



**ANALISIS KOMPONEN KIMIA DAN UJI KLT
BIOAUTOGRAFI FUNGI ENDOFIT DARI DAUN
LEGUNDI (*Vitex trifolia* Linn.)**

KARLINA AMIR TAHIR

H511 04 017

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS HASANUDDIN	
Tgl. Terima	08/10/08
Asal	FAR - FARMASI
Sampul	1 pks
Manja	Hadrah
No. Inventari	262



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2008**

**ANALISIS KOMPONEN KIMIA DAN UJI KLT
BIOAUTOGRAFI FUNGI ENDOFIT DARI DAUN
LEGUNDI (*Vitex trifolia* Linn.)**

SKRIPSI

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

KARLINA AMIR TAHIR

H511 04 017

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2008**



**ANALISIS KOMPONEN KIMIA DAN UJI KLT
BIOAUTOGRAFI FUNGI ENDOFIT DARI DAUN
LEGUNDI (*Vitex trifolia* Linn.)**

KARLINA AMIR TAHIR
H511 04 017

Disetujui oleh :
Pembimbing Utama

Dr. Gemini Alam, M.Si, Apt
NIP : 131 876 917

Pembimbing Pertama

Dra. Sartini, M.Si, Apt
NIP : 131 408 925

Pembimbing Kedua

Drs. H. Burhanuddin Taebe, M.Si, Apt
NIP : 130 355 937

Pada tanggal, Agustus 2008

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, segala kemuliaan dan puja hanya milik Allah SWT, Tuhan pemilik rahmat yang Maha Sempurna, yang atas izin-Nya sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar keserjanaan pada Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.

Banyak kendala yang penulis hadapi dalam penyusunan skripsi ini, namun berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melewati kendala-kendala tersebut. Oleh karena itu, penulis menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Kedua orang tuaku tercinta Ayahanda Amir Tahir dan ibunda Andi Mardiwati atas cinta, kasih sayang, dan doa yang selalu tercurah, dukungan moril dan materil serta nasehat yang sangat berharga juga untuk saudara-saudariku terkasih Karisma Amir Tahir, S.Psi, Yassir Amir Tahir, dan Tafsir Amir Tahir yang selalu memberiku saran, kritik, semangat, doa, dan kebersamaan kalian dalam suka dan duka.
2. Bapak Dr. Gemini Alam, M.Si, Apt sebagai pembimbing utama, ibu Dra. Sartini, M.Si, Apt sebagai pembimbing pertama, dan bapak Drs. H. Burhanuddin Taebe, M.Si, Apt sebagai pembimbing kedua yang dengan penuh kesabaran, pengertian dan rela meluangkan waktunya

dalam memberikan bimbingan dan arahan serta bantuannya selama pendidikan hingga penyusunan skripsi ini.

3. Ibu Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA selaku Dekan Fakultas Farmasi, ibu Dr. rer-nat Marianti A. Manggau selaku PD I, bapak dan ibu dosen beserta seluruh staf Fakultas Farmasi UNHAS atas segala bantuan, dukungan dan fasilitas yang diberikan selama penulis menempuh studi.
4. Bapak Drs. Abd. Muzakkir Rewa, M.Si, Apt selaku penasehat akademik yang selalu membimbing dan mengarahkan selama proses studi penulis.
5. Rusdi, S.Si, Apt, Zhulhajsyirah, S.Si, Kamaluddin, S.Si, Kak Lia, Kak Dewi, pak Syuaib yang membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini hingga penyusunan skripsi.
6. Sahabatku Ephy, Ingrid, Ewi, Kiki (partnerku peneliti fungi endofit) trims atas semua bantuan, support, dan senyuman kalian. Arni, Imha, Nini, wawan, Vivi, Anzart, Amha, Iccank, Lisa, Nong, Nita, Suci, Ve trims atas bantuannya dan seluruh teman-teman angkatan Capsule 2004 yang tidak dapat kusebutkan satu persatu atas kebersamaan dan dukungan kalian.
7. Seluruh keluargaku yang ada di Makassar dan juga yang ada di Pinrang Terima kasih atas bantuannya selama ini.



Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah banyak membantu penulis dalam berbagai hal hingga penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari akan segala keterbatasan dan kemampuan yang penulis miliki, maka penyusunan skripsi ini tentulah tidak dapat mencapai kesempurnaan, olehnya penulis mengharapkan kritik dan saran yang sifatnya membangun.

Akhirnya semoga karya kecil ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Amin.....Jaya Farmasi.....!!!

