

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT
DARI TANAMAN KETEPENG CINA (*Cassia alata* L.)
SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA ANTIMIKROBA**

**NATALIA ADA'
N111 06 053**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2010**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT DARI TANAMAN
KETEPENG CINA (*Cassia alata* L.) SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA
ANTIMIKROBA**

SKRIPSI

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



**NATALIA ADA'
N111 06 053**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2010**

PERSETUJUAN

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT DARI TANAMAN KETEPENG CINA (*Cassia alata* L.) SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA ANTIMIKROBA



Pembimbing Pertama,

[Signature]
Subehan, S.Si, M.Pharm, Sc., PhD., Apt
NIP. 19750925 200112 1 002

Pembimbing Kedua,

[Signature]
Dra. Rahmawati Syukur, M.Si, Apt
NIP. 19651010 199203 2 002

Pada tanggal Desember 2010

PENGESAHAN


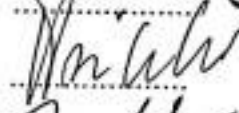
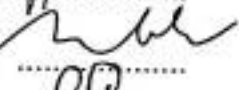
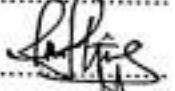
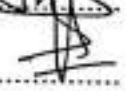
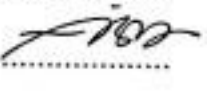
**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT DARI TANAMAN
KETEPENG CINA (*Cassia alata* L.) SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA
ANTIMIKROBA**

Oleh :

**NATALIA ADA'
N111 06 053**

**Dipertahankan Di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada tanggal 14 Desember 2010**

Panitia Penguji Skripsi

- | | | |
|---------------------|--|---|
| 1. Ketua | : Prof. DR.H.M. Natsir Djide, MS., Apt |  |
| 2. Sekretaris | : Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt |  |
| 3. Anggota | : Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt |  |
| 4. Anggota (Ex Off) | : Dra. Hj. Sartini, M.Si., Apt |  |
| 5. Anggota (Ex Off) | : Subehan, S.Si., M.Pharm. Sc., Ph.D., Apt |  |
| 6. Anggota (Ex Off) | : Dra. Rahmawati Syukur, M.Si., Apt |  |

Mengetahui:
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin


Prof. DR. Elly Wahyudin, DEA, Apt.

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini adalah karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum

Makassar, Desember 2010

Penyusun,



Natalia Ada'

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian isolasi dan identifikasi fungi endofit dari tanaman Ketepeng cina (*Cassia alata* L.), dengan tujuan untuk memperoleh fungi endofit dari tanaman Ketepeng cina (*Cassia alata* L.) sebagai penghasil bahan baku antimikroba. Prosedur isolasi dilakukan dengan metode tanam langsung di atas medium PDA (*Potato Dekstrosa Agar*), setelah dilakukan sterilisasi permukaan. Isolat yang diperoleh kemudian difermentasi cair selama 5 hari dengan medium PDY (*Potato Dekstrosa Broth-ekstrak Yeast*) dalam labu kocok kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil fermentasi di uji daya antimikroba terhadap *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi agar menggunakan kertas cakram, masa inkubasi 24 jam untuk bakteri dan 72 jam untuk jamur. Sebanyak 4 isolat fungi endofit diperoleh dengan diameter zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* 7,73mm dan 8,23mm (fungi FE-C2 dan FE-C3), *Escherichia coli* 8,13mm; 8,33mm; 11,98mm; dan 8,80mm (Fungi FE-C1, FE-C2, FE-C3 dan FE-C4), *Candida albicans* 19,60mm; 19,53mm; dan 20,07mm (Fungi FE-C2, FE-C3, dan FE-C4), dan *Aspergillus niger* 11,98mm; 9,37mm; 12,48mm; dan 11,65mm (Fungi FE-C1, FE-C2, FE-C3 dan FE-C4). Hanya 1 isolat yang dapat diidentifikasi yaitu FE-C4 *Fusarium sp.*

ABSTRACT

Isolation and identification of endophytic fungi from *Cassia alata* L. leaves and stems has been conducted. The purpose of this research was to obtain endophytic fungi as the source of antimicrobial agent. The procedure of isolation was done by Direct Plant Methode on PDA medium (Potato dextrose agar) after surface sterilization. Then isolates were liquid fermented for 5 days with PDY medium (Potato dextrose Broth- yeast extract) in the shaker and then centrifuge at a speed of 3000 rpm for 10 minutes. The supernatant of fermentation product was taken for antimicrobial activity test to *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* using Diffusion method with paper disc were incubated for 24 hours for bacterial and 72 hours for fungal. Four fungal isolates were obtained with inhibition zone against *Staphylococcus aureus* obtained 7.73 mm and 8.23 mm (fungi FE-C2 and FE-C3), *Escherichia coli* 8.13 mm, 8.33 mm, 11.98 mm, and 8.80 mm (Fungi FE-C1, FE-C2, FE-C3 and FE-C4), *Candida albicans* 19.60 mm, 19.53 mm, and 20.07 mm (Fungi FE-C2, FE-C3, and FE-C4), and *Aspergillus niger* 11.98 mm, 9.37 mm, 12.48 mm, and 11.65 mm (Fungi FE-C1, FE-C2, FE-C3 and FE-C4). One only isolate have been identified that's FE-C4 *Fusarium* sp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur patut dipanjatkan kepada Tuhan Yang Maha Pengasih dan Penyayang atas segala berkat, anugerah, kasih dan petunjuk-Nya yang tak pernah habis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Ucapan terima kasih tak lupa disampaikan kepada orang tua Martinus K. dan Esteriam Rante Lembang penulis atas segala dukungannya baik dukungan doa, kasih sayang dan materi yang tak habis-habisnya dari awal hingga dapat menyelesaikan studi ini. Juga kepada kakak saya Yandi Ada' atas bantuannya, serta adik-adik saya: Ika, Leni, Yusuf dan Yosef yang menjadi penyemangat bagi penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Terima kasih juga kepada Tante Sau' yang menjadi wali selama penulis menempuh studi di bangku kuliah. Untuk kakek dan nenek atas dukungan doanya dan semua keluarga yang sudah mendukung.

Tiada kata yang dapat penulis ucapkan selain terima kasih yang sebesar-besarnya kepada ibu Drs. Sartini, M.Si, Apt selaku Pembimbing Utama, bapak Subehan, S.Si, M.Pharm, Sc. PhD., Apt selaku Pembimbing Pertama dan ibu Dra. Rahmawati Syukur, M. Si selaku Pembimbing Kedua, yang telah meluangkan waktu selama ini untuk memberi petunjuk, membagi ilmu dan menyumbangkan ide-ide dalam membimbing penulis selama melakukan penelitian hingga selesainya skripsi ini.

Pada kesempatan ini pula, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Ibu Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin serta bapak dan ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, tak lupa kepada bapak Alm. Andrew Ollich dan ibu Dra. Asnah Marzuki, MSi, Apt selaku penasehat akademik penulis.
2. Teman-teman PAku (Prisca D. Pakan, Novianti Yonatan, Febriana Valentini M.) dan kk PAku Yuliani Patabang juga kepada Stefani S.Pumpun, Pragenty Ritna Manaya dan saudara-saudaraku Elixir '06 atas dukungannya dalam bentuk apapun itu.
3. Sherling Lisangan yang menjadi teman seperjuangan mulai dari awal penelitian hingga Skripsi.
4. Kepada seluruh pihak yang telah membantu selama penulis melaksanakan penelitian telah membantu terutama K' Lia, K' Dewi dan K' Kamal di Lab. Mikrobiologi, Ibu Lisa (Biologi), teman-teman peneliti (Subaedah, Asnur Baety, Sorayya, Sandra Aulia dkk) dan asisten di lab. Mikrobiologi Farmasi.
5. Teman-teman pengurus di PMKO Filadelpia MIPA_FARMASI terima kasih untuk dukungan doanya.

Penulis menyadari kekurangan yang terdapat dalam skripsi ini namun penulis berharap semoga skripsi yang sederhana ini dapat memberikan manfaat bagi keilmuan Farmasi dan kepada masyarakat.

Makassar, Desember 2010

Penulis

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL.....	ii
LEMBAR PERSETUJUAN.....	iii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iv
LEMBAR PERNYATAAN.....	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II. 1 Uraian Tanaman Ketepeng cina (<i>Cassia alata</i> L.).....	4
II.1.1 Klasifikasi.....	4
II.1.2 Nama Daerah.....	4
II.1.3 Morfologi.....	5
II.1.4 Kandungan Kimia.....	5
II. 2 Fungi.....	5
II. 3 Fungi Endofit.....	7
II. 4 Antimikroba.....	10
II. 5 Isolasi Fungi Endofit	13

II. 6	Produksi Metabolit sekunder.....	16
II. 7	Uji Aktivitas Antimikroba.....	18
II. 8	Identifikasi Isolat yang Memiliki Aktivitas Antimikroba ..	21
II.9	Uraian Mikroba.....	24
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN.....		28
III. 1	Alat dan Bahan yang digunakan.....	28
III. 2	Penyiapan Sampel Penelitian.....	28
III. 2 .1	Pengambilan Sampel.....	28
III. 2. 2	Pengolahan Sampel.....	29
III. 3	Isolasi dan Uji Aktivitas Antimikroba.....	29
III. 3. 1	Isolasi Fungi Endofit.....	29
III. 3. 2	Purifikasi Fungi Endofit.....	29
III. 3. 3	Produksi Metabolit Sekunder.....	30
III. 3. 4	Uji Aktivitas Antimikroba	30
III. 4	Uji Kualitatif Metabolit Sekunder dari Fungi Endofit...	30
III. 5	Identifikasi Isolat yang Mempunyai Aktivitas Antimikroba	31
III. 6	Pengumpulan dan Analisis Data.....	31
III. 7	Penarikan Kesimpulan.....	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....		32
IV. 1	Hasil Penelitian.....	32
IV. 2	Pembahasan.....	34

