dari tanaman *Ulva reticulata*.

Terlebih dahulu dilakukan peremajaan isolat *Penicillium* sp dengan cara diinokulasikan ke dalam medium PDA miring dan diinkubasi selama 3 hari pada suhu kamar. Setelah 3 hari, isolat yang tumbuh kemudian diinokulasikan kembali ke dalam medium PDA di dalam cawan petri dan diinkubasi kembali selama 3-5 hari. Hal ini dilakukan agar diperoleh isolat *Penicillium* sp yang murni dengan warna koloni hijau tua. Hasil pengamatan isolat *Penicillium* sp dapat dilihat pada gambar 17 dan 18.

Setelah diperoleh isolat murni dari *Penicillium* sp, kemudian dibuat kultur starter dengan cara isolat fungi dari media agar disuspensikan sebanyak 1 ose ke dalam 50 ml media starter (medium PDY 0,1%, *Potato Dextrosa Broth* dan Ekstrak Yeast 0,1%), di inkubasi pada suhu kamar selama 3 hari. Kultur starter yang terbentuk memiliki lapisan berwarna putih diatas permukaan medium. Lapisan yang berwarna putih merupakan hasil fermentasi dari *penicillium* sp. Kultur starter inilah yang akan diinokulasikan ke dalam media produksi untuk menentukan lama fermentasi dan media fermentasi yang optimal untuk pertumbuhan fungi

endofit *Penicillium* sp. Hasil pengamatan medium starter dapat dilihat pada gambar 19. Dari medium starter, sebanyak 10%v/v diinokulasikan ke dalam media produksi PDY 0,5% 250 ml untuk dilakukan penentuan lama fermentasi dengan melihat zona hambatan yang terbentuk.

Hasil penelitian sebelumnya (Suryadi, 2011) menunjukkan bahwa waktu fermentasi 7 hari memberikan daya hambat sebesar 19,05 mm untuk *Staphylococcus aureus* dan 15,18 mm untuk *Escherichia coli*. Oleh karena itu, pemilihan lama fermentasi diambil sebelum dan sesudah hari ke-7, yaitu 3, 5, 7, 9, dan 11 hari. Dari tabel 1 dan grafik 1, terlihat bahwa dari hari ke 3 sampai hari ke 9 menunjukkan peningkatan zona hambat terhadap bakteri uji, sedangkan pada hari ke 11, mengalami penurunan. Pada hari ke-3 tidak memberikan daya hambat terhadap kedua bakteri uji, sedangkan pada hari ke-5 hanya bakteri *E. coli* yang memberikan daya hambat sebesar 11,53 mm. Untuk hari ke 7 dan 9, memberikan daya hambat yang tinggi sebesar 17,75 mm dan 20,10 mm untuk *S.aureus* dan 14,43 mm dan 18,52 mm untuk *E.coli*, sedangkan pada hari ke-11 mengalami penurunan daya hambat. Hal ini sesuai dengan fase pertumbuhan mikroba, dimana pada hari ke 9 masuk dalam fase log, di mana mikroba tumbuh dan membelah dengan kecepatan maksimum, sedangkan pada hari ke 11 masuk dalam fase kematian dimana banyak sel yang mati diakibatkan karena ketidakersediaan nutrisi (Pratiwi, 2008).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu fermentasi optimal untuk pertumbuhan *Penicillium* sp adalah hari ke-9. Hal ini dapat dilihat

dari hasil pengujian zona hambat terhadap bakteri uji. Dari hasil tersebut, maka pengujian untuk melihat pengaruh media fermentasi terhadap produksi senyawa antibakteri digunakan lama fermentasi selama 9 hari.

Setelah menemukan lama fermentasi optimal, kemudian dilanjutkan dengan penentuan media fermentasi yang digunakan. Dalam penelitian ini, digunakan beberapa parameter dalam menentukan media fermentasi yang optimal, yaitu NaCl, ekstrak yeast, dan induser (infus *Ulva reticulata*). Penggunaan NaCl dimaksudkan untuk melihat pada konsentrasi berapa metabolit sekunder yang terkandung dalam *Penicillium* sp akan terbentuk dan memberikan pengaruh terhadap senyawa antibakteri yang dihasilkan. Dan dengan konsentrasi tertentu akan bersifat isotonis dalam sel. Fungi untuk pertumbuhannya membutuhkan sumber N untuk pembentukan asam amino, asam nukleat dan protein, tetapi konsentrasi yang dibutuhkan tidak sebanyak pada bakteri (Ul-Haq, dkk. 2008). Sumber nitrogen yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak yeast, karena kandungan ekstrak yeast berupa nitrogen, asam amino yang berpengaruh pada pertumbuhan fungi, dan merupakan media pertumbuhan yang baik untuk bakteri (Ashnaei, P et al, 2007). Diperlukan suatu enzim penginduksi untuk meningkatkan pembentukan senyawa dalam metabolit sekunder, oleh karena itu digunakan infus dari tanaman *Ulva reticulata* yang dapat memberikan pengaruh dalam produksi senyawa antibakteri dari fungi endofit *Penicillium* sp.

Hasil penelitian terhadap pengaruh konsentrasi NaCl 0 %, 0,5 %, 1%, dan 2 % dalam media PDB yang mengandung ekstrak yeast 0,5 %, suhu fermentasi 25°C (suhu kamar) selama 9 hari (dapat dilihat pada gambar 20), sesuai dengan tabel 2 dan grafik 2 menunjukkan bahwa semua konsentrasi memberikan daya hambat terhadap bakteri uji, tak terkecuali pada media produksi yang tidak mengandung NaCl. Hal ini menunjukkan bahwa tanpa adanya NaCl, produksi fungi memiliki aktivitas antibakteri. Pada konsentrasi 0,5% zona hambat terbesar terlihat pada *S. aureus* sebesar 18,05 mm dan pada *Eschericia coli* hanya 8,05 mm. Sedangkan pada konsentrasi 1% menunjukkan daya hambat sebesar 19,45 mm terhadap *S. aureus* dan 9,45 mm terhadap *E.coli* dan merupakan aktivitas antibakteri yang terbesar. Konsentrasi 2% terjadi penurunan aktivitas sebesar 17,45 mm terhadap *S. aureus* dan 9,45 mm terhadap *E.coli*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi 1 % memberikan daya hambat terbesar. Hal ini berarti bahwa dengan penambahan konsentrasi NaCl 1 %, metabolit sekunder yang dihasilkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji, dibandingkan dengan konsentrasi 2%. Hal ini berarti bahwa konsentrasi NaCl 1% bersifat isotonis terhadap *Penicillium* sp, sehingga pada konsentrasi 2% terjadi penurunan aktivitas antibakteri, sehingga semakin besar konsentrasi NaCl yang diberikan akan berpengaruh terhadap metabolit yang dihasilkan oleh *Penicillium* sp.