Makassar, Agustus 2008

Karlina Amir Tahir

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian analisis komponen kimia dan uji KLT bioautografi hasil fermentasi fungi endofit dari daun legundi (*Vitex trifolia* Linn.). Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis komponen kimia hasil fermentasi fungi endofit tanaman legundi dengan melihat profil KLT dan uji KLT Bioautografi untuk mengetahui efek antibakterinya. Penelitian ini menggunakan beberapa helai daun legundi yang masih segar dan ditumbuhkan fungsinya dalam media PDA, kemudian difermentasi dalam media PD-Y. Hasil fermentasi selanjutnya diekstraksi menggunakan cairan penyari heksana dan dilakukan analisis dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) menggunakan eluen heksana : etil asetat (2:1) dan diidentifikasi dengan pereaksi spesifik untuk golongan alkaloid, steroid, flavonoid. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fungi endofit legundi menghasilkan senyawa golongan steroid/terpenoid dan fenolik/tanin. Uji KLT Bioautografi menunjukkan bahwa isolat hasil fermentasi fungi endofit tidak memiliki efek antibakteri.

Kata kunci : komponen kimia, KLT bioautografi, fungi endofit, *Vitex trifolia* Linn.

ABSTRACT

The research about analysis of the chemical component of with TLC and TLC Bioautography assay of fermented result endophytic fungus from *legundi* (*Vitex trifolia* Linn.) leaves had been done. The aim of this research was to analyze the chemical component of fermented result endophytic fungus from *legundi* leaves with saw its TLC profile and Bioautography TLC assay to determine the antibacterial activity. This research used several fresh leaves of *legundi* and its endophytic fungus were grown on PDA medium and fermented in PD-Y medium. Fermented result was furthermore extracted with hexane liquid and analysis was achieved with TLC (Thin Layer Chromatography) used eluent hexane:ethyl acetate (2:1) and identified with some specific reagents for alkaloid, steroid and flavonoid. The result of this research showed that the endophytic fungus result steroid/terpenoid and phenolic/tannin compound. Bioautography TLC assay showed that the isolate from fermented result endophytic fungus had no antibacterial effect.

Key words : chemical compound, bioautography TLC, endophytic fungus,

Vitex trifolia Linn.

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENUNJUK.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II.1 Uraian Tanaman Legundi (<i>Vitex trifolia</i> Linn.).....	4
II.1.1 Klasifikasi.....	4
II.1.2 Nama Daerah.....	4
II.1.3 Morfologi.....	5
II.1.4 Tempat Tumbuh.....	5
II.1.5 Kandungan Kimia	6
II.1.6 Kegunaan	6
II.2 Fungi.....	6
II.3 Fungi Endofit.....	8

II.3.1 Pengertian Fungi Endofit.....	8
II.3.2 Klasifikasi Fungi Endofit.....	9
II.4 Isolasi Mikroba/Fungi Endofit.....	10
II.5 Fermentasi.....	14
II.6 Metabolit Sekunder.....	17
II.7 Metode Ekstraksi.....	18
II.8 Metode Pemisahan... ..	19
II.8.1 Metode Pemisahan Dengan KLT.....	19
II.9 Uraian Mikroba Uji.....	22
II.9.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
II.9.2 <i>Escherichia coli</i>	23
II.10 Antimikroba.....	24
II.10.1 Defenisi Antimikroba.....	24
II.10.2 Penggolongan Antimikroba.....	24
II.10.3 Mekanisme Kerja Antimikroba.....	25
II.11 KLT Bioatografi.....	27
II.11.1 Uraian Umum.....	27
II.11.2 Penggolongan Bioautografi.....	28
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN.....	30
III.1 Alat dan Bahan yang digunakan.....	30
III.2 Pengambilan dan Penyiapan Sampel.....	31
III.3 Isolasi Fungi Endofit	31
III.4 Pemurnian Fungi Endofit.....	31

III.5 Produksi Metabolit Sekunder	32
III.6 Analisis Komponen Kimia.....	32
III.6.1 Kromatografi Lapis Tipis.....	32
III.6.2 Identifikasi Komponen Kimia.....	33
III.6.2.1 Alkaloid.....	33
III.6.2.2 Flavonoid.....	33
III.6.2.3 Steroid.....	34
III.7 KLT Bioautografi.....	35
III.7.1 Pembuatan Medium.....	35
III.7.2 Peremajaan Bakteri Uji.....	35
III.7.3 Uji Aktivitas Antimikroba.....	35
III.8 Identifikasi Fungi Endofit.....	36
III.9 Pengumpulan dan Analisis Data.....	36
III.5 Penarikan Kesimpulan.....	36
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
IV. 1 Hasil Penelitian.....	37
IV. 2 Pembahasan.....	39
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	45
V. 1 Kesimpulan.....	45
V. 2 Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA.....	46
Lampiran	