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	39
V. 1 Kesimpulan.....	39
V. 2 Saran.....	39
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	43

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakterisasi makroskopik isolat fungi endofit masa inkubasi 5 hari.....	32
2. Karakterisasi mikroskopik isolat fungi endofit.....	32
3. Hasil Pengamatan Diameter Daya Hambat (Aktivitas Antifungi) terhadap <i>Aspergillus niger</i> dan <i>Candida albicans</i>	33
4. Hasil Pengamatan Diameter Daya Hambat (Aktivitas Antibakteri) terhadap <i>Escherichia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i>	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Fungi endofit dari ranting (A) dan daun (B) setelah inkubasi 10 hari dalam media PDA.....	34
2. Hasil Uji Antimikroba Hasil Fermentasi Isolat Fungi Endofit.....	36
3. Hasil Uji kualitatif metabolit sekunder	38
4. Tanaman Ketepeng Cina (<i>Cassia alata</i> L.).....	48
5. Pengamatan Makroskopik Koloni Fungi Endofit Masa inkubasi 5 Hari.....	49
6. Hasil Fermentasi Isolat Fungi Endofit.....	50
7. Pengamatan Mikroskopik Fungi Endofit.....	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema kerja isolasi.....	43
2. Skema Fermentasi Isolat Fungi Endofit..... ..	44
3. Skema Uji Antimikroba..... ..	45
4. Skema Uji Kualitatif..... ..	46
5. Skema Identifikasi Isolat Fungi Endofit..... ..	47

BAB I

PENDAHULUAN

Tanaman dan mikroorganisme mempunyai hubungan yang sangat erat satu sama lain. Mikroorganisme dapat menyerang tanaman sehingga menyebabkan penyakit pada tanaman induknya, sementara ada pula mikroorganisme yang bersimbiosis mutualisme dengan tanaman induknya (1). Salah satu kelompok mikroorganisme yang hidup bersimbiosis dengan tanaman adalah mikroorganisme endofit. Endofit merupakan mikroorganisme yang sebagian atau seluruh hidupnya berada di dalam jaringan hidup tanaman inang (2).

Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya tersebut. Dari sekitar 300.000 jenis tanaman yang tersebar di muka bumi ini, masing-masing tanaman mengandung satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri dan fungi (3). Sehingga apabila endofit yang diisolasi dari suatu tanaman obat dapat menghasilkan metabolit sekunder sama dengan tanaman aslinya atau bahkan dalam jumlah yang lebih tinggi, maka kita tidak perlu menebang tanaman aslinya untuk diambil sebagai simplisia, yang kemungkinan besar memerlukan puluhan tahun untuk dapat dipanen (4).

Pada umumnya isolat mikroba endofit adalah fungi. Fungi tumbuh dalam bentuk filamen-filamen yang tumbuh dari bagian tanaman pada permukaan medium isolasi. Kebanyakan isolat fungi yang diperoleh termasuk dalam golongan fungi imperfekti atau deuteromisetes. Sebagian besar endofit ini menghasilkan metabolit sekunder jika difermentasi (5). Beberapa penelitian tentang isolasi fungi endofit dari tanaman yang berpotensi sebagai antimikroba telah dilakukan diantaranya Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) (6), Temu Putih (*Curcuma zedoaria* Berg. Roscoe) (7), Kakao (*Theobroma cacao*) (8).

Indonesia, sudah terkenal merupakan negara yang kaya bahan alam. Salah satu bahan alam yang memiliki potensi untuk diteliti adalah Ketepeng Cina (*Cassia alata*/KC) di mana dalam pengobatan tradisional banyak dimanfaatkan sebagai antiparasit, pencahar, kurap, kudis, panu, eksem, malaria, sembelit, radang kulit bertukak, sifilis, herpes, influenza dan bronchitis (9). Bagian yang digunakan dalam pengobatan tersebut adalah daun. Beberapa penelitian tentang khasiat daun ketepeng cina sudah dilakukan diantaranya sebagai imunomodulator terhadap aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag (10), antifungi dari ekstrak etanol 5% b/v (11,13), dan antibakteri dari ekstrak etanol 10% b/v(12,13,).

Permasalahannya adalah apakah fungi endofit dari tanaman ketepeng cina (*Cassia alata* L.) mampu menghasilkan senyawa yang berpotensi sebagai antimikroba. Oleh karena itu dilakukan penelitian isolasi dan identifikasi fungi endofit dari tanaman ketepeng cina (*Cassia*

alata L.) sebagai penghasil senyawa antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan fungi endofit dari tanaman ketepeng cina (*Cassia alata* L.) sebagai penghasil senyawa antimikroba.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.)

Ketepeng cina merupakan jenis perdu yang besar dan banyak tumbuh secara liar di tempat-tempat yang lembab. Tumbuhan ini sering digunakan dalam pengobatan tradisional karena memiliki banyak khasiat diantaranya dapat digunakan sebagai pencahar, kurap, kudis, panu, eksem, malaria, sembelit, radang kulit bertukak, sifilis, herpes, influenza dan bronchitis (9).

II.1.1 Klasifikasi (14)

Regnum	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Sub Divisio	: Angiospermae
Class	: Dicotyledonae
Ordo	: Rosales
Familia	: Caesalpiniaceae
Genus	: Cassia
Species	: <i>Cassia alata</i> L.

II.1.2 Nama Daerah (9)

Ketepeng Kebo (*Jawa*); Ketepeng Cina (*Indonesia*); Ketepeng badak (*Sunda*); Acon-aconan (*Madura*); Sajamera (*Halmahera*); Kupang-

kupang (*Ternate*); Tabankun (*Tidore*); Daun Kupang, daun kurap, gelenggang, uru'kap (*Sumatera*).

II.1.3 Morfologi(14)

Merupakan tanaman perdu dengan tinggi 1-5 m. Daun menyirip genap, poros daun tanpa kelenjar. Daun penumpu lama tetap tinggal dengan pangkal lebar dan ujung meruncing, seperti kulit, merah coklat, panjang 6-9 mm. Anak daun 8-24 pasang; sepasang yang terbawah langsung di pangkal tangkai daun, lk memeluk ranting, berjarak dengan pasangan berikutnya, yang lebih atas memanjang sampai bulat telur terbalik, tumpul bertepi merah coklat, boleh dikatakan gundul. Daun mahkota kuning cerah. Polongan di atas tanda bekas kelopak bertangkai, menjauhi, hitam, dengan sayapnya 12-18 kali 2,5 membuka sepanjang sambungan perut. Biji 50-70. Dari Amerika, sangat banyak menjadi liar, dengan ketinggian 1-1400 m.

II.1.4 Kandungan Kimia (9)

Tumbuhan ini kaya dengan berbagai kandungan kimia yang sudah diketahui, antara lain Rein aloe-emodina, rein aloe-emodina-diantron, rein, aloe-emodina, asam krisofanat (*dihidroksimetilanthraquinone*) dan tanin.

II. 2 Fungi

Fungi merupakan protista nonfotosintetis yang tumbuh dengan bercabang, jalinan filament (*hifa*) yang dikenal dengan sebutan miselium (*mycelium*). Meskipun hifa memiliki sekat-sekat, namun sekat ini

dengan sitoplasma saling berhubungan) berada dalam deretan tabung-tabung yang bercabang. Tabung-tabung ini dibentuk dari polisakarida seperti kitin, yang mirip dengan dinding sel. Bentuk miselial disebut mold, jenis lain seperti ragi, tidak membentuk miselium namun mudah dikenali sebagai fungi melalui proses reproduksi seksualnya dan dari adanya bentuk-bentuk peralihan (15).

Fungi adalah eukariotika, dan sebagian besar adalah eukariotika multiseluler. Meskipun fungi pernah dikelompokkan ke dalam kingdom tumbuhan, fungi adalah organisme unik yang umumnya berbeda dari eukariotika lainnya jika ditinjau dari cara memperoleh makanan, organisasi structural, serta pertumbuhan dan reproduksi. Pada kenyataannya kajian molekuler menunjukkan bahwa fungi dan hewan kemungkinan berasal dari satu nenek moyang yang sama (16).

Fungi merupakan mikrobia eukariotik yang mempunyai ciri-ciri spesifik antara lain: mempunyai inti sel, membentuk spora, tidak berklorofil, heterospora, saprofit, dapat berkembang biak secara aseksual maupun seksual. Perbedaan utama antara organisme yang tergolong fungi, misalnya kapang dan khamir yaitu kapang merupakan fungi membentuk filament (miselium) sedangkan khamir merupakan fungi bersel tunggal tanpa filament (16).

Khamir dibedakan dari kapang karena bentuknya yang terutama uniseluler. Sel-sel khamir yang tunggal umumnya berukuran lebih besar dibanding bakteri, lebarnya mencapai $1-5\mu\text{m}$ dan panjangnya mencapai

5-30 μm atau lebih. Bentuk sel khamir bermacam-macam antara lain; bulat, oval, silinder, ogival (bulat panjang dengan salah satu ujung runcing), segitiga melengkung (triangular), dan sebagainya. Khamir tidak memiliki flagella atau alat gerak lainnya. Pada medium agar, khamir memiliki koloni halus dan tampak berkilauan seperti koloni bakteri. Hal ini berbeda dengan koloni fungi yang berfilamen (16).