Konsentrasi NaCl 1 % memberikan daya hambat terbesar dan hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang juga menggunakan konsentrasi NaCl 1% dalam media produksinya. Oleh karena itu, untuk pengujian selanjutnya digunakan konsentrasi NaCl yang optimal yaitu 1%.

Hasil penelitian terhadap pengaruh ekstrak yeast dengan variasi konsentrasi 0 %, 0,5 %, 1 %, dan 2 % dalam media PDB yang mengandung NaCl 1 %, suhu fermentasi 25°C (suhu kamar) selama 9 hari (dapat dilihat pada gambar 21), sesuai dengan tabel 3 dan grafik 3 menunjukkan bahwa setiap konsentrasi memberikan daya hambat terhadap bakteri uji, tidak terkecuali pada media yang tidak mengandung ekstrak yeast. Pada konsentrasi 0,5% dan 1%, daya hambat yang diberikan baik pada *S. aureus* maupun *E.coli* menunjukkan hasil yang hampir sama sebesar 8,05 mm. Sehingga konsentrasi 1% diambil sebagai konsentrasi yang optimal. Pada konsentrasi 2%, terlihat penurunan daya hambat terhadap bakteri uji.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi 1% memberikan daya hambat terbesar. Dengan konsentrasi 1% metabolit yang dihasilkan sudah dapat memberikan zona hambat yang besar terhadap bakteri uji di bandingkan dengan konsentrasi 2%. Hal ini sesuai dengan pernyataan UI-haq dkk, 2008 bahwa fungi dalam pertumbuhannya membutuhkan sumber N untuk pembentukan asam amino, asam nukleat, dan protein dengan konsentrasi yang tidak terlalu besar dibandingkan dengan bakteri.

Penelitian yang dilakukan oleh Sartini (2011), juga memperoleh konsentrasi ekstrak yeast 1% menunjukkan peningkatan aktivitas polifebol oksidase. Menurut Battestin (2007), mikroorganisme membutuhkan sumber nitrogen yang rendah untuk menghasilkan enzim, karena nitrogen merupakan faktor pembatas produksi enzim tertentu.

Untuk pengujian selanjutnya digunakan konsentrasi ekstrak yeast yang optimal yaitu 1% dan juga NaCl 1%.

Hasil penelitian terhadap pengaruh penambahan Infus tanaman *Ulva reticulata* dengan variasi konsentrasi 0 %, 0,5 %, 1 %, dan 2 % (v/v) dalam media PDB yang mengandung NaCl 1% dan ekstrak yeast 1 %, suhu fermentasi 25°C (suhu kamar) selama 9 hari (dapat dilihat pada gambar 21), menunjukkan bahwa penambahan induser (infus *Ulva reticulata*) sangat berpengaruh terhadap produksi senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh fungi endofit *Penicillium sp.* Aktivitas daya hambat terhadap bakteri uji makin meningkat dengan meningkatnya konsentrasi induser. Hal ini berarti bahwa semakin tinggi konsentrasi induser maka semakin tinggi aktivitas antibakterinya. Penelitian yang dilakukan oleh Simanjuntak dkk (2002), menunjukkan bahwa dengan penambahan serbuk kayu tanaman *Cinchona succirubra* sebagai induser terhadap produksi senyawa kuinina oleh mikroba endofit memberikan pengaruh yang sangat baik dengan peningkatan produksi 2,2 kali lipat. Berdasarkan tabel 4 dan grafik 4, konsentrasi 0 % (tidak ada penambahan induser) daya hambat yang diberikan sebesar 13,45 mm, sedangkan pada



konsentrasi 2 % mengalami peningkatan sebesar 19,45 mm atau terjadi peningkatan sebesar 44,61 %. Peningkatan ini mungkin disebabkan oleh beberapa faktor: (1) adanya komponen kimia yang sama dengan fungi dan induser (infus *Ulva reticulata*), (2) adanya sinergisme antara isolat fungi dengan kandungan senyawa yang terdapat dalam infus *Ulva reticulata*. Menurut Tan and Zou (2001) bahwa senyawa yang terdapat dalam tanaman identik dengan senyawa yang terdapat pada fungi endofitnya.

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka diperoleh media fermentasi optimal yang terdiri atas NaCl 1%, ekstrak yeast 1%, dan penambahan induser 2% dalam media PDB. Suhu fermentasi 25°C dengan lama fermentasi 9 hari.

Media fermentasi optimal kemudian diperbanyak produksinya untuk dilakukan karakterisasi komponen kimia, berupa pengamatan pada profil KLT, analisis HPLC, dan penyemprotan reagen kimia. Untuk karakterisasi komponen kimia, akan dibandingkan kemiripan komponen kimia antara hasil fermentasi isolat fungi *Penicillium* sp dengan ekstrak metanol *Ulva reticulata*. Hasil ekstraksi dari partisi tersebut kemudian di analisis komponen kimianya dengan KLT dan HPLC.

Hasil profil KLT menunjukkan bahwa ada kemiripan komponen kimia antara hasil fermentasi isolat fungi *Penicillium* sp dengan ekstrak tanaman *Ulva reticulata*. Untuk itu dilakukan pengujian HPLC, untuk melihat dengan jelas kemiripan komponen kimia dari keduanya.

Hasil analisis HPLC menunjukkan adanya kemiripan waktu retensi (Rt) dari keduanya, baik itu ekstrak etil asetat, heksan, maupun metanol. Hal ini dapat dilihat dari gambar 7-9 dan tabel 5. Tabel 5 menunjukkan perbandingan nilai Rt antara ekstrak tanaman dan hasil fermentasi isolat fungi *Penicillium* sp. Ekstrak heksan, terdapat 3 peak yang memperlihatkan kemiripan nilai Rt masing-masing pada menit ke-3 dan ke-5 yaitu pada tanaman 3,082; 3,454; 5,873 dan pada fungi 3,153; 3,448; 5,854. Ekstrak etil asetat juga terdapat 3 peak yang mirip pada menit ke-3 dan ke-4 yaitu pada tanaman 3,094; 3,536; 4,030 dan pada fungi 3,007; 3,534; 4,004. Ekstrak metanol juga memiliki kemiripan pada 3 peak di menit ke-3 dan ke-9, yaitu pada tanaman 3,426; 3,999; 9,042 dan pada fungi 3,147; 3,440; 9,065. Kemiripan yang ditunjukkan oleh masing-masing ekstrak baik pada tanaman maupun hasil fermentasi fungi endofit menunjukkan bahwa adanya senyawa pada tanaman yang mirip dengan senyawa yang ada pada fungi endofitnya. Hal ini sesuai pernyataan Tan and Zou (2001) bahwa senyawa yang terdapat dalam tanaman identik dengan senyawa yang terdapat pada fungi endofitnya.

Hasil identifikasi komponen kimia yang dilakukan terhadap hasil fermentasi isolat fungi *Penicillium* sp menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid. Berdasarkan literatur, bahwa ekstrak tanaman *Ulva reticulata* juga mendeteksi adanya golongan senyawa triterpenoid (Tamat dkk, 2007).