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil identifikasi komponen kimia terhadap ekstrak Heksana dari hasil fermentasi fungi A dan fungi B.....	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Isolat Murni Fungi Endofit Daun Legundi (<i>Vitex trifolia</i> Linn.).....	37
2. Kromatogram (1) viteksikarpin dan viteosin-A murni, (2) ekstrak heksana daun legundi (3) ekstrak heksana isolat fungi A, (4) ekstrak heksana isolat fungi B (a) Dilihat pada lampu UV 254 nm (b) Dilihat pada lampu UV 366 nm (c) Setelah disemprot H ₂ SO ₄ 10%.....	41
3. Kromatogram Ekstrak Heksana Isolat (a) setelah disemprot H ₂ SO ₄ 10% (Fungi A dan B) (b) setelah disemprot Lieberman-Burchard (Fungi A) (c) setelah disemprot Vanilin-H ₂ SO ₄ (Fungi A).....	42
4. Kromatogram Ekstrak Heksana Isolat Fungi B setelah disemprot FeCl ₃ 5%.....	43
5. Hasil Identifikasi Mikroskopik Isolat Fungi A dan B.....	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
A. Skema Kerja.....	50
B. Skema Identifikasi Makroskopik dan Mikroskopik.....	51
C. Foto Tumbuhan Legundi (<i>Vitex trifolia</i> Linn.).....	52

BAB I

PENDAHULUAN

Kebutuhan obat baru selalu meningkat secara kualitatif maupun kuantitatif. Pencarian kandungan senyawa aktif untuk penggunaan obat terus dilakukan melalui isolasi terhadap tumbuhan sebagai sumber daya penting (1). Tumbuhan tersebut menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki keanekaragaman struktur dan aktivitas dan berpotensi untuk dikembangkan menjadi obat berbagai penyakit (2).

Tanaman, telah lama diketahui merupakan salah satu sumber daya yang sangat penting dalam upaya mempertahankan kesehatan masyarakat. Berdasarkan perkiraan World Health Organization (WHO), 80% penduduk dunia masih menggantungkan dirinya pada pengobatan tradisional termasuk penggunaan obat yang berasal dari tanaman. Seperempat dari obat modern beredar di dunia berasal dari bahan aktif yang diisolasi dan dikembangkan dari tanaman (3). Eksploitasi terhadap tumbuhan tersebut telah dilakukan sejak ribuan tahun dalam rangka pencarian bahan baku obat (4). Pencegahan eksploitasi berlebihan dapat dilakukan dengan cara pengembangan sistem fungi endofit.

Fungi endofit adalah fungi yang hidup berkolonisasi dalam jaringan tanaman tanpa menyebabkan efek negatif dalam tanaman tersebut (5). Fungi endofit merupakan kelompok yang menarik perhatian, dikarenakan

adanya hubungan yang terjadi antara mikroorganisme tersebut dengan berbagai jaringan tanaman. Keberadaan fungi endofit memberikan kontribusi terhadap tanaman inangnya, maka fungi endofit ini mungkin menghasilkan suatu senyawa yang potensial digunakan dalam pengobatan modern, pertanian, dan industri seperti penghasil antibiotika, antivirus, antikanker, antioksidan, insektisidal (6).

Suatu tanaman dapat dikatakan berkhasiat sebagai obat karena didalamnya terkandung suatu zat yang efektif dalam pencegahan maupun pengobatan suatu penyakit. Hasil penelusuran beberapa tanaman obat yang berkhasiat salah satunya adalah Legundi (*Vitex trifolia* Linn., suku Verbenaceae). Legundi adalah tanaman yang banyak tumbuh di Indonesia dan telah digunakan secara empiris untuk pengobatan berbagai penyakit seperti mengurangi rasa nyeri (analgetik), reumatik, asma, luka, peluruh air seni, penurun panas dan pembunuh serangga (7,8). Daun dan akar legundi mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol, disamping itu daunnya juga mengandung minyak atsiri (9), glikoflavon, alkaloid vitrisin, agnusida dan aukubin (10). Daun legundi yang difraksinasi dengan n-hexan mengandung dua komponen utama yaitu viteosin-A dan viteksikarpin yang apabila dilihat dari strukturnya termasuk golongan terpenoid dan flavonoid termetilasi yang berkhasiat sebagai trakeospasmolitik pada marmut jantan yang diinduksi dengan histamin (11).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dicari fungi endofit dari tanaman Legundi yang mampu menghasilkan golongan senyawa tertentu. Hingga saat ini belum pernah dilaporkan metabolit sekunder yang dihasilkan melalui fungi endofit dari daun legundi.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis komponen kimia hasil fermentasi fungi endofit legundi dengan melihat profil KLT nya dan uji KLT bioautografi untuk mengetahui efek antibakterinya. Fungi endofit yang mampu menghasilkan komponen senyawa dari golongan tertentu dapat digunakan sebagai bahan baku obat tanpa perlu mengambil dari tanamannya.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman *Vitex trifolia*