Kapang adalah fungi multiseluler yang mempunyai filament, dan pertumbuhannya pada substrat mudah dilihat karena penampakannya yang berserabut seperti kapas. Pertumbuhannya mula-mula berwarna putih, tetapi jika spora telah timbul akan terbentuk berbagai warna tergantung dari jenis kapang. Berbeda halnya dengan sel khamir, kapang tampak jelas kelihatan walau dengan perbesaran kuat, maka kapang tampak menyerupai struktur hutan kecil (16).

II. 3 Fungi Endofit

Mikroba endofit adalah organisme hidup yang berukuran mikroskopis (bakteri dan jamur) yang hidup di dalam jaringan tanaman (*xylem* dan *phloem*), daun, akar, buah, dan batang. Mikroba ini hidup bersimbiosis saling menguntungkan, dalam hal ini mikroba endofitik mendapatkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman dan memproteksi tanaman melawan herbivora, serangga, atau jaringan yang patogen sedangkan tanaman mendapatkan derivat nutrisi dan senyawa aktif yang diperlukan selama hidupnya (17).

sedangkan tanaman mendapatkan derivat nutrisi dan senyawa aktif yang diperlukan selama hidupnya (17).

Mikroba endofit mampu menghasilkan enzim yang penting untuk kolonisasi dalam jaringan tanaman. Enzim-enzim yang dihasilkan seperti enzim perombak oligosakarida, xylanase, mannanase, dan inulinase. Selain itu endofit juga dapat menghasilkan pemacu tumbuh, hormone dan zat antibiotic serta metabolit sekunder lain yang bermanfaat dalam bidang pertanian, farmasi maupun industri (7).

Pada umumnya isolat mikroba endofit adalah fungi. Fungi tumbuh dalam bentuk filamen-filamen yang tumbuh dari bagian tanaman pada permukaan medium isolasi. Kebanyakan isolat fungi yang diperoleh termasuk dalam golongan fungi imperfekti atau deuteromisetes. Sebagian besar endofit ini menghasilkan metabolit sekunder jika dikultur fermentasi (5).

Ditinjau dari sisi taksonomi dan ekologi, fungi ini merupakan organisme yang sangat heterogen. Petrini et al. (1992) menggolongkan fungi endofit dalam kelompok *Ascomycotina* dan *Deuteromycotina*. Keragaman pada jasad ini cukup besar seperti pada *Loculoascomycetes*, *Discomycetes*, dan *Pyrenomycetes*. Strobell et al. (1996), mengemukakan bahwa fungi endofit meliputi genus *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Monochaetia*, dan lain-lain. Sedangkan Clay (1988) melaporkan, bahwa fungi endofit dimasukkan dalam famili *Balansiae* yang terdiri dari 5 genus yaitu *Atkinsonella*, *Balansiae*, *Balansiopsis*, *Epichloe* dan *Myriogenospora*.

simbiosis ini, fungi dapat membantu proses penyerapan unsur hara yang dibutuhkan oleh tumbuhan untuk proses fotosintesis serta melindungi tumbuhan inang dari serangan penyakit, dan hasil dari fotosintesis dapat digunakan oleh fungi untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya (17).

Fungi endofit adalah fungi yang terdapat di dalam sistem jaringan tumbuhan seperti daun, bunga, ranting ataupun akar tumbuhan. Fungi ini menginfeksi tumbuhan sehat pada jaringan tertentu dan mampu menghasilkan mikotoksin, enzim serta antibiotik (17).

Asosiasi fungi endofit dengan tumbuhan inangnya digolongkan dalam 2 kelompok (17):

1. 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.
2. 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 (18).

II. 4 Antimikroba

Antimikroba adalah obat pembasmi mikroba, khususnya mikroba yang merugikan manusia (19). Antimikroba yang ideal menunjukkan toksisitas selektif. Hal ini secara tidak langsung menjelaskan bahwa obat berbahaya bagi parasit dan tidak membahayakan inang. Seringkali toksisitas selektif lebih bersifat relatif dan tidak mutlak; hal ini menyatakan bahwa konsentrasi obat-obatan yang toleran terhadap inang, mungkin merusak mikroorganisme penyebab infeksi. Toksisitas selektif mungkin merupakan fungsi reseptor spesifik yang dibutuhkan untuk melekatnya obat-obatan, atau bisa karena hambatan biokimia yang terjadi bagi organisme namun tidak bagi inangnya (15).

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antimikroba yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba yang disebut sebagai aktivitas bakteriostatik, dan ada yang bersifat membunuh mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya, masing-masing di kenal

bakteriostatik, dan ada yang bersifat membunuh mikroba, dikenal sebagai aktivitas bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai kadar hambat minimal (KHM) atau kadar bunuh minimal (KBM). Antimikroba tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari bakteriostatik menjadi bakterisid apabila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi KHM (19).

Intensitas kerja suatu antimikroba dinyatakan dengan beberapa kadar yang dibutuhkan untuk tercapainya suatu efek antimikroba. Umumnya intensitas kerja diberikan dalam konsentrasi hambat minimum. Artinya adalah kadar batas suatu antimikroba yang secara *in vitro* dapat bekerja terhadap jenis mikroba tertentu (19).

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

1. Antimikroba yang menghambat metabolisme sel mikroba

Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, di mana bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoat (PABA). Antimikroba bekerja memblokir tahap metabolik spesifik mikroba, seperti sulfonamid dan trimetoprin.

2. Antimikroba yang menghambat sintesis dinding sel mikroba

Antimikroba golongan ini dapat menghambat sintesis atau menghambat aktivitas enzim yang dapat merusak dinding sel

mikroorganisme. Yang termasuk kelompok ini adalah penisilin, sefalosporin, vankomisin, basitrasin.

3. Antimikroba yang mengganggu keutuhan membran sel mikroba

Antimikroba bekerja secara langsung pada membran sel yang mempengaruhi permeabilitas dan menyebabkan keluarnya senyawa intraseluler mikroorganisme (bakteri). Contohnya amfoterisin B, nistatin dan polomiksin.

4. Antimikroba yang menghambat sintesis protein sel mikroba

Antimikroba mempengaruhi fungsi ribosom pada mikroorganisme yang menyebabkan sintesa protein terhambat. Antimikroba yang berinteraksi dengan ribosom 30S antara lain aminoglikosida dan tertasiklin, sedangkan yang bekerja pada ribosom 50S adalah kloramfenikol, linkomisin, klindamisin.

5. Yang menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba.

Antimikroba kelompok ini bekerja dengan cara berikatan dengan enzim polymerase-RNA (pada sub unit) sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Contohnya rifampisin.

Antibiotika adalah salah satu contoh metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Metabolit sekunder adalah hasil metabolisme yang tidak merupakan kebutuhan pokok sel mikroba untuk hidup dan tumbuh, metabolit sekunder memiliki ciri-ciri antara lain setiap metabolit sekunder adalah spesifik untuk satu atau beberapa spesies, produksinya dipengaruhi oleh faktor lingkungan, ada beberapa spesies

memproduksi beberapa metabolit sekunder, banyak metabolit sekunder yang diproduksi dengan struktur yang hampir sama yang mana komposisinya dipengaruhi oleh medium dan kondisi pertumbuhan (21).

II. 5 Isolasi Fungi Endofit

Endofit dari tanaman inangnya akan sulit diperoleh dikarenakan endofit tumbuh di antara sel inangnya dan tampaknya juga endofit dapat berpenetrasi ke dalam sel walaupun akan sukar untuk mengamatinya secara langsung. Beberapa dari endofit dapat memproduksi senyawa bioaktif yang dapat mempengaruhi hubungan antara inang dengan endofit. Hubungan antara endofit dengan inang lebih kompleks dikarenakan sel inang juga ikut dilibatkan (2).

Ada beberapa metode isolasi yang bisa diterapkan dalam mengisolasi fungi tetapi yang umum digunakan adalah dengan sterilisasi permukaan. Isolasi fungi dapat dilakukan dari jaringan tanaman, daun atau dari buah, umumnya dilakukan dengan cara meletakkan sedikit jaringan sampel secara langsung diatas permukaan medium agar pada cawan petri maupun pada agar miring. Terlebih dahulu dilakukan sterilisasi permukaan dikarenakan dikhawatirkan adanya kontaminan pada permukaan sampel. Sterilisasi permukaan dapat dilakukan dengan menggunakan (a) etanol 95% selama beberapa detik kemudian dihilangkan dengan mencuci pada air steril, (b) kemudian merendam sampel pada larutan 1:1000 $HgCl_2$ selama 15-25 detik kemudian dibilas, (c) direndam dalam larutan calsium hipoklorit selama 1 menit kemudian

dibilas, (d) kemudian dalam larutan H₂O₂ 50% selama 15 detik hingga 5 menit kemudian dibilas. Setelah itu sampel diletakkan diatas medium agar dan diinkubasi (22).

Bakteri terkadang dapat pula memanfaatkan substrat yang sama dengan fungi, oleh karena itu kedalam media isolasi dapat dilakukan beberapa tindakan pencegahan antara lain dengan mengatur pH medium pada kisaran 3,5 sampai 5,5 dapat dengan cara penambahan 0,5% asam ttrat ataupun 0,1% asam laktat setelah medium disterilkan, dapat pula dengan menambahkan antibiotik seperti streptomisin, neomisin, kanamisin, tetrasiklin, kloramfenikol dan penisilin, cara lain adalah dengan menambahkan kristal violet 10 mg/l atau kalium telurit 100 mg/l (23).