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### A. Kesimpulan

Dari hasil penelitian diatas, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Lama fermentasi optimal untuk produksi senyawa antibakteri dari fungi endofit *Penicillium* sp adalah 9 hari.
2. Media fermentasi optimal yang memberikan aktivitas antibakteri terbesar adalah NaCl 1%, ekstrak yeast 1%, dan infus *Ulva reticulata* 2% v/v.
3. Komponen kimia yang terdeteksi pada hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium* sp dan ekstrak tanaman *Ulva reticulata* memiliki kemiripan berdasarkan nilai Rt (hasil analisis HPLC). Golongan senyawa yang terdeteksi dalam hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium* sp adalah alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid.

#### B. Saran

1. Perlu dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa aktif hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium* sp.
2. Perlu dilakukan karakterisasi senyawa aktif hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium* sp.

## DAFTAR PUSTAKA

- Acikel, Unsal., Ersan, Mehtap., Acikel, YS. 2011. The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *R. delemar*. *Turk J Biol*, 35 (2011): 35-44. TUBITAK.
- Aruna P, Mansuya P, Sridhar S, Kumar JK, dan Babu S. 2010. Pharmacognostical and Antifungal Activity of Selected Seaweeds from Gulf of Mannar Region. *Science and Technology* 2. 1. pp. 115–119
- Ashnaei, P., Tehrani, S., M, Ahmadzadeh., K, Behboudi. 2007. Effect of carbon and nitrogen sources on growth and biological efficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of bean damping-off. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 72(4): 951-6.
- Bacon CW, Saikkonen K, Joshi NV, Raghumar C, dan Johri BN. What is an endophytic fungus. *Current Science*. 2006. Vol.90, No.10. pp. 1309.
- Battestin, V and Maedo, G.A. 2007. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology*. 98: 1832-1837.
- Brooks, GF., Butel, SJ., and Morse SA. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan oleh Bagian Farmakologi FK-UNAIR. 2005. Penerbit Salemba Medika. Jakarta. pp. 224, 235.
- Buchanan RE dan Gibbons NE. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8<sup>th</sup> ed. The Williams and Wilkins Company. Baltimore. pp. 290,292.
- Del Val AG, Platas G, Basilio A, Cabello A, Gorrochategui J, Suay I, Vicente F, Portillo E, Del Rio MJ, Reina GG, dan Pelaez F. 2001. Screening of Antimicrobial Activities in Red, Green, and Brown Macroalgae from Gran Canaria Spain. *Journal of International Microbiology*. Vol. 4. pp. 35 – 40
- Djide, M.N dan Sartini. *Dasar-dasar mikrobiologi farmasi*. Lembaga Penerbitan Unhas (Lephas). Makassar. 2008. pp. 34.
- Faeth, S.H., 2002, Are endophytic fungi defensive plant mutualist?, *Oikos*, 98, 25-36.

- Fardiaz S. *Fisiologi Fermentasi*. Lembaga Sumber Daya Informasi IPB. Bogor. 1988. pp.105-107.
- Garrity. G. M., Bell. J. A. and Lilburn. T.G, 2004. *Taxonomic Outline of The Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2th Edition, United States of America, Springer, New York Berlin Hendelberg.
- Gumbira, S.E., 1987. *Bioindustri Penerapan Teknologi Fermentasi*, edisi I, PT. Mediatayama Sarana Perkasa, Jakarta, 1987, 27
- Hamzah, H.M., Ali, A.H.L., dan Hassan, H.G. 2009. Physiological Regulation of Protease and Antibiotics in *Penicillium* sp, Using Submerged and Solid State Fermentation Techniques. *Journal of Engineering Science and Technology Vol. 4, No. 1*. Pp. 81-89
- Ibtissam C, Hassane R, Jose ML, Fransisco DSJ, Antonio GVJ, Hassan B, dan Mohamed K. 2009. Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of morocco. *African Journal of Biotechnology*. Apr 6. 8(7). pp. 1258-1262
- Karthikaidevi G, Manivannan K, Thirumaran G, Anantharaman P, dan Balasubaramanian T. 2009. Antibacterial properties of selected green seaweeds from Vedalai Coastal Waters; Gulf of Mannar Marine Biosphere Reserve. *Global Journal of Pharmacology* 3. Vol. 2. pp. 107-112
- Kelecom A. 2002. Secondary Metabolites From Marine Microorganisms. *Ann. Brazil Acad. Sci.* Vol 74. pp.151 – 170
- Khurniasari DW. 2004. Potensi Antikanker Senyawa Bioaktif Ekstrak Kloroform dan Metanol Makroalgae *Sargassum duplicatum* J. Agardh. *Skripsi*. Fakultas biologi Universitas Gadjah Mada Jogjakarta. Jogjakarta.
- Kolanjinathan, K and Stella, D. 2011. Comparitive studies on antimicrobial activity of *Ulva reticulata* and *Ulva lactuca* Against Human Pathogens. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*. Vol. 2(6). pp.1738-1744
- Labela PD. *Isolation of biotechnological organism from nature*. Mc.Graw-Hill Publishing Company. New York. 1990. pp.26-29,260.