II.1.1 Klasifikasi Tanaman

Dunia	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
AnakDivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
AnakKelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Solanales
Suku	: Verbenaceae
Marga	: Vitex
Jenis	: <i>Vitex trifolia</i> Linn.
Sinonim	: <i>Vitex rotundifolia</i> Linn. (13)

II.1.2 Nama Daerah

Melayu	: Gendasari
Palembang	: Legundi, Lilogundi
Minang	: Langgandi
Sunda	: Lagundi
Jawa	: Legundi
Madura	: Lengghundi
Sumbawa	: Galumi
Bima	: Sangari

Kalimantan : Danuko

Makassar : Lanra

Bugis : Lawasani, Pala

Ambon : Ai Tuban (8)

II.1.3 Morfologi Tanaman

Legundi adalah suatu tanaman perdu yang segi empat, banyak cabang, tinggi sampai 4 meter. Helaian daun majemuk dengan 1 sampai 3 helai, anak daun dua atau 3 helai, bertangkai umumnya tidak utuh berwarna hijau kelabu, panjang 4 cm sampai 9,5 cm, lebar 1,75 sampai 3,75 cm, pinggir daun rata, tangkai daun lebih kurang 5 mm. Tulang daun menyirip, menonjol pada permukaan bawah. (14)

Perbungaan : ibu tangkai bunga 3,5 – 2,4 cm tiap tandan 2,6,5. Jumlah bunga 3 – 15, kelopak 3 – 4,5, tabung mahkota 7 – 8 cm, diameternya 4 – 6 mm. Sangat aromatik, tinggi tanaman 1 –4 m, berbunga sepanjang tahun, tumbuh di ketinggian 1000 – 1100 m diatas permukaan laut. (14)

II.1.4 Tempat Tumbuh

Tempat asal tumbuh yaitu di daerah asia tropik, termasuk Indonesia, tumbuhan ini tumbuh secara alami. Banyak terdapat di dataran rendah sampai pada pegunungan pada ketinggian 1100 meter, terutama di tempat yang tanahnya berpasir dan terbuka seperti hutan, pantai, ladang, sawah, dan sekitar halaman rumah. (13)

II.1.5 Kandungan Kimia

Daun dan akar legundi mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, dan polifenol, disamping itu daunnya juga mengandung minyak atsiri (9), glikoflavon, alkaloid vitrisin, agnusida dan aukubin (10). Daun legundi yang difraksinasi dengan n-hexan mengandung dua komponen utama yaitu viteosin-A dan viteksikarpin yang apabila dilihat dari strukturnya termasuk golongan terpenoid dan flavonoid termetilasi yang berkhasiat sebagai trakeospasmolitik pada marmut jantan yang diinduksi dengan histamin. (11)

II.1.6 Kegunaan

Daun legundi berkhasiat sebagai obat cacing, obat demam nifas, obat tifus, obat haid tidak teratur, peluruh air seni dan peluruh keringat (9). Selain itu digunakan sebagai obat demam (antipiretik) dan peluruh kentut atau karminatif (15) sering digunakan dalam ramuan obat tradisional di Indonesia sebagai antiasma dan trakeospasmolitik (11) dan digunakan sebagai obat tradisional untuk sakit kepala, migrain, masuk angin, dan sakit mata, mempunyai khasiat sebagai obat beri-beri, gatal-gatal, mencret, dan sakit perut, disamping itu berguna sebagai pewangi. (10)

II.2 Fungi

Fungi adalah kelompok eukariota, yang merupakan organisme unik, umumnya berbeda dari eukariota lainnya ditinjau dari cara memperoleh makanan, organisasi struktural, serta pertumbuhan dan reproduksi. Pada kenyataannya, kajian molekuler menunjukkan bahwa fungi dan hewan

kemungkinan berasal dari satu nenek moyang yang sama. Fungi merupakan protista nonfotosintetik yang tumbuh dengan bercabang, jalinan filamen (hifa) yang dikenal dengan sebutan miselium. Meskipun hifa memiliki sekat atau septa, akan tetapi septa umumnya memiliki pori yang cukup besar sehingga ribosom, mitokondria dan bahkan nukleus dapat mengalir dari satu sel ke sel lain. Sebagian besar fungi membentuk dinding selnya terutama dari kitin. (16)