Mikroorganisme yang penting dalam industri fermentasi dapat diperoleh dari berbagai sumber di alam. Sebagai contoh, bakteri pembentuk spora yaitu *Bacillus* dan *Clostridium* sering ditemukan di tanah, bakteri asam laktat sering ditemukan di susu, bakteri asam asetat sering ditemukan pada sari buah dan sebagainya. Untuk mendapatkan isolat mikroba dari suatu bahan yang mengandung campuran mikroba dapat dilakukan dengan beberapa cara tergantung dari mikroorganismenya antara lain : (21)

1. Isolasi pada agar cawan

Kebanyakan bakteri, kapang dan khamir dapat membentuk koloni pada medium padat, sehingga mudah diisolasi dengan cara menyebarkan sel-sel tersebut pada agar cawan sedemikian rupa sehingga tumbuh

koloni-koloni yang terpisah. Konsentrasi agar yang digunakan 1–2 %, tetapi terkadang digunakan agar yang lebih lunak untuk mengisolasi beberapa mikroba tertentu. Prosedur isolasinya dapat menggunakan metode gores yaitu dengan menggoreskan sampel di permukaan medium agar ataupun dengan metode tuang yaitu dengan cara mengencerkan kultur yang kemudian dituang ke dalam cawan dan kemudian menambahkan medium agar.

2. Isolasi dalam medium cair

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

3. Isolasi sel tunggal

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

jumlahnya relatif besar untuk menghilangkan mikroba kontaminan yang ukurannya lebih kecil.

II.6 Produksi Metabolit Sekunder

Usaha untuk mendapatkan senyawa antibiotik dilakukan dengan proses fermentasi. Dalam proses tersebut, mikroorganisme endofit akan mengeluarkan suatu metabolit sekunder yang merupakan senyawa antibiotik itu sendiri. Metabolit sekunder merupakan senyawa yang disintesis oleh suatu mikroba, tidak untuk memenuhi kebutuhan primernya (tumbuh dan berkembang) melainkan untuk mempertahankan eksistensinya dalam berinteraksi dengan lingkungannya. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroorganisme endofit merupakan senyawa antibiotik yang mampu melindungi tanaman dari serangan hama insekta, mikroba patogen, atau hewan pemangsanya, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai agen biokontrol (24).



Ada beberapa metode yang dapat digunakan dalam proses fermentasi mikroorganisme antara lain : (25)

1. Kultur Permukaan (*surface culture*)

Pada metode ini, medium diinokulasikan spora atau miselium fungi. Miselium akan tumbuh diseluruh permukaan medium cair membentuk suatu koloni bervariasi. Ini merupakan metode yang paling mudah dan murah, akan tetapi memiliki beberapa kerugian yaitu pertumbuhan yang tidak homogen dimana koloni terdiri dari beberapa miselium yang berbeda pertumbuhannya dan lingkungan tumbuhnya

dimana miselium yang berada diatas permukaan koloni berada dalam kondisi yang lebih aerobik dibandingkan yang dibawah permukaan koloni, hal ini berkebalikan pada keadaan kontak dengan medium.

2. Kultur dengan pengocokan (*shaker culture*)

Pada metode ini medium dikocok setelah diinokulasikan spora atau miselium sehingga pertumbuhan akan tampak pada seluruh medium. Kelebihan metode ini dibandingkan dengan metode kultur permukaan yaitu pemanfaatan medium oleh mikroorganisme lebih efisien, mempercepat pertumbuhan dan pertumbuhannya lebih homogen.

3. Kultur dengan pengocokan, mengalirkan udara (*stirred aerate culture*)

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

4. Kultur berkelanjutan (*continous culture*)

Metode ini dilakukan dengan cara berkala mengganti medium pada fermentor dengan medium fermentasi yang baru, hal ini akan menyebabkan proses fermentasi akan terus berlangsung. Metode ini akan sangat bermanfaat untuk penelitian laboratorium fermentasi, karena dengan menjaga ketersediaan medium baru kita dapat menjaga proses fermentasi pada tahapan yang diinginkan sementara efek yang lain dipelajari.

II. 7 Uji Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas suatu mikroorganisme terbagi dalam 4 kelompok utama yaitu :
(26)

a. Uji Difusi

Uji difusi dilakukan pada medium padat, umumnya pada medium agar yang cocok untuk pertumbuhan mikroba uji. Komponen yang diujikan berdifusi di atas medium dalam pola radial dari pencadangan atau kertas cakram. Komponen yang berdifusi ini menghambat pertumbuhan mikroba uji apabila memiliki sifat seperti antibiotik ataupun memacu pertumbuhan mikroba uji jika komponen yang diuji merupakan faktor tumbuh mikroorganisme. Diameter zona yang terbentuk menggambarkan konsentrasi komponen yang diujikan, dan ini dibandingkan dengan bermacam konsentrasi standar atau komponen referensi yang telah diketahui.

Ada 2 macam uji difusi antara lain :

1. Metode menggunakan silinder pencadangan

Pada metode ini komponen senyawa antibiotik uji ataupun produk fermentasi berdifusi dari pencadangan atau silinder ke sekeliling medium agar. Sejumlah ± 10 ml medium dituang secara aseptis ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat (base layer). Setelah memadat, ± 5 ml medium yang sama ataupun berbeda yang telah diinokulasikan mikroba uji dituang diatas lapisan pertama dan dibiarkan memadat (seed layer). Sejumlah silinder pencadangan yang dapat terbuat dari besi, porselin, atau

kaca diatur pada seed layer, silinder dapat sedikit dipanaskan untuk mempermudah penanamannya. Kemudian pada silinder tersebut di isi dengan sampel uji lalu diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu.

2. Metode menggunakan kertas cakram

Pada pengujian dengan metode kertas cakram, seed layer disiapkan seperti halnya pada pengujian dengan silinder pencadang. Pada metode ini digunakan kertas cakram sebagai ganti silinder pencadang. Larutan uji ditambahkan sebanyak $\pm 0,1$ ml pada kertas cakram steril yang umumnya berdiameter 6 - 8 mm. Kemudian diletakkan di atas permukaan seed layer, waktu inkubasi dan perhitungan hasil yang diperoleh sama dengan uji menggunakan silinder pencadang. Uji menggunakan kertas cakram dapat digunakan untuk menguji sampel hasil fermentasi yang dilarutkan dalam pelarut organik yang bersifat toksik pada mikroba uji dengan cara larutan uji di teteskan terlebih dahulu pada kertas cakram kemudian diletakkan pada cawan petri kosong agar pelarut yang digunakan dapat menguap sebelum diletakkan pada seed layer.

b. Uji Turbidimetri (dilusi)

Pada uji ini digunakan medium cair, efektifitas dari komponen yang diujikan diukur dari kemampuan komponen tersebut meningkatkan ataupun menurunkan nilai turbidimetri (kekeruhan) pada medium uji dimana nilai ini berkaitan dengan pertumbuhan mikroba uji. Medium uji yang cocok dibagi dalam beberapa seri tabung dan ditambahkan sejumlah komponen yang diujikan dengan konsentrasi tertentu, medium uji harus

steril. Kemudian pada masing-masing seri tabung diinokulasikan sejumlah kecil mikroba uji dengan jumlah yang konstan lalu diinkubasikan selama beberapa waktu pada temperatur tertentu. Pengamatan dapat dilakukan secara visual berdasarkan tingkat kekeruhan ataupun dengan menggunakan spektrofotometer visibel dengan panjang gelombang yang disesuaikan dengan warna medium untuk menghilangkan pengaruh medium pada pengukuran.

c. Uji respon metabolik

Prosedur uji respon metabolik serupa dengan uji turbidimetri akan tetapi walaupun juga dilakukan pengukuran efek dari produk fermentasi yang diujikan berdasarkan total pertumbuhan mikroba uji namun pengukuran yang dilakukan adalah pada reaksi metabolisme yang dilakukan mikroba uji selama pertumbuhannya. Beberapa reaksi metabolisme yang diukur pada pengujian ini antara lain adalah produksi asam, perubahan CO_2 , absorpsi oksigen, dan aktifitas enzim dehidrogenase.

d. Uji Enzimatik

Pengujian ini sangat spesifik, dan secara kuantitatif dalam waktu singkat dapat menentukan jumlah produk hasil fermentasi, juga dapat membedakan antara komponen yang aktif secara biologi dengan yang tidak aktif. Caranya adalah dengan menambahkan sejumlah enzim tertentu ke dalam medium kultur cair yang telah diinokulasikan mikroba uji serta ditambahkan komponen yang diujikan sehingga akan menyebabkan

terjadinya beberapa perubahan pada produk hasil fermentasi yang dapat diukur.

II. 8 Identifikasi Isolat yang Mempunyai Aktivitas Antimikroba

Deskripsi yang cermat diperlukan mengenai segala sesuatu yang kita lihat untuk identifikasi fungi. Pada umumnya identifikasi fungi, khususnya kapang, dapat dilakukan sampai genus berdasarkan sifat morfologinya. Akan tetapi untuk identifikasi sampai tingkat spesiesnya, sering kali diperlukan data sifat fisiologi dan atau biokimianya. Apabila diperlukan informasi yang lebih cermat lagi, maka gambaran yang lebih rinci akan didapatkan melalui bantuan mikroskop elektron (27).

Beberapa hal yang harus diperhatikan pada awal mempelajari kapang yang sudah ditanam pada medium yang sesuai adalah, mencatat:

1. Medium yang dipakai, suhu inkubasi, umur dan waktu deskripsi dibuat.
2. Morfologi (halus, kasar, licin, rata, menggunung dan lain-lain) dan warna koloni.
3. Warna sebalik koloni (reverse side)
4. Pengamatan mikroskopis, baik bentuk maupun ukuran bagian-bagian kapang (bentuk-bentuk sel reproduksi seksual dan aseksual, bentuk dan warna hifa, ada tidaknya rhizoid dan lain sebagainya).