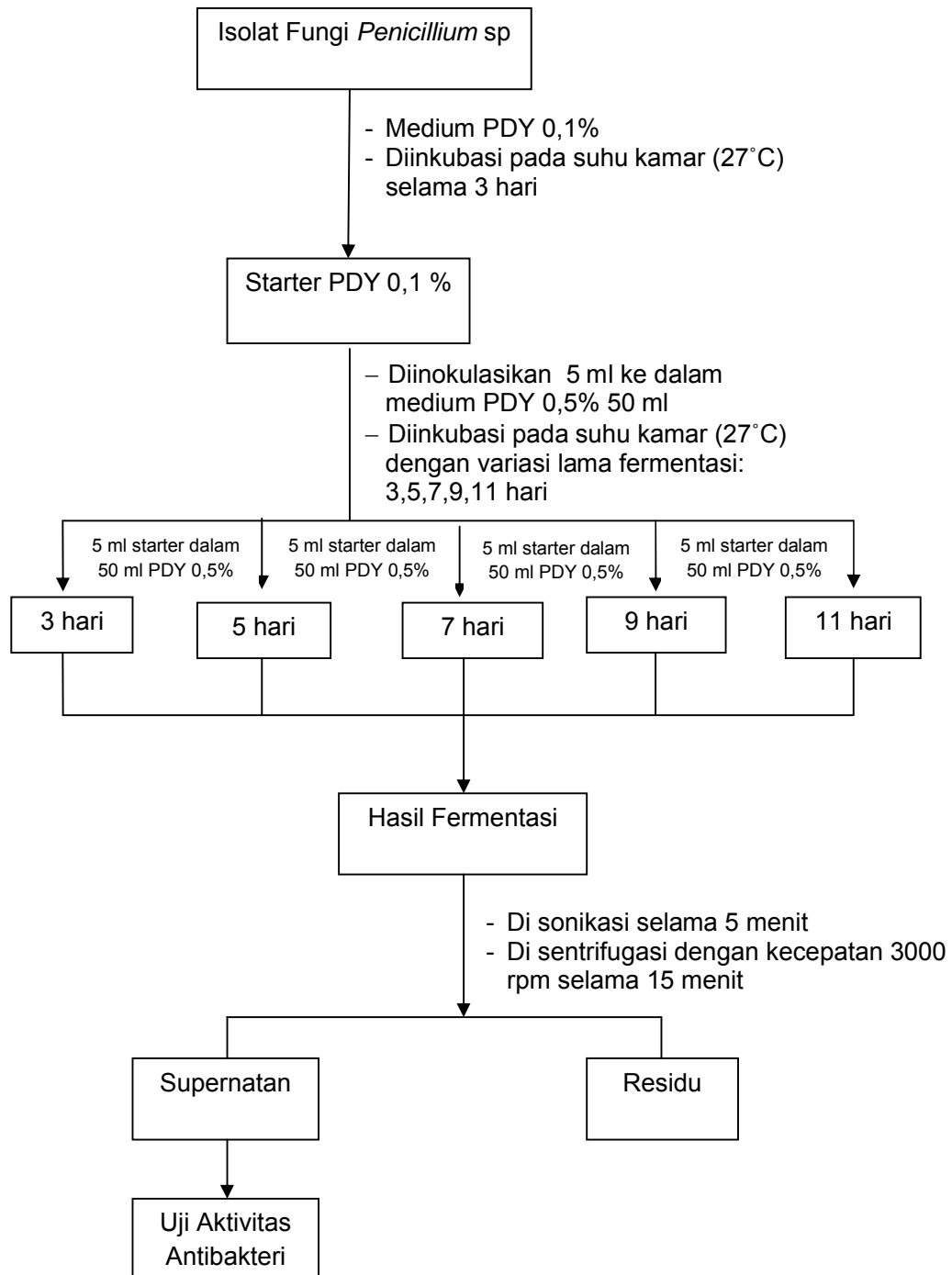
- Leitao, AL. 2009. Potensial of *Penicillium* species in The Bioremediation Field. *International Journal of Environmental Research and Public Health. Int. J. Environ. Res. Public Health.* 9 April 2009. 6. pp. 1393-1417. Available from : [www.mdpi.com/journal/ijerph](http://www.mdpi.com/journal/ijerph)
- Lu H., W.X.Zou, Meng. R.X Hu, J., and Tan. 2000. New Bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *J. Plant Sci.* 151: 76-73
- McNeil, B. and Harvey, L.M., 2008, *Practical Fermentation Technology*, 42, 70-90, 100-101, John Wiley & Son Ltd., England.
- Min Qiu, Rui Sheng, Xie, Yu, Shi, Haihua, Zhang, Chen, Hai-min. 2010. Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. *Ann Microbiol.* 60: 143-150
- Pelczar, MJ and Chan, ECS. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*, Jilid 2, Terjemahan oleh Hadioetomo R.S. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Pimentel, M.R., Molina, G., Dion'isio, A.P. 2011. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compound and Their Application in Biotransformation Process. *Biotechnology Research International*.
- Pratiwi ST. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Penerbit Erlangga. Jakarta. pp. 2, 38, 50-54
- Purwanto. 2011. Isolasi dan identifikasi Senyawa penghambat polimerisasi Hem Dari fungi endofit tanaman *Artemisia annua* I. *Tesis*. Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Yogyakarta.
- Radji, M., 2005, Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2 (3), 113-126.
- Rebecca,L.J., Dhanalakshmi,V., and Sharmila,S. 2012. Effect of Te Extract of *Ulva reticulata* on Pathogenic Microorganism. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.* pp 4875-4878
- Reskika, A. 2011. Evaluasi potensi rumput laut coklat (Phaeophyceae) dan rumput laut hijau (Chlorophyceae) asal Perairan Takalar sebagai antibakteri *Vibrio* spp. *Skripsi*. Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin. Makassar. pp.1-32

- Sartini. 2011. Produksi dan Karakteristik Biokimia Enzim Polifenol Oksidase dari Isolat Terpilih Fungi Endofit Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Tesis*. Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Simanjuntak, P., Parwati, T., Bustanussalam, Prana, T.K., dan Shibuya, H., 2002, Produksi alkaloid kuinina oleh beberapa mikroba endofit dengan penambahan zat induser, *Majalah Farmasi Indonesia*, **13** (1), 1-6.
- Song, Y. 1998. Isolation and Cultivation of Endophytic Fungi, Asian Network on Microbial Researcher, Gadjah Mada university (GMU), Yogyakarta, 1998, 255 – 258
- Strobel G dan Daisy B. 2003. Biosprospecting for microbial endophytes and their natural products microbiology and molecular biology reviews. *Americans Society for Microbiology*. Vol.67 no.4. pp.491-502.
- Strobel, G.A. 2002. Microbial gifts from rain forests. *Can J. Plant Pathol.* 24: 14-20.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., and Harper, J., 2004, *Natural products from endophytic microorganisms*, *Journal of Natural Products*, 67, 257-268.
- Sugijanto, N.E., Indayanto, C., Zaini, N.C. 2004. Isolasi dan Determinasi Berbagai Jamur Endofit dari Tanaman *Aglaia elliptica*, *Aglaia eusideroxylon*, *Aglaia odorata*, dan *Aglaia odoratissima*. *Jurnal penelitian Medika Eksakta*. Vol. 5 No. 2. Hal. 131, 139
- Sukatar A, N Ulku Karabay-Yavszoglu, Guven Ozdemir, dan Zerrin Horsum. 2006. Antimicrobial activity of volatile component and various extracts of *Enteromorpha linza* (Linnaeus) J. Agardh from the coast of Izmir, Turkey. *Annals of Microbiology*.
- Suryadi. 2011. Skrining Fungi Simbion Dari Alga Hijau *Ulva Reticulata* Sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Tamat, S.R., Wiranta, T., Maulina, L.S. 2007. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput laut Hijau *Ulva Reticulata* Forsskal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. pp 31-36
- Tan, R.X. and Zou, W.X., 2001, Endophytes : a rich source of functional metabolites, *Natural Product Reports*, **18**, 448-459.