Fungi menempati lingkungan yang sangat beraneka ragam dan berasosiasi secara simbiotik dengan banyak organisme. Meskipun paling sering ditemukan di habitat darat, beberapa fungi hidup di lingkungan akuatik, di mana fungi tersebut berasosiasi dengan organisme laut dan air tawar serta dengan bangkainya. Lichen, perpaduan simbiotik antara fungi dan alga, banyak terdapat di mana-mana dan ditemukan di beberapa habitat yang sangat tidak bersahabat di Bumi ini, seperti; gurun yang dingin dan kering di antartika, tundra alpin dan arktik. Fungi simbiotik lainnya hidup di dalam jaringan tumbuhan yang sehat, dan spesies lain membentuk mutualisme-mutualisme pengonsumsi-selulosa dengan serangga, semut dan rayap. (16)

Hampir semua tumbuhan bergantung pada fungi simbiotik yang membantu akarnya menyerap mineral dan air dari dalam tanah. Kita mengonsumsi beberapa jenis fungi, membiakkan fungi untuk menghasilkan antibiotik dan obat-obatan lainnya, dan menambahkan fungi

ke adonan agar adonan mengembang, serta menggunakan fungi untuk memfermentasi bir dan anggur. (16)

II.3 Fungi Endofit

II.3.1 Pengertian Fungi Endofit

Fungi endofit adalah fungi yang hidup berkolonisasi dalam jaringan tanaman tanpa menyebabkan efek negatif dalam tanaman tersebut (5). Fungi endofit merupakan kelompok yang menarik perhatian, dikarenakan adanya hubungan yang terjadi antara mikroorganisme tersebut dengan berbagai jaringan tanaman. Keberadaan fungi endofit memberikan kontribusi terhadap tanaman inangnya, maka fungi endofit ini mungkin menghasilkan suatu senyawa yang potensial digunakan dalam pengobatan modern, pertanian, dan industri seperti penghasil antibiotika, antivirus, antikanker, antioksidan, insektisidal (6).

Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit (19). 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 jamur. setiap individu tanaman merupakan inang bagi satu atau lebih mikroba endofit. Hanya beberapa dari tanaman ini yang telah diteliti biologi mikroba endofitnya. (6)

Endofit dapat memiliki beberapa efek yang menguntungkan pada inangnya dan dapat digunakan sebagai kontrol biologis bagi hama tanaman, juga dapat mempertinggi karakteristik tanaman seperti meningkatkan ketahanan terhadap kering, efisiensi nitrogen, sebagai bioherbisida dan juga memiliki efek farmakologis. (20)

Endofit berpenetrasi kedalam sel tanaman tidak hanya melalui celah alami ataupun lewat luka, tetapi tampaknya juga dapat masuk kedalam jaringan tanaman dengan menggunakan enzim hidrolitik seperti cellulase dan pektinase. (20)

II.3.2 Klasifikasi Fungi Endofit Tanaman.

Asosiasi fungi endofit dengan tumbuhan inangnya, digolongkan dalam dua kelompok, yaitu mutualisme konstitutif dan induktif. (21)

a. Mutualisme konstitutif merupakan 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.

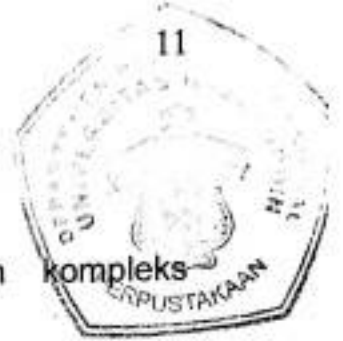
b. Mutualisme induktif adalah asosiasi antara fungi dengan tumbuhan inang, yang penyebarannya terjadi secara bebas melalui air dan udara.

Jenis ini hanya menginfeksi bagian vegetatif inang dan seringkali berada dalam keadaan metabolisme inaktif pada periode yang cukup lama.

Ditinjau dari sisi taksonomi dan ekologi, fungi ini merupakan organisme yang sangat heterogen. Petrini, menggolongkan fungi endofit dalam kelompok **Ascomycotina** dan **Deuteromycotina**. Keragaman pada jasad ini cukup besar seperti pada *Loculoascomycetes*, *Discomycetes*, dan *Pyrenomycetes*. (22) . Strobell, mengemukakan bahwa fungi endofit meliputi genus *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Monochaetia*, dan lain-lain. Sedangkan Clay, melaporkan, bahwa fungi endofit dimasukkan dalam famili *Balansiae* yang terdiri dari 5 genus yaitu *Atkinsonella*, *Balansiae*, *Balansiopsis*, *Epichloe* dan *Myriogenospora*. Genus *Balansiae* umumnya dapat menginfeksi tumbuhan tahunan dan hidup secara simbiosis mutualistik dengan tumbuhan inangnya. Dalam 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. (20, 23, 24).