Sesudah semua data terkumpul, identifikasi dapat dilakukan dengan kunci identifikasi dan monograf yang mutakhir. (27, 28)

a. Pengamatan makroskopis

Pertumbuhan koloni sebaiknya diikuti dari awal ditanam hingga saat akan dibuat preparat mikroskopis dan dicatat semua perubahan.

Yang diamati pada pengamatan makroskopis antara lain :

1. Warna dan permukaan koloni (granular, seperti tepung, menggunung; licin; ada atau tidak tetesan eksudat)
2. Garis-garis radial dari pusat koloni ke arah tepi koloni, ada atau tidak.
3. Lingkaran-lingkaran konsentris, ada atau tidak.

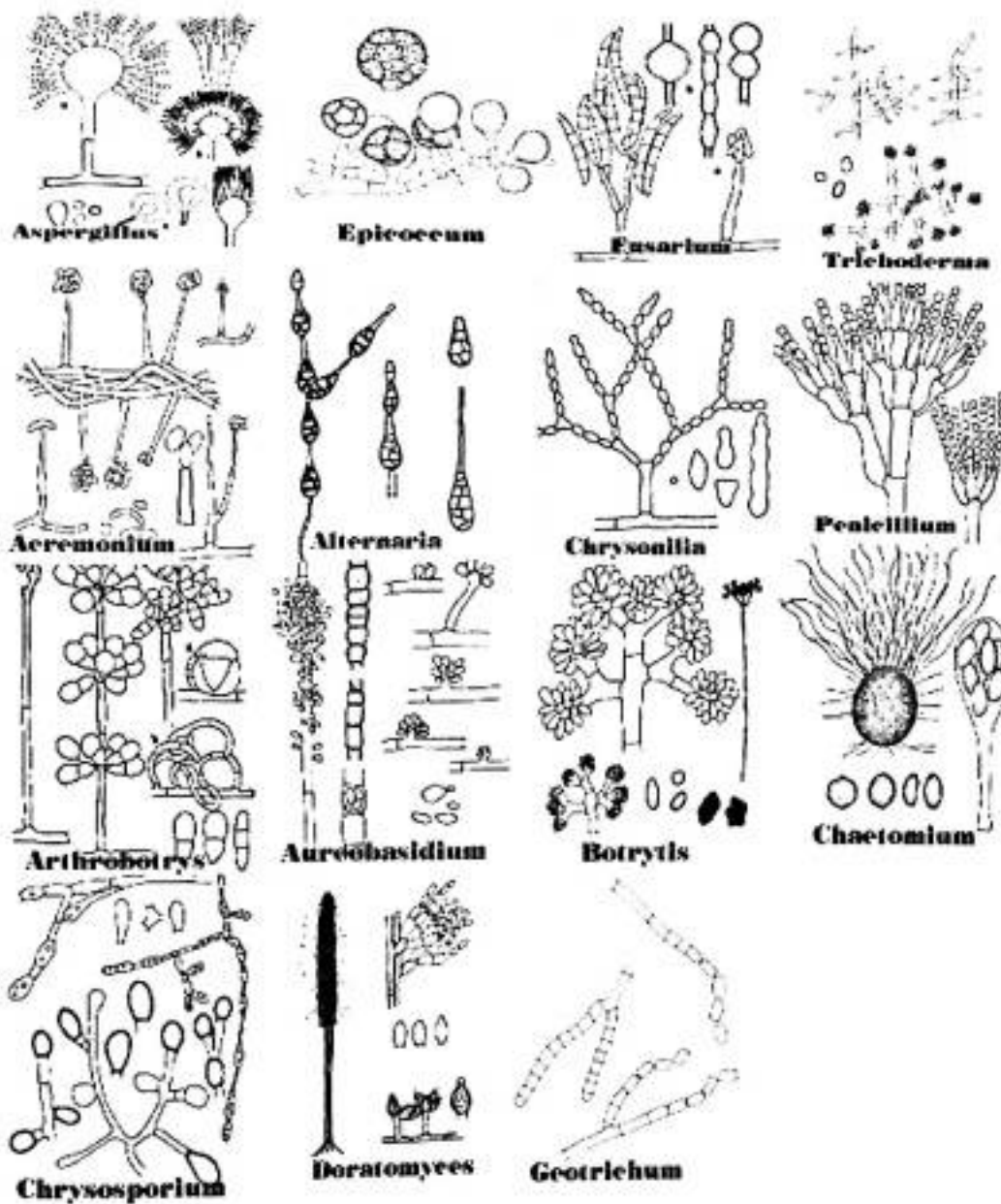
b. Pengamatan mikroskopis

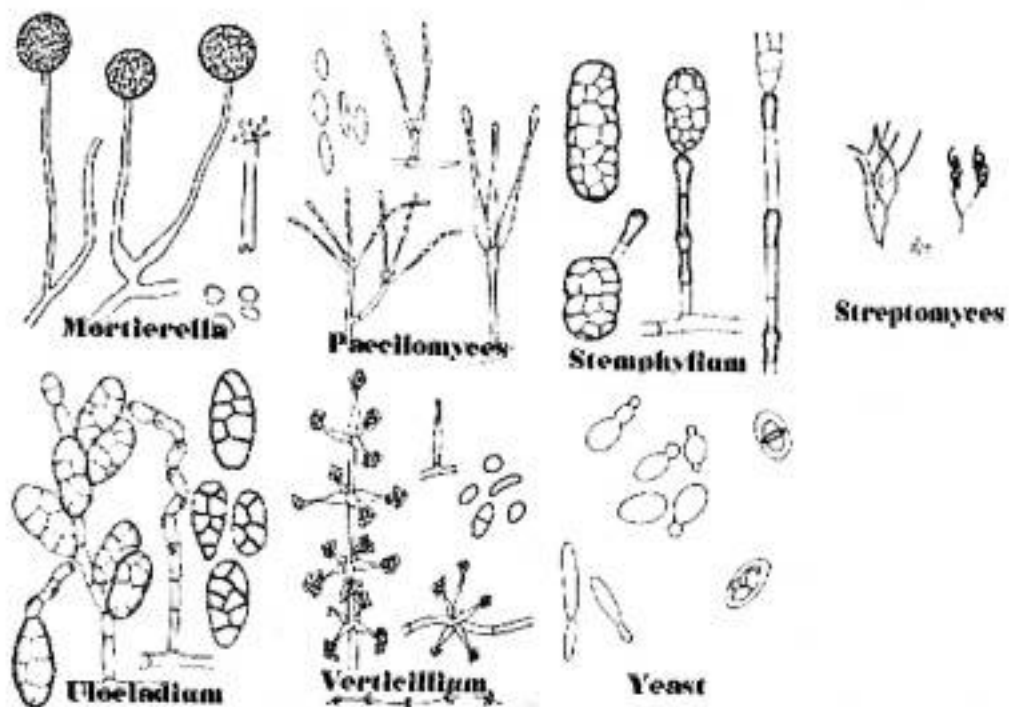
Pada pengamatan ini terlebih dahulu dibuat preparat dari miselium yang telah bersporulasi. Untuk identifikasi dapat digunakan laktofenol, laktofenol cotton blue, ataupun akuades. Hal-hal yang diamati dan perlu dicatat antara lain : (27, 28)

1. Hifa berseptum atau tidak
2. Hifa berpigmentasi hialin (tak berwarna, atau biru bila diberi cat) atau gelap.
3. Hifa berbentuk seperti spiral, atau bernodul atau mempunyai rhizoid.
4. Spora aseksual berbentuk sederhana seperti arthospora, blastospora, khlamidiospora atau sporangiospora.
5. Spora aseksual berbentuk khusus seperti konidia atau aleuspora yang dibentuk pada hifa khusus yang disebut konidiofor.
6. Ukuran spora aseksual : besar (20-100m) atau kecil (1-5mm)

7. Pengaturan spora aseksual; diproduksi tunggal atau diproduksi berantai atau berbentuk klaster.
8. Spora seksual memiliki bentuk yang bervariasi seperti askospora, basidiospora, dan zigospora bergantung kepada spesiesnya.
9. Bersel tunggal atau bersel banyak.

Di bawah ini beberapa genera umum dari fungi secara mikroskopik:





II.9 Uraian Mikroba

II.9.1 Bakteri (29)

1. *Staphylococcus aureus*

a. Klasifikasi

- Regnum : Procaryotae
 Divisio : Scotobacteria
 Class : Bacteria
 O r d o : Micrococcaceae
 Familia : Eubacteriales
 Genus : Staphylococcus
 Spesies : *Staphylococcus aureus*



b. Sifat dan morfologi

Sel berbentuk bola, terdapat tunggal dan berpasangan secara khas, membelah diri pada satu bidang sehingga bergerombol tidak beraturan dan bersifat non motil.

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif. *Staphylococcus* patogen sering dapat menghemolisis sel darah dan mengkoagulasi plasma.

Staphylococcus aureus memiliki diameter 0,8 - 1 μ m, terdapat pada rongga hidung, kulit, tenggorokan, dan saluran pencernaan manusia dan hewan. Bahan makanan yang disiapkan menggunakan tangan, seperti penyiapan sayur mentah untuk salad berpotensi untuk terkontaminasi *Staphylococcus aureus*. Jenis makanan lain yang sering terkontaminasi oleh *S.aureus* adalah daging dan produk daging, ayam, telur, salas (telur, tuna, ayam, kentang dan makaroni), produk bakeri, pastri, pai, sandwich serta susu dan produk susu. Keracunan oleh *S.aureus* diakibatkan oleh enterotoksin tahan panas yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. (29,30)

2. *Escherichia coli*

a. Klasifikasi

Regnum : Procaryotae
Divisio : Scotobacteria
Class : Bacteria
O r d o : Eubacteriales

Famili : Enterobacteriaceae

Genus : Escherichia

Spesies : *Escherichia coli*

b. Sifat dan Morfologi

Termasuk bakteri batang anaerobik fakultatif gram negatif, batang pendek ($0,5 - 1,2 \times 1,0 - 3,0 \mu\text{m}$), sel – selnya peritrikus (yakni flagella secara merata tersebar di seluruh permukaan sel) atau nonmotil. Bakteri ini, karena merupakan penghuni normal dalam saluran pencernaan manusia dan hewan, maka digunakan secara luas sebagai indikator pencernaan.