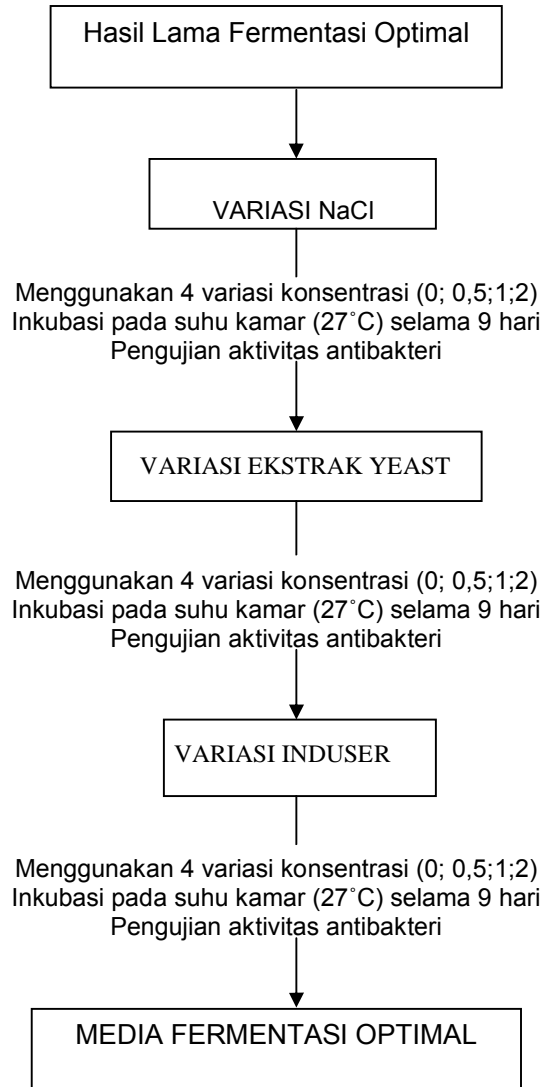
- Tanaka M, Sukiman H, Takebayashi M, Saito K, Suto M, Prana MS, dan Tomita F, 1999. Isolation, Screening and Phylogenetic Identification of Endophytes from Plants in Hokaido Japan and Java Indonesia. *Microbes and Environment*. 14(4): 237-241
- Taskin E, Ozturk M, Taskin E, dan Kurt O. 2007. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African Journal of Biotechnology*. 17 Desember 2007. Vol (6). 24. pp. 2746-2751. Available from : <http://www.academicjournals.org/AJB>.
- Theantana, T., Hyde, I.J., Lumyong, S. 2007. Asparaginase Production by Endophytic Fungi Isolated From Some Thai Medicinal Plants. *KMITL Sci. Tech. J.* Vol. 7.
- Ul-Haq, Ikram., Mukhtar, H., Umber, H. 2008. Fermentation Mediaum Optimization for the Biosynthesis of Protease by *Penicillium chrysogenum* in Shake Flasks. *Pakistan J. Zool.*, Vol. 40(2), pp.69-73.
- Vallinayagam K, Arumugam R, Raja Kannan RR, Thirumaran G dan Anantharaman P. 2009. Antibacterial activity of some selected seaweeds from Pudumadam Coastal Regions. *Global Journal of Pharmacology*. Vol. 3(1). pp. 50-52
- Van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM. 1995. Algae. An Introduction to Phycology. Australia : Cambridge University Press. p. 301, 391-392, 401, 406. Available from : <http://books.google.co.id>
- Wang, Y., Lo, H., and Wang, P., 2008, Endophytic fungi from *Taxus mairei* in Taiwan : first report of *Colletotrichum gloeosporioides* as an endophyte of *Taxus mairei*, *Botanical Studies*, 49, 39-43.
- Wolf, FA and Wolf, FT. *The Fungi*. Hafner Publishing Company. New York. 1969. pp.14-15. Available as PDF file.
- Worang, R.L. 2003. Fungi Endofit Sebagai Penghasil Antibiotika. *Makalah Individu.*, Program Pascasarjana Insititut Pertanian Bogor. Hal. 2
- Yung,P.Y., Burke,C., Lewis, M., Kjelleberg, S., and Thomas, T. 2011. Novel Antibacterial Proteins from the Microbial Communities Associated with The Sponge *Cymbastela Concentric* and The Green Alga *Ulva Australis*. *App Ann Microbiol*. pp 1512-1515
- Zheng L, Xiao TH, Hai MC, Wei L, dan Xiao JY. 2005. Marine Bacteria Associated with Marine MacroorganismsTthe Potential Antimicrobial Resources. *Annals of Microbiology*,5. Vol. 2. pp.119-124



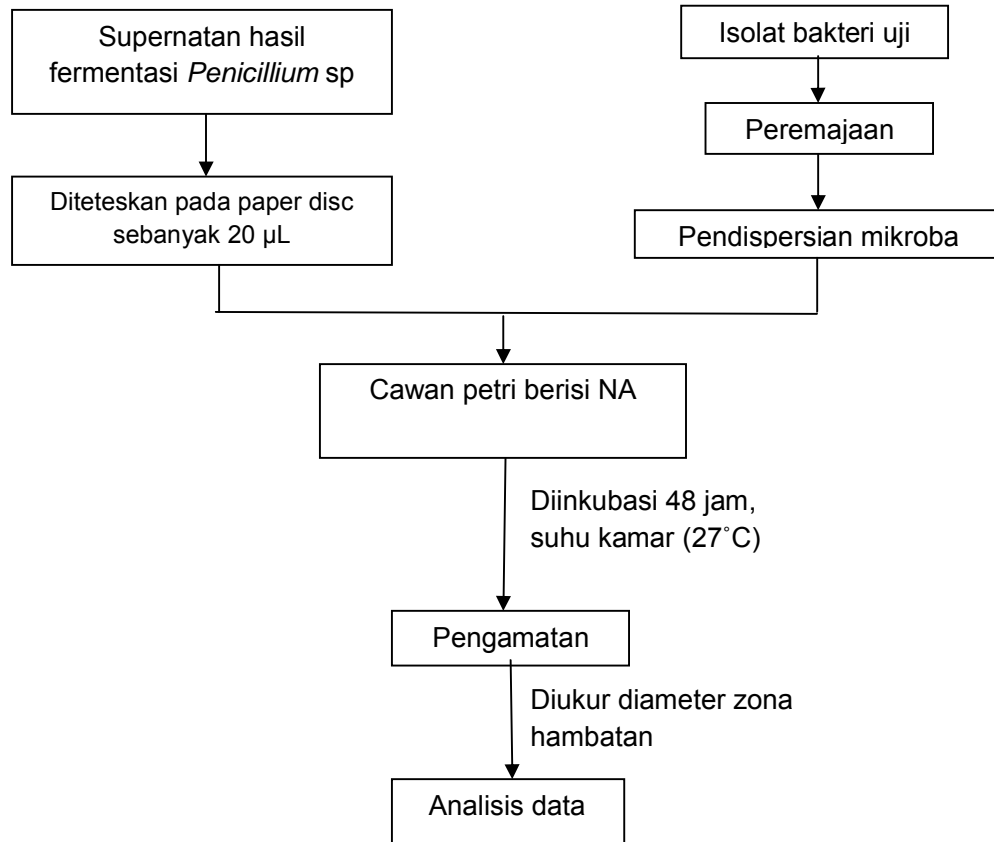
Lampiran 1. Produksi metabolit sekunder dari fungi endofit *Penicillium sp*