II.4 Isolasi Mikroba / Fungi Endofit dari Tanaman.

Endofit dari tanaman inangnya akan sulit diperoleh dikarenakan endofit tumbuh diantara sel inangnya dan tampaknya juga endofit dapat berpenetrasi kedalam sel walaupun akan sukar untuk mengamatnya 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. (25)

Teknik Isolasi dan inokulasi kultur murni fungi merupakan prosedur penting yang menjadi dasar dalam mengembangkan studi akan struktur, perkembangan biakan, efek patogenitas, serta aktivitas fisiologis fungi. Berbagai macam prosedur telah dikembangkan guna mengisolasi kultur murni fungi. Dasar pemilihan metode ini tergantung pada beberapa faktor antara lain; jenis fungi yang diisolasi, tahapan pertumbuhan fungi, tipe kultur yang diinginkan, penilaian dari peneliti, dan utamanya adalah tingkatan kemampuan individu, keterampilan dan ketelitian. (26)

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) alkohol 95% selama beberapa detik kemudian dihilangkan dengan mencuci pada air steril, (b) merendam sampel pada larutan 1:1000 HgCl₂ selama 15-25 detik kemudian dibilas, (c) direndam dalam larutan calsium hipoklorit selama 1 menit kemudian dibilas, dan (d) direndam dalam larutan H₂O₂ 50% selama 15 detik hingga 5 menit

kemudian dibilas. Setelah itu sampel diletakkan diatas medium agar dan diinkubasi. (26)

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. (27)

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 : (28)

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 biasanya berkisar antara 1–2 %, tetapi kadang digunakan agar yang lebih lunak untuk mengisolasi beberapa mikroba tertentu. Prosedur isolasi pada agar cawan 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

koloni-koloni yang terpisah. Konsentrasi agar yang digunakan biasanya berkisar antara 1–2 %, tetapi kadang digunakan agar yang lebih lunak untuk mengisolasi beberapa mikroba tertentu. Prosedur isolasi pada agar cawan 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. (28)

II.5 Fermentasi.

Fermentasi merupakan aktivitas metabolisme mikrobial baik melalui proses aerobik ataupun anaerobik dimana terjadi perubahan kimia spesifik dari suatu substrat organik. Dan jika ditinjau dari pandangan industri mikrobiologi maka pengertian ini berkembang menjadi semua proses yang terjadi dikarenakan atau dilakukan oleh mikroorganisme yang menghasilkan produk yang bernilai ekonomis. (29)

Pada beberapa tahun belakangan ini, banyak produk hasil fermentasi mikrobial yang memiliki nilai komersil yang telah dipelajari secara intensif, tetapi dari semuanya hanya beberapa yang diterapkan hingga sekarang. Adanya proses yang lebih baik, nilai ekonomis yang rendah, kurangnya biaya untuk menghasilkan produk fermentasi telah menghambat penggunaan komersil dari berbagai produk hasil fermentasi ini, meskipun demikian di masa mendatang penggunaan secara komersil mungkin dapat terlaksana jika kondisi ini telah berubah. (29)

Pertumbuhan mikroba di dalam suatu kultur mempunyai tahapan yaitu : (28)

1. Fase adaptasi

Jika mikroba dipindahkan ke dalam suatu medium, mula-mula akan mengalami fase adaptasi untuk menyesuaikan dengan kondisi lingkungan di sekitarnya,

2. Fase pertumbuhan awal

Setelah mengalami fase adaptasi, mikroba mulai membelah dengan kecepatan yang rendah karena baru mulai menyesuaikan diri.

3. Fase pertumbuhan logaritmik

Pada fase ini mikroba membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik. Pada fase ini kultur paling sensitif terhadap keadaan lingkungan.

4. Fase pertumbuhan lambat

Pada fase ini jumlah populasi masih naik karena jumlah sel yang tumbuh masih lebih banyak daripada jumlah sel yang mati.

5. Fase pertumbuhan tetap (statis)

Pada fase ini jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Pada fase ini sel-sel lebih tahan terhadap keadaan ekstrim seperti panas, dingin, radiasi, dan bahan-bahan kimia.

6. Fase menuju kematian dan fase kematian

Pada fase ini sebagian populasi mikroba mulai mengalami kematian karena nutrisi di dalam medium sudah habis dan energi cadangan di dalam sel habis. Kecepatan kematian tergantung dari kondisi nutrisi, lingkungan, dan jenis mikroba.