II.9.2 Kapang / jamur (30)

1. *Candida albicans*

a. Klasifikasi

Regnum : Eucaryotae

Divisio : Eumycophyta

Class : Ascomycetes

Ordo : Criptococcales

Familia : Criptococcaceae

Genus : *Candida*

Spesies : *Candida albicans*

b. Sifat dan Morfologi

Sel merupakan khamir dengan pseudopida dan menghasilkan klamidospora besar. Berdinding besar dan tebal serta berbentuk koloni yang licin seperti pasta putih dengan bau mirip khamir.

2. Aspergillus niger**a. Klasifikasi**

Regnum : Eucaryotae

Divisio : Eumycophyta

Class : Ascomycetes

Ordo : Aspergillales

Familia : Aspergilliaceae

Genus : Aspergillus

Spesies : *Aspergillus niger*

b. Sifat dan morfologi

Aspergillus niger merupakan kelas ascomycetes yang membentuk spora yang disebut konidia, dimana konidia terbentuk pada ujung pendukung konidia atau konidiophora atau dari konidia yang terbentuk sebelumnya .

Kapang ini memiliki kepala konidium yang khas dan mudah dibedakan. Bersifat saprofit, koloni yang sudah menghasilkan spora warnanya menjadi coklat kekuning-kuningan, kehijau-hijauan atau kehitam-hitaman. Miselium yang semula putih sudah tidak tampak lagi.

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf (*All American*), chamber, enkas, inkubator (*Lotb Binder*), oven (*Ecocel, Memmert*), LAF (*Laminar air Flow*) (*Envirco*), centrifugator (*DKC-1006T*), lemari pendingin (*Panasonic*), shaker (*Gemmy Orbit*), mikroskop (*Model x5z-107BN*), jangka sorong, timbangan analitik, pipet mikro (*Nesco*), tabung centrifuge, cawan petri, gelas piala, jangka sorong, pipa kapiler, pisau bedah, *stopwatch*, pinset, dan jarum ose.

Bahan-bahan yang digunakan adalah : air suling, daun dan ranting tanaman ketepeng cina (*Cassia alata L.*), etanol 70%, etil asetat, heksan, kertas cakram (*Oxoid*), kloramfenikol, medium PDA (*Oxoid*), medium PDB (*Difco*), ekstrak yeast, medium MHA, methanol 70%, natrium hipoklorit 5,3%, kasa steril, pelat KLT, biakan mikroba uji *Aspergillus niger* (ATCC16404), *Candida albicans* (ATCC10231 NCTC3179), *Escherichia coli* (ATTC25922), dan *Staphilococcus aureus* (ATTC25923).

III.2 Penyiapan Sampel Penelitian

III.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel berupa ranting dan daun tanaman ketepeng cina (*Cassia alata L.*), diperoleh di samping Baruga A.P. Pettarani Universitas Hasanuddin, Sulawesi Selatan.

III.2.2 Pengolahan Sampel

Sampel berupa ranting dan daun tanaman ketepeng cina (*Cassia alata* L.) dicuci bersih dengan menggunakan air mengalir selama 10 menit kemudian dikering anginkan. Sampel berupa daun dan ranting dipotong-potong dengan ukuran tertentu, kemudian dilakukan sterilisasi permukaan dengan cara direndam selama 1 menit dengan etanol 70% kemudian dalam larutan natrium hipoklorit (NaOCl) 5,3% selama 3-5 menit dan kemudian dalam etanol 70% selama 0,5 menit kemudian direndam beberapa kali dengan air steril . Sampel dikering anginkan dan diletakkan di atas kasa steril.

III.3 Isolasi dan Uji Aktivitas Antimikroba

III.3.1 Isolasi Fungi Endofit

Setelah kering daun dan ranting dipotong dua bagian dengan menggunakan skalpel kemudian diletakkan di atas medium PDA (*Potato Dekstrosa Agar*) yang telah ditambahkan 50 mg/l kloramfenikol dengan posisi permukaan belahan menempel pada medium. Semua cawan petri diinkubasikan pada suhu kamar ($\pm 27^{\circ}$ C) selama 3-14 hari.

III.3.2 Purifikasi Fungi endofit

Setelah masa inkubasi selesai, koloni yang tumbuh di sekitar potongan tanaman di amati dengan menggunakan kriteria : bentuk dan warna koloni yang sama dianggap sebagai isolat yang sama. Setiap koloni dipindahkan ke media baru menjadi isolat-isolat sendiri, kemudian diinkubasi selama 7 hari. Bila masih ditemukan koloni yang berbeda maka

dipisahkan kembali dan seterusnya hingga diperoleh isolat murni yaitu yang hanya mengandung satu bentuk morfologi koloni yang sama.

III.3.3 Produksi Metabolit Sekunder oleh Fungi Endofit

Setiap isolat fungi endofit ditumbuhkan dalam medium Potato Dekstrosa Yeast (*Potato Dekstrosa Broth* 26,5 g/L, ekstrak yeast 2 g/L) dan dimasukkan dalam labu kocok selama 5 hari pada suhu kamar. Hasil fermentasi segera disentrifugasi selama 10 menit sehingga terpisah menjadi 2 bagian yaitu supernatan dan endapan berupa massa sel, yang digunakan untuk uji antimikroba adalah supernatannya.

III.3.4 Uji Aktivitas Antimikroba

Media uji yang digunakan adalah MHA (*Muller Hinton Agar*) untuk uji aktivitas antibakterinya dan untuk uji aktivitas antifungi digunakan media PDA (*Potato dextrosa agar*). Ke dalam media diinokulasikan mikroba uji *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus* masing-masing sebanyak 0,1 ml dengan metode tuang. Hasil fermentasi sebanyak 20 μ L diteteskan pada kertas cakram kemudian dikeringkan, lalu diletakkan di atas media uji yang mengandung bakteri uji. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C untuk bakteri dan 72 jam pada suhu kamar untuk fungi. Zona hambatan yang terbentuk yang ditandai dengan adanya zona bening setelah masa inkubasi diukur diameternya.

III.4 Uji Kualitatif Metabolit Sekunder dari Fungi Endofit

Supernatan dari hasil fermentasi fungi endofit diambil masing-masing 30 ml diekstraksi dengan metanol 70 ml. Setelah itu ditimbang 1

gram daun ketepeng cina yang telah dikeringkan dan diserbukkan dan diekstraksi dengan methanol 70% secara maserasi selama 2 hari. Kemudian pelarutnya diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kering. Masing-masing ekstrak di ambil sedikit kemudian dilarutkan dengan methanol dan ditotol pada pelat KLT Silika Gel F₂₅₄ dengan menggunakan pipa kapiler. Kemudian sampel dikromatografi dalam wadah yang telah dijenuhkan dengan eluen (Heksan : etil= 3:1), lalu pelat dikeringkan. Pelat KLT yang telah dikeringkan kemudian diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm dan diamati nodanya.

III.5 Identifikasi Isolat yang Mempunyai Aktivitas Antimikroba

Fungi endofit yang menghasilkan senyawa antimikroba diidentifikasi secara makroskopik dengan melihat bentuk koloninya dalam media PDA dan secara mikroskopik dengan melihat bentuk morfologi selnya.

III.6 Pengumpulan dan Analisis Data

Data yang dikumpulkan berupa zona hambat yang dihasilkan oleh tiap-tiap isolat terhadap tiap-tiap mikroba uji dan karakterisasi tiap-tiap isolat yang meliputi bentuk dan warna koloni, bentuk spora dan penanda-penanda spesifik identifikasi lainnya.

III.7 Penarikan Kesimpulan

Kesimpulan diambil berdasarkan hasil data yang diperoleh.

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

Dari penelitian yang dilakukan di peroleh 4 isolat dari tanaman ketepeng cina (*Cassia alata* L.) dengan hasil pengamatan makroskopik sebagai berikut:

Tabel 1. Karakterisasi makroskopik isolat fungi endofit masa inkubasi 5 hari

Sampel / kode isolate	Pengamatan Makroskopik			
	Warna Permukaan koloni	Warna Sebalik Koloni	Lingkarannya Konsentris	Bentuk koloni
FE-C1	Putih	Kecoklatan	Ada	Tidak beraturan
FE-C2	Kecoklatan	Kecoklatan	Tidak ada	Bundar
FE-C3	Hitam	Hitam	Tidak ada	Tidak beraturan
FE-C4	Putih orange	Kekuningan	Ada	Bundar

Kemudian dikarakterisasi lebih lanjut untuk mendapatkan gambaran mikroskopik yaitu :

Tabel 2. Karakterisasi mikroskopik isolat fungi endofit

Kode isolat	Mikroskopik	
	Hifa	Spora
FE-C1	Hifa panjang dan bersepta	-
FE-C2	Hifa panjang dan bersepta	-
FE-C3	Hifa panjang dan bersepta	-
FE-C4	Hifa panjang dan bersepta	Konidia bergerombol berbentuk bukat hingga silinder



Dari uji antimikroba hasil fermentasi tiap-tiap isolat dengan menggunakan metode difusi dengan kertas cakram diperoleh data sebagai berikut :

Tabel 3. Hasil Pengamatan Diameter Daya Hambat (Aktivitas Antifungi) terhadap *Aspergillus niger* dan *Candida albicans*.