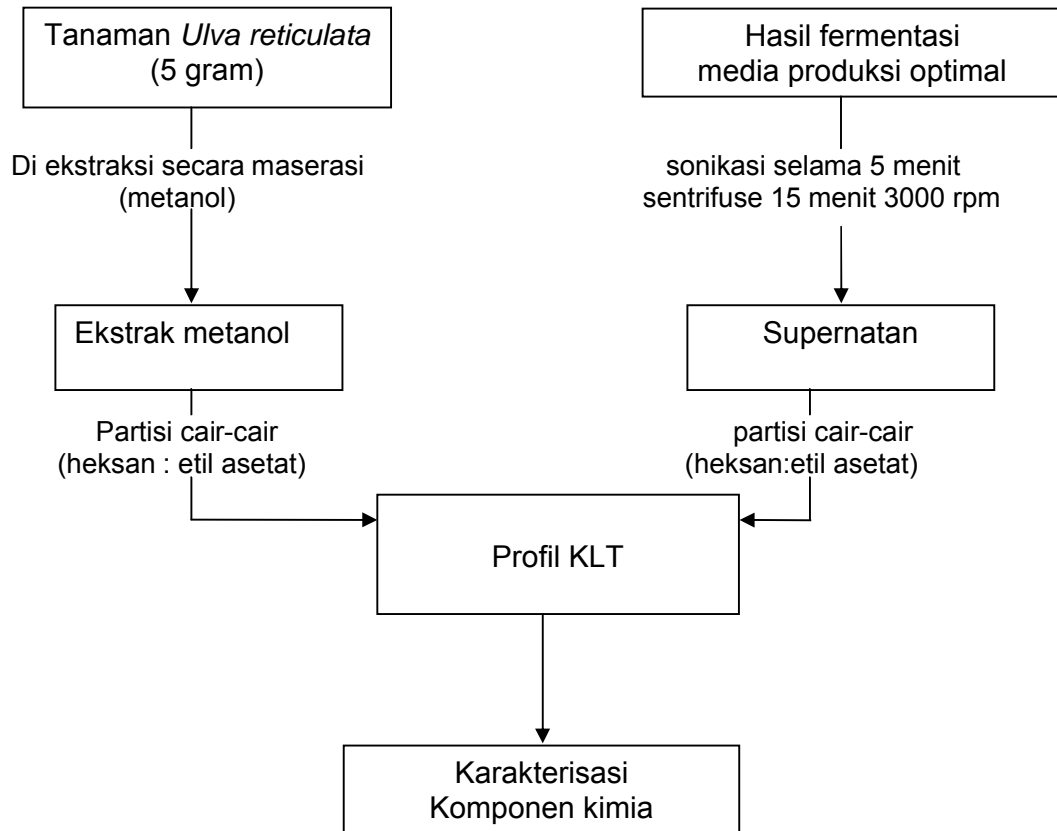
Lampiran 2. Optimalisasi Media Produksi dari Hasil Fermentasi Fungi Endofit *Penicillium* sp



Lampiran 3. Pengujian aktivitas antibakteri terhadap hasil fermentasi  
fungi endofit *Penicillium sp*



Lampiran 4. Skema karakterisasi komponen kimia ekstrak tanaman *Ulva reticulata* dan hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium* sp



Tabel 7. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambatan (mm) Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Produksi Senyawa Antibakteri Fungi Endofit *Penicillium* sp.

Optimalisasi Produksi	Diameter zona hambatan (mm)				
	HARI	Staphylococcus aureus		Escherichia coli	
		Nilai	Rata-rata	Nilai	Rata-rata
Pengaruh Lama Fermentasi (hari)	3	-	-	-	-
		-			
		-			
	5	-	-	11,05	11,53
		-		12,45	
		-		11,10	
	7	17,10	17,75	14,45	14,43
		18,10		14,40	
		18,05		14,45	
	9	19,45	20,10	19,45	18,52
		20,45		18,05	
		20,40		18,05	
	11	14,45	13,98	14,45	13,55
		14,45		13,10	
		13,05		13,10	

Tabel 8. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambatan (mm) Pengaruh Media Fermentasi Terhadap Produksi Senyawa Antibakteri Fungi Endofit *Penicillium* sp.

Optimalisasi Produksi	Diameter zona hambatan (mm)				
	Konsentrasi (%)	Staphylococcus aureus		Escherichia coli	
		Nilai	Rata-rata	Nilai	Rata-rata
Pengaruh NaCl (% b/v)	0	18,45	18,45	10,40	10,83
		18,45			
		18,45			
	0,5	18,05	18,05	8,05	8,05
		18,05			
		18,05			
	1	19,45	19,45	9,45	9,45
		19,45			
		19,45			
	2	17,45	17,45	9,45	9,45
		17,45			
		17,45			
Pengaruh Ekstrak Yeast (% b/v)	0	17,45	17,45	8,05	8,05
		17,45			
		17,45			
	0,5	20,05	20,05	8,00	8,00
		20,05			
		20,05			
	1	20,05	20,05	8,10	8,10
		20,05			
		20,05			
	2	13,10	13,10	8,00	8,00
		13,10			
		13,10			
Pengaruh Induser (% v/v)	0	11,05	11,05	13,45	13,45
		11,05			
		11,05			
	0,5	13,05	13,05	18,45	18,45
		13,05			
		13,05			
	1	13,05	13,05	17,05	17,75
		13,05			
		13,05			
	2	16,10	16,10	19,45	19,45
		16,10			
		16,10			

## Lampiran 5. Komposisi dan Cara Pembuatan Media Produksi

### 1. *Potato Dextrose Agar*

**Komposisi** : Infus kentang 200,0 gram; dekstrosa 20,0 gram; agar 15,0 gram; air laut steril ad 1000 mL.

**Cara pembuatan** : Ditimbang 4,15 g medium *Potato Dextrose Agar* sintetik dan didispersikan dengan air laut steril hingga 100 mL. Kemudian dididihkan di atas penangas air dan disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C, 2 atm selama 15 menit.

### 2. *Muller Hinton Agar*

**Komposisi** : Infus daging 300,0 gram; casein hidrolisat 17,5 gram; pati 1,5 gram; agar 13,0 gram; air suling ad 1000 mL. pH 7,4

**Cara pembuatan** : Ditimbang 3,0 gram medium *Muller Hinton Agar* sintetik dan didispersikan dengan air suling hingga 100 mL. Kemudian dididihkan di atas penangas air dan disterilkan di autotoklaf pada suhu 121°C, 2 atm selama 15 menit.