Ada beberapa metode yang dapat digunakan dalam proses fermentasi mikroorganisme antara lain : (30)

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 (continuous 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.6 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder adalah hasil metabolisme yang disintesis oleh beberapa mikroba tertentu yang tidak dipergunakan sebagai kebutuhan pokok mikroba untuk hidup dan tumbuh, melainkan untuk mempertahankan eksistensinya dalam berinteraksi dengan lingkungannya. Bila proses interaksi tersebut bersifat tekanan (*stress*) bagi

mikroba, seringkali kadar metabolit sekunder yang disintesis dapat meningkat dengan pesat. (31)

Metabolit sekunder tidak diproduksi pada waktu pertumbuhan sel secara cepat (fase eksponensial), tetapi biasanya dibentuk selama fase stasioner yaitu pada saat populasi sel tetap, karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Pada fase ini sel mikroba lebih tahan terhadap keadaan ekstrim, misalnya suhu yang lebih panas atau dingin, radiasi, bahan-bahan kimia dan metabolit sekunder yang dihasilkannya. Metabolit sekunder memiliki karakteristik sebagai berikut :

(31)

1. Mempunyai struktur dasar kimia yang kompleks;
2. Dihasilkan oleh jalur biosintesis yang rumit dan panjang;
3. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri dan fungi dalam kultur cair terendam selama fase stasioner dan bukan dalam fase eksponensial; dan
4. Tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan organisme.

II.7 Metode Ekstraksi Secara Umum

Ekstrak adalah sediaan kering, kental, atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung. (32)

Penyarian adalah peristiwa pemindahan massa. Zat aktif yang semula berada di dalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga terjadi larutan zat aktif dalam cairan penyari tersebut (33). Tujuan ekstraksi

adalah untuk menarik komponen-komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam baik dari tumbuhan atau hewan dengan pelarut tertentu. Proses ekstraksi ini berdasarkan pada kemampuan pelarut organik untuk menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dalam pelarut organik dan karena adanya perbedaan konsentrasi di dalam dan di luar sel, mengakibatkan terjadinya difusi pelarut organik yang mengandung zat aktif ke luar sel. Proses ini berlangsung terus menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel. Proses ekstraksi dapat dipisahkan menjadi pembuatan serbuk, pembasahan, ekstraksi dan pemekatan. (33).

II.8 Metode Pemisahan

Pemisahan dan pemurnian komponen tumbuhan terutama dilakukan dengan menggunakan salah satu, ataupun kombinasi dari tiga teknik khromatografi yaitu Khromatografi Kertas (KK), Khromatografi Lapis Tipis (KLT), dan Khromatografi Gas-Cairan (KGC). Pemilihan teknik sebagian besar tergantung pada sifat kelarutan dan kemudahan menguap dari senyawa yang dipisahkan. (34)

II.8.1 Metode Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah cara pemisahan dengan adsorpsi pada lapisan tipis adsorben yang dapat digunakan untuk memisahkan berbagai senyawa seperti ion-ion anorganik, kompleks senyawa-senyawa organik dengan anorganik dan senyawa-senyawa organik baik yang terdapat di alam maupun senyawa-senyawa organik sintetis. (35)

Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan fisika kimia. Lapisan yang memisahkan terdiri atas berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah berupa larutan akan ditotolkan berupa bercak atau pita. Setelah pelat atau lapisan ditaruh di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok, pemisahan terjadi selama proses perambatan kapiler. Fase gerak adalah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut, yang bergerak di dalam fase diam karena ada daya kapiler. Selanjutnya senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan.(36)

Pada kromatografi lapis tipis, fase diam berupa lapisan tipis (ketebalan 0,1-2 mm) yang terdiri atas bahan padat yang dilapiskan pada permukaan penyangga datar yang biasanya terbuat dari kaca, tetapi dapat pula terbuat plat polimer atau logam. Lapisan melekat pada permukaan dengan bantuan pengikat, biasanya dengan kalsium atau amilum. (37)

Lapisan tipis sering mengandung indikator fluoresensi yang ditambahkan untuk membantu penampakan bercak tanpa warna pada lapisan yang dikembangkan. Indikator fluoresensi ialah senyawa yang memancarkan sinar tampak jika disinari dengan sinar berpanjang gelombang lain, biasanya sinar UV. Indikator fluoresensi yang paling berguna ialah sulfida anorganik yang memancarkan cahaya jika disinari cahaya pada panjang gelombang 254 nm. Beberapa senyawa organik

bersinar atau berfluoresensi sendiri jika disinari pada panjang gelombang 254 nm atau 366 nm dan dapat tampak dengan mudah. (37)