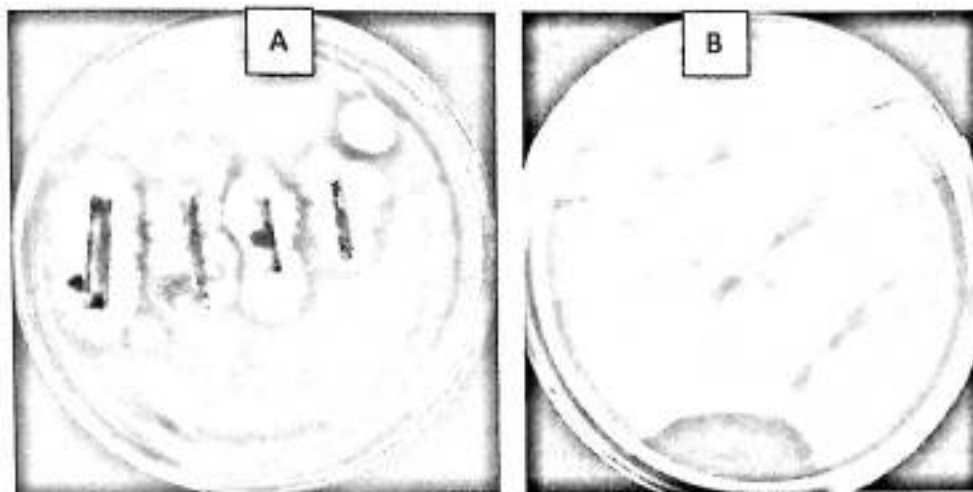
Hasil Fermentasi	Diameter Zona Hambatan (mm)	
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida albicans</i>
FE-C1	11,98	-
FE-C2	9,37	19,60
FE-C3	12,48	19,53
FE-C4	11,65	20,07
Kontrol Positif (Ketokenazol)	5,26	16,81

Tabel 4. Hasil Pengamatan Diameter Daya Hambat (Aktivitas Antibakteri) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Hasil Fermentasi	Diameter Zona Hambatan (mm)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Nilai	Nilai
FE-C1	8,13	-
FE-C2	8,33	7,73
FE-C3	11,98	8,23
FE-C4	8,80	-
Kontrol Positif (Tetrasiklin)	16,30	11,30

IV.2 Pembahasan

Telah di isolasi beberapa fungi endofit dari ranting dan daun tanaman ketepeng cina (*Cassia alata* L.). Fungi endofit dari daun dan ranting yang berhasil diisolasi dan tumbuh pada media PDA (*Potato Dextrosa Agar*) dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Fungi endofit dari ranting (A) dan daun (B) setelah inkubasi 10 hari dalam media PDA (*Potato Dextrosa Agar*)

Fungi yang tumbuh di sekitar potongan ranting dan daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) merupakan fungi endofit karena telah dilakukan sterilisasi permukaan dan dilakukan kontrol sterilitas terhadap medium dan udara sekitar daerah kerja. Kondisi sterilisasi permukaan sampel yang baik didapatkan pada kombinasi etanol 70% selama 1 menit dengan perendaman natrium hipoklorit 5,3% selama 3-5 menit, ini merupakan metode baku sterilisasi permukaan yang lazim digunakan dalam isolasi endofit (18).

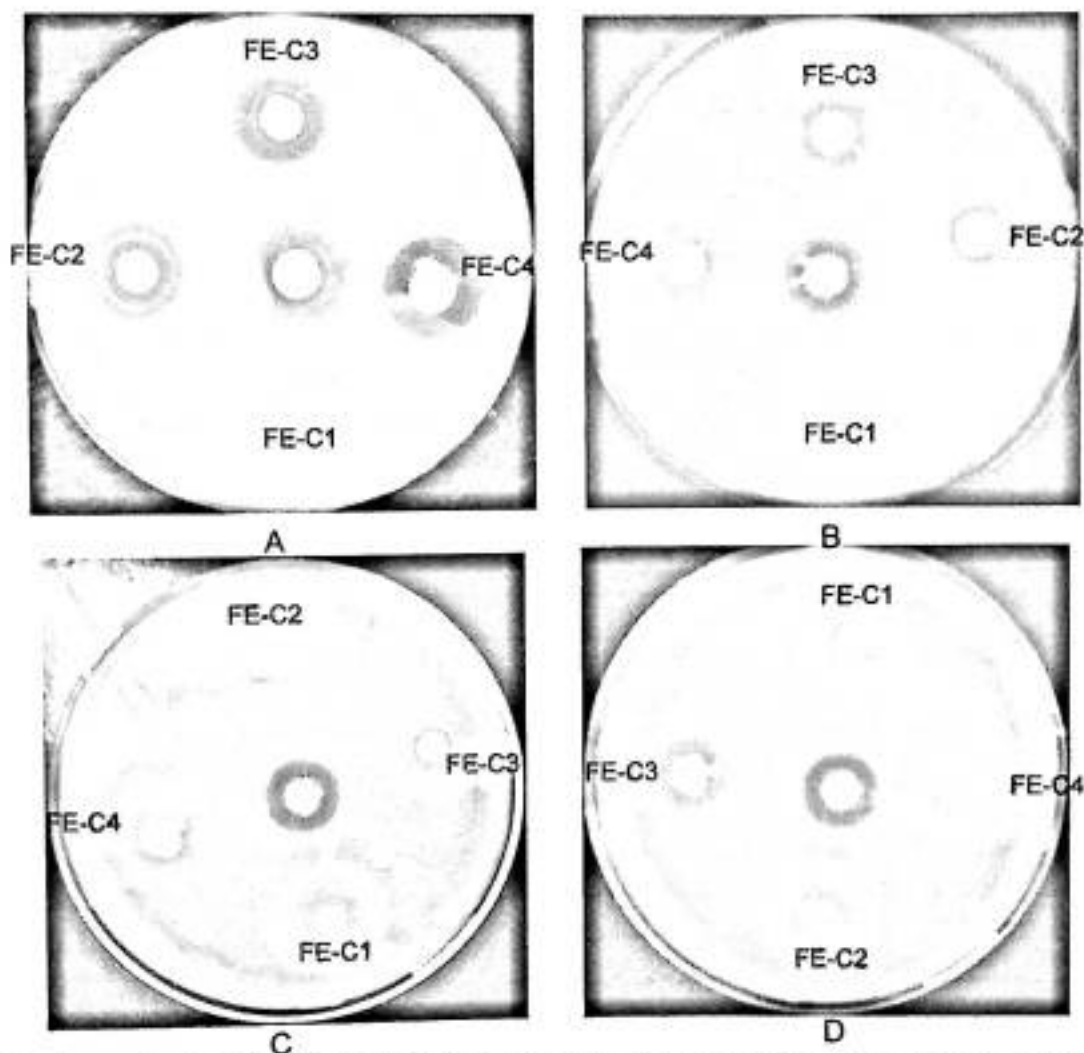
Fungi endofit dari tanaman ketepeng cina (*Cassia alata* L) mulai tumbuh pada hari ke 3 yang ditandai dengan munculnya fungi dengan

warna putih di sekitar potongan sampel yang ditanam pada medium agar. Pengamatan dilakukan selama 14 hari dan dari pengamatan tersebut dapat pada hari ke 3, 5, dan 9 tumbuh fungi dengan warna dan bentuk yang berbeda. Selama pengamatan dilakukan proses purifikasi dengan memindahkan setiap fungi yang tumbuh di sekitar potongan sampel ke media agar yang baru berdasarkan persamaan warna, bentuk koloni dan ada tidaknya lingkaran konsentris sampai diperoleh isolat fungi endofit yang murni.

Total mikroba endofit yang berhasil di isolasi dari tanaman Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) adalah 4 isolat, masing-masing 2 dari tiap bagian tanaman. Isolat yang diperoleh dari daun maupun ranting berbeda berdasarkan ciri makroskopik yang teramati meliputi warna, permukaan, ada tidaknya lingkaran konsentris dan bentuk koloni. Walaupun demikian belum ada literatur yang menyatakan adanya perbedaan yang spesifik tentang jumlah isolat endofit pada bagian tertentu dari tanaman.

Isolat yang telah diperoleh kemudian di fermentasi untuk memproduksi senyawa antimikrobanya. Zat antimikroba yang dihasilkan oleh isolat fungi endofit pada fermentasi cair dipisahkan dengan metode sentrifugasi. Yang digunakan untuk uji antimikroba adalah supernatant dari hasil fermentasi karena diyakini bahwa fungi endofit tersebut bersifat ekstraseluler yaitu mengeluarkan senyawa antimikroba ke dalam media fermentasinya.

Isolat fungi endofit yang dinyatakan mempunyai aktivitas antimikroba adalah jika terbentuk zona jernih di sekeliling isolat fungi endofit yang ditumbuhkan pada media yang telah diinokulasikan mikroba patogen. Berdasarkan hasil uji aktivitas antimikroba dari hasil fermentasi isolat fungi endofit menghasilkan potensi aktivitas antimikroba seperti terlihat pada gambar 2.