### 3. Starter PDY 0,1% (*Potato Dextrose Broth + Ekstrak Yeast*)

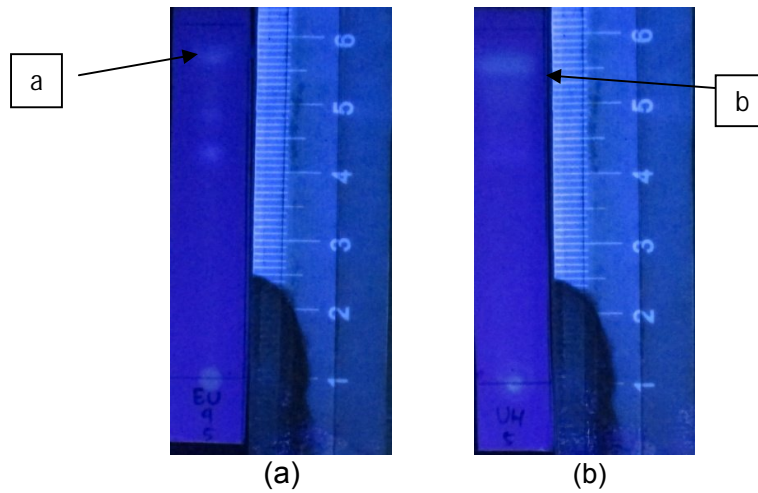
**Cara Pembuatan:** Ditimbang 2,4 gram médium *Potato Dextrose Broth* dan 0,1 gram ekstrak *yeast*, kemudian didispersikan dengan air suling hingga 100 ml. Kemudian dididihkan di atas penangas air dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, 2 atm selama 15 menit.

### 4. Starter PDY 0,5% (*Potato Dextrose Broth + Ekstrak Yeast*)

**Cara Pembuatan:** Ditimbang 12 gram médium *Potato Dextrose Broth* dan 2,5 gram ekstrak *yeast*, kemudian didispersikan dengan air suling hingga 500 ml. Kemudian dididihkan di atas penangas air dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, 2 atm selama 15 menit.

### 5. Infus *Ulva reticulata* 1% (Induser)

**Cara pembuatan:** Ditimbang serbuk tanaman *Ulva reticulata* sebanyak 1 gram, kemudian dimasukkan ke dalam panci infus yang telah berisi 100 ml air suling. Kemudian dididihkan di atas kompor diatur suhunya menggunakan termometer sampai 90°C selama 15 menit.



Gambar 14. Foto hasil identifikasi komponen kimia menggunakan reaksi

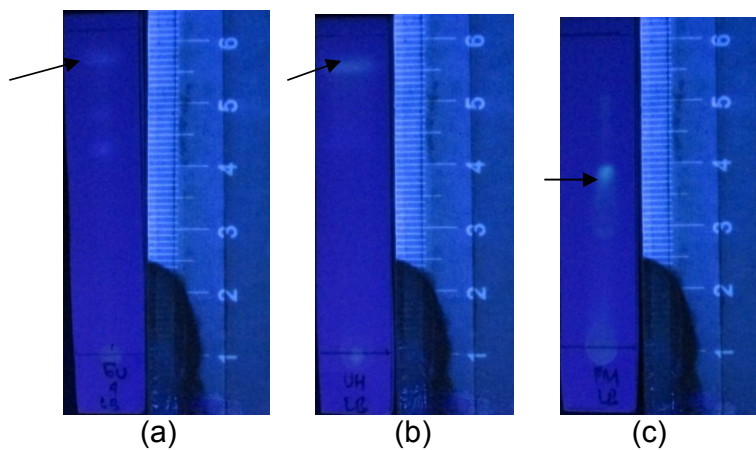
semprot sitroborat

Keterangan: (a) ekstrak etil asetat Tanaman *U. reticulata*

Nilai Rf = 0,6

(b) ekstrak heksan Tanaman *U. reticulata*

Nilai Rf = 0,9



Keterangan: (a) ekstrak etil asetat Tanaman *U. reticulata*

Nilai Rf = 0,9

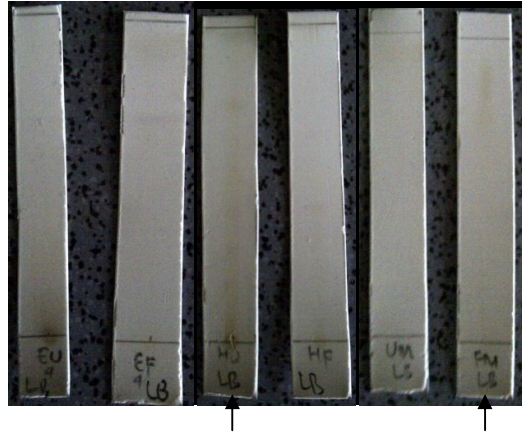
(b) ekstrak heksan Tanaman *U. reticulata*

Nilai Rf = 0,9

(c) ekstrak metanol hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium* sp

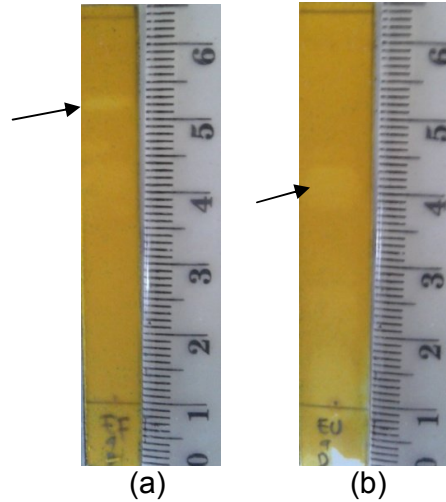
Nilai Rf = 0,6





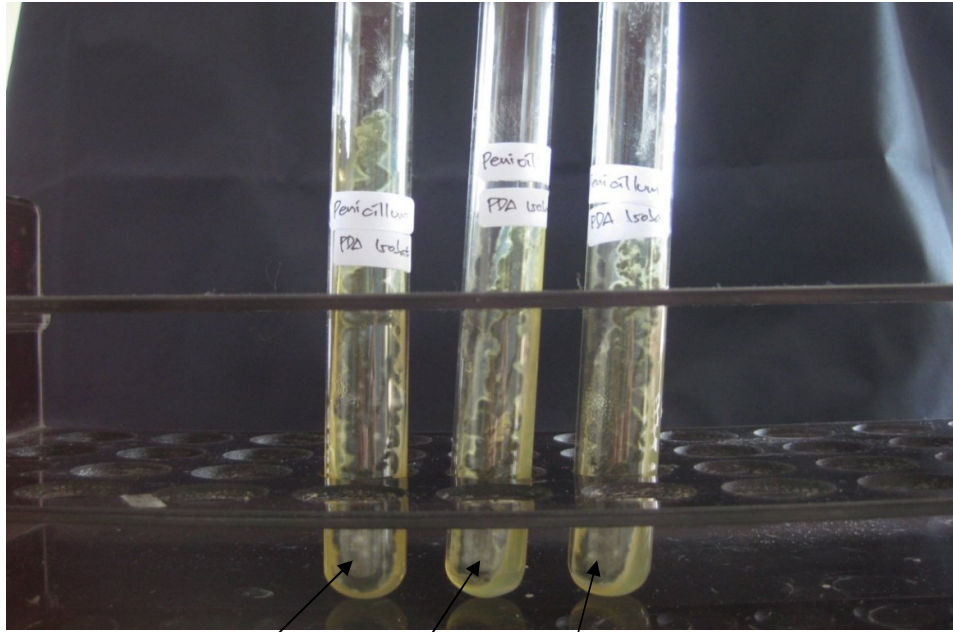
Keterangan: Hasil identifikasi senyawa triterpenoid setelah dipanaskan Ekstrak heksan tanaman dan ekstrak metanol hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium* sp menunjukkan hasil positif (tanda panah : ↑, menunjukkan warna orange)