Gambar 2 Hasil Uji Antimikroba Hasil Fermentasi Isolat Fungi Endofit.
Keterangan : A. *Candida albicans*, B. *Aspergillus niger*,
C. *Staphylococcus aureus*, D. *Escherichia coli*

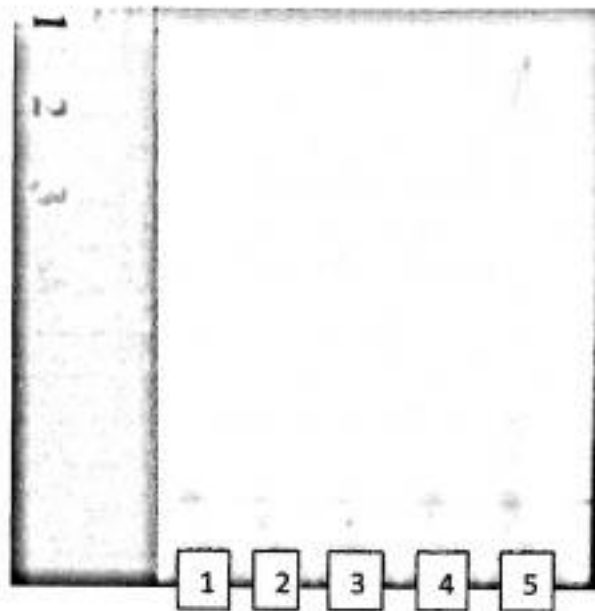
Hasil pengukuran zona penghambatan isolat terhadap mikroba patogen yang digunakan yaitu *Candida albicans*, *Aspergillus niger*,

Staphylococcus aureus, dan *Escherichia coli* dapat dilihat pada tabel 3 dan 4. Tiap isolat memberikan efek penghambatan yang bervariasi. Dari hasil pengujian semua isolat memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sumber bahan baku penghasil senyawa antimikroba.

Setelah dilakukan pengujian aktivitas antimikroba dilakukan identifikasi mikroskopik menggunakan mikroskop untuk mendapatkan gambaran awal tentang isolat fungi tersebut. Prosedur yang dilakukan yaitu pengamatan bentuk hifa dan spora. Pada tahapan ini semua isolat sulit untuk diidentifikasi secara mikroskopik dikarenakan sulit untuk menginduksi terbentuknya spora yang merupakan penanda umum pada fungi. Dari pengamatan yang telah dilakukan akhirnya diperoleh beberapa data mengenai isolat fungi endofit yaitu bentuk hifa, dimana hifa tiap isolat berseptata, memiliki banyak percabangan dan saling menumpuk. Dari penelitian yang dilakukan hanya isolat FE-C4 yang dapat diidentifikasi yaitu *Fusarium sp* dengan ciri konidiofor bercabang, fialid terbentuk pada hifa yang berbentuk ikatan dan mempunyai konidia yang bergerombol berbentuk bulat hingga silinder.

Dalam penelitian ini juga dilakukan uji kualitatif metabolit sekunder yang dihasilkan oleh fungi endofit dengan menggunakan ekstrak metanol dari daun ketepeng cina (*Cassia alata* L.) sebagai pembanding. Dari uji yang dilakukan diperoleh hasil bahwa fungi endofit yang di isolasi dari tanaman Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) mampu menghasilkan senyawa

yang ada pada tanaman asalnya, ini dapat dilihat pada noda yang terdapat pada lempeng KLT yang dielusi dengan Heksan : etil= 3:1.



Gambar 3. Hasil Uji kualitatif metabolit sekunder dengan menggunakan pelarut metanol 70 %. Ket.1. FE-C1, 2. FE-C2, 3. FE-C3, 4. FE-C4, 5. Daun tanaman ketepeng cina

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang dilakukan maka dapat disimpulkan:

1. Diperoleh 4 isolat fungi endofit dari tanaman ketepeng cina (*Cassia alata* L.).
2. Hasil uji antimikroba menunjukkan bahwa keempat isolat fungi endofit yang telah diisolasi memiliki aktivitas antimikroba.
3. Dari pengamatan mikroskopik hanya 1 isolat dapat diidentifikasi yaitu FE-C4 genus *Fusarium* sp.

V.2 Saran

1. Sebaiknya dilakukan identifikasi lanjutan terhadap isolate FEC1, FE-C2 dan FE-C3 .
2. Sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai optimalisasi medium dan teknik fermentasi dalam memproduksi senyawa antifungi dari isolat fungi endofit.
3. Sebaiknya dilakukan skrining metabolit sekunder yang dihasilkan oleh fungi endofit yang berkhasiat sebagai antifungi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Winarno, Ermin. K., Produksi Alkaloid Oleh Mikroba Endofit yang di Isolasi dari Batang Kina *Cinchona ledgeriana* Moens dan *Cinchona pubescens* Vahl. Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi. Jakarta. 2006
2. Strobel, G., Dirkse, E., Sears, J., Markworth, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*. a novel endophytic fungi. *Microbiology*. 2001. Vol 147,148
3. Petrini O dkk. *Ecology, Metabolite Production, and Substrate Utilization in Endophytic Fungi*. Wiley Liss Inc.. Swiss. 1992; Natural toxins 1 : 185-196
4. Radji, M.. *Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal*. Majalah Ilmu Kefarmasian, Desember 2005. Vol.II No 3
5. Strobel, G. Daisy, B, Castillo, U.. Natural Products from Endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. 2004. Vol. 67 hal. 2
6. Simarmata, R. dkk. Isolasi Mikroba Endofitik dari Tanaman Obat Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) dan Analisis Potensinya sebagai Antimikroba. *Jurnal Penelitian Hayati*. 2007. Vol. 13 hal. 85-90
7. Aisyah. Skrining Antimikroba Endofit Penghasil Antimikroba dari Tanaman Temu Putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe). Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Sains dan Teknologi Nasional. Jakarta. 2004. Hal. 12
8. Fatima, N.I.. Skrining Awal Fungi Endofit Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai Penghasil bahan baku Antimikroba. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Makassar. 2008
9. Fauzi, Arif. *Aneka Tanaman Obat dan Khasiatnya*. Medpress (Anggota IKAPI). Yogyakarta. 2009 hal. 61
10. Kusmardi, Kumala S., dan Triana E.. *Efek Imunomodulator Ekstrak Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Makrofag*. Makara-Kesehatan, Vol II No 2 : 50-53
11. Omar, R., Ali Rahman, Z., Latif, M.T., Lihan, T. and Adam J.H. (Eds.) *Proceedings of the Regional Symposium on Environment and Natural*

- Resources. Hotel Renaissance Kuala Lumpur, Malaysia. 10-11th April 2002, Vol 1: 654-659
12. Omar, R., Ali Rahman, Z., Latif, M.T., Lihan, T. and Adam J.H. (Eds.) Proceedings of the Regional Symposium on Environment and Natural Resources. Hotel Renaissance Kuala Lumpur, Malaysia. 10-11th April 2002. Vol 1: 509-515
 13. B. Dzulkarnain, B. Wahjoedi. *Informasi Ilmiah Kegunaan Kosmetika Tradisional*, Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 1996
 14. Van Steenis, C.G.G.J. *Flora*. Ed. 1. PT. Praditya Paramita. Jakarta. 2005. Hal.226
 15. Brooks, G. F., Butel, S J., Morse, S. A. *Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan oleh Bagian Farmakologi FK-UNAIR. 2005. Penerbit Salemba Medika, Jakarta. 2001. Hal. 8, 224
 16. Campbell, N.A., Reece, Jane B., Mitchell, Lawrence G., *Biologi*. Ed 5 Jilid 2. Terjemahan oleh Prof.Dr.Ir. Wasmen Manalu. 2003. Penerbit Erlangga. Jakarta. 1999. Hal. 185,193,194
 17. Worang, R.L. Fungi Endofit Sebagai Penghasil Antibiotika. *Makalah Individu.*, Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 2003. hal. 2
 18. Sugijanto, N.E, dkk.,. Isolasi dan Determinasi Berbagai Jamur Endofit dari tanaman *Aglaia elliptica*, *Aglaia eusideroxylon*, *Aglaia odorata*, dan *Aglaia odoratissima*. Jurnal penelitian Medika Eksakta. Agustus 2004. Vol. 5 No. 2 hal. 131, 139
 19. Ganiswara, G.S. *Farmakologi dan Terapi* edisi 4. FK-UI. Jakarta.1995. hal. 571-573
 20. Mutchler, E.. *Dinamika Obat*. Ed. 4. Penerbit ITB. Bandung. 1991. Hal 623-624
 21. Fardiaz, S.. *Fisiologi Fermentasi*. Lembaga sumber daya informasi – IPB. Bogor. 1988. Hal. 79, 105-107
 22. Wolf, F. A., Wolf, F.T. *The Fungi*. Hafner Publishing Company. New York. 1969. pg 14-15
 23. Labeda, P.D. *Isolation of Biotechnological Organism from Nature*, Mc. Graw-Hill Publishing Company, New York. 1990. pg 26-29, 260

24. Wahyudi. *Teknik Skrining Mikroba Endofit Penghasil Antibiotik*. Subdirektorat Bioteknologi, BPPT. Jakarta. 1997
25. Turner, W. B. *Fungal Metabolites*. Academic Press. London and New York. 1971. 16-18
26. Casida Jr. L. E. *Industrial Microbiology*. John Wiley and Sons, Inc., New York. 1968. 5, 7-8, 55, 100-113, 117, 219.
27. Gandjar, I., Samson, R.A. *Pengenalan Kapang Tropik Umum*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta. 1999. 2-5
28. Harrigan, W. F. *Laboratory Methods in Microbiology*. Academic Press, London. 1966. pg 83-85
29. Buchanan, R.E. dan N.E. Gibbons. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 2 Eight Edition. The Williams and Wilkins Company: Baltimore. 1975. pg 179, 290, 292, 532
30. Pelczar, M.J., dan Chan, E.C.S. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. jilid 2. diterjemahkan oleh Hadioetomo R.S.. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 1988.