Gambar 15. Foto hasil identifikasi komponen kimia menggunakan reaksi semprot Lieberman bochartat



Keterangan: (a) ekstrak etil asetat hasil fermentasi *Penicillium* sp  
 Nilai  $R_f = 0,5$   
 (b) ekstrak etil asetat Tanaman *U. reticulata*  
 Nilai  $R_f = 0,7$

Gambar 16. Foto hasil identifikasi komponen kimia hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium* sp menggunakan pereaksi semprot Dragendorff



Gambar 17. Isolat *Penicillium* sp dalam medium PDA miring (inkubasi 5 hari)

Keterangan: (1), (2), (3) isolat *Penicillium* sp (warna hijau tua)

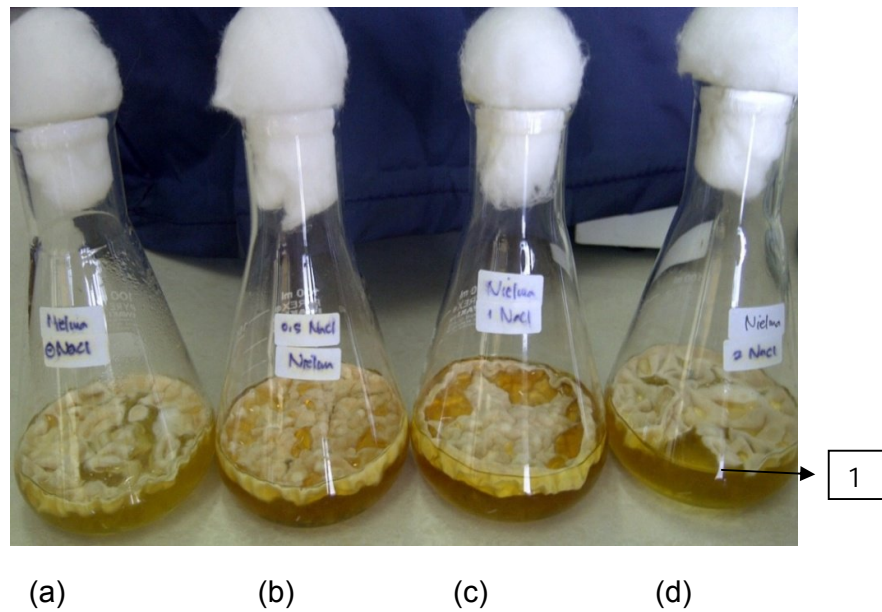


Isolat *Penicillium* sp setelah digores pada medium PDA (warna hijau tua)

Gambar 18. Isolat *Penicillium* sp dalam medium PDA (inkubasi 5 hari)

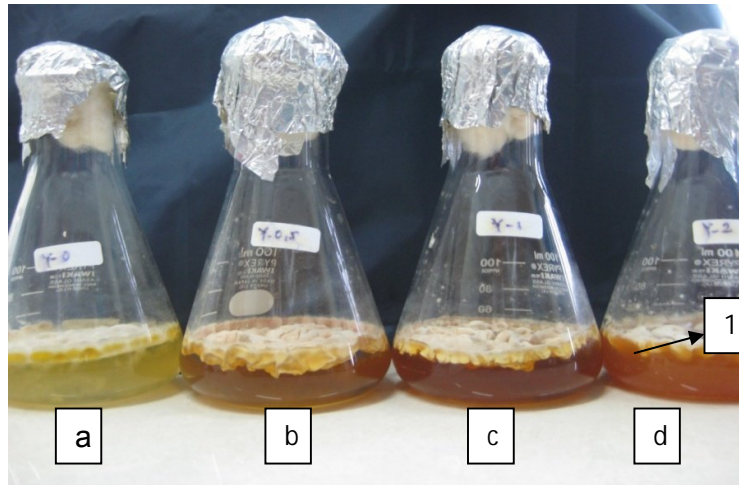


Gambar 19. Starter PDY 0,1%  
Keterangan: 1 = hasil fermentasi *Penicillium* sp



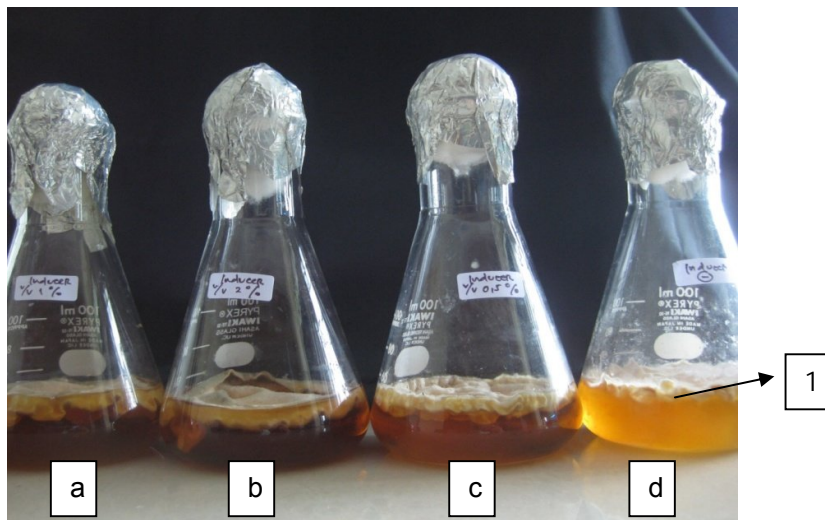
Gambar 20. Foto hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium* sp dengan variasi konsentrasi NaCl (inkubasi 9 hari)

Keterangan: 1 = hasil fermentasi *Penicillium* sp  
(a) = 0% NaCl, (b) = 0,5% NaCl, (c) 1% NaCl, (d) 2% NaCl



Gambar 21. Foto hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium* sp dengan variasi konsentrasi ekstrak yeast (inkubasi 9 hari)

Keterangan: 1 = hasil fermentasi *Penicillium* sp  
(a) = 0%, (b) = 0,5% (c) 1%, (d) 2%



Gambar 22. Foto hasil fermentasi fungi endofit *Penicillium* sp dengan variasi induser (infus *U. reticulata*) inkubasi 9 hari

Keterangan: 1 = hasil fermentasi *Penicillium* sp

(a) = 1% v/v, (b) = 2% v/v, (c) 0,5% v/v, (d) 0% v/v