Keistimewaan KLT adalah lapisan tipis fase diamnya dan kemampuan pemisahannya. Fase diam yang umum digunakan dalam metode pemisahan senyawa alam adalah silika gel GF₂₅₄. Silika gel GF₂₅₄ dibuat dari bahan kalsium sulfat sebagai pengikatnya, dibuat dapat berfluoresensi jika dilihat pada lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm. Sebagai indikator biasanya digunakan timah kadmium atau mangan silika aktif. (37)

Kromatografi lapis tipis dapat dilakukan di dalam bejana atau wadah atau apa saja yang ditutup rapat, untuk kromatografi dengan lapisan besar harus dijenuhkan terlebih dahulu dengan pelarut sebelum dilakukan elusi. Hal ini dapat memperkecil penguapan pelarut. Penjenuhan biasanya dilakukan dengan melapisi dinding bejana dengan kertas saring. Tingkat kejenuhan bejana dengan uap pelarut pengembang mempunyai pengaruh yang nyata pada pemisahan dan letak bercak pada kromatogram. (36)

Perpindahan komponen suatu senyawa pada kromatografi ini tergantung pada jenis pelarut, zat penyerap, dan sifat daya serapnya terhadap masing-masing komponen. Komponen yang larut terbawa oleh fase gerak (cairan pengelusi) melalui adsorben (fase diam) dengan kecepatan perpindahan yang berbeda. Perbedaan kecepatan ini

dinyatakan dengan R_f (faktor retensi) yaitu perbandingan jarak yang ditempuh oleh senyawa terlarut dan jarak yang ditempuh pelarut (38).

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Harga R_f berkisar antara 0,1-0,99 dan dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain : pelarut, suhu, struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan, sifat dari penyerap dan derajat aktivitasnya, tebal, dan kerataan dari lapisan penyerap, jumlah cuplikan yang digunakan serta teknik percobaan. Identifikasi senyawa berwarna pada lempeng, biasanya digunakan sinar UV (254 dan 366 nm) dan reagen semprot (38).

II.9 Uraian Umum Mikroba Uji

II.9.1 *Staphylococcus aureus*

a. Klasifikasi (39)

Dunia	: Procaryotae
Divisi	: Firmicutes
Kelas	: Firmibacteria
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Micrococcaceae
Marga	: Staphylococcus
Jenis	: <i>Staphylococcus aureus</i>

b. Sifat dan Morfologi (40,41)

S.aureus merupakan bakteri gram positif, berbentuk bulat, bergaris tengah 0,5-1,5 μm , terdapat bergerombol seperti buah anggur, satu-satu atau berpasangan, tidak bergerak, tidak tahan asam, di atas pembenihan padat berupa koloni bulat dengan diameter 1-2 mm, sedikit cembung, amorf dan tidak transparan. Biasanya terdapat di atas permukaan kulit, saluran pernafasan bagian atas, saluran kencing, mulut dan hidung, jaringan kulit bagian dalam dari bisul bemanah, infeksi luka, radang paru-paru dan selaput lendir lainnya, dapat tumbuh pada suhu 10-45°C, suhu pertumbuhan optimum 37°C, pada pH 7,0 sampai 7,5.

II.9.2 *Escherichia coli*

a. Klasifikasi (39)

Dunia	: Procaryotae
Divisi	: Gracilicutes
Kelas	: Scotobacteria
Bangsa	: Enterobacteriales
Suku	: Eneterobacteriaceae
Marga	: Escherichia
Jenis	: <i>Escherichia coli</i>

b. Sifat dan Morfologi (40,41)

Berbentuk batang lurus, berukuran 1,1 – 1,5 X 2,0 – 6,0 μm , terdapat dalam bentuk berpasangan atau tunggal, gram negatif, non motil, fakultatif anaerobik dan kemoorganotropik. Memiliki metabolisme tipe

fermentatif dan respirasi. Suhu optimum 37°C. D-glukosa dan karbohidrat lainnya dikatabolis dengan membentuk asam dan gas. Mengandung enterotoksin dan atau faktor-faktor virulen lainnya, termasuk faktor-faktor perpindahan dan faktor kolonisasi, menyebabkan diare. *E. coli* juga penyebab utama infeksi saluran kencing dan nosokomial termasuk septemia dan meningitis.

II.10 Antimikroba

II.10.1 Defenisi Antimikroba

Antimikroba (AM) ialah obat pembasmi mikroba, khususnya mikroba yang merugikan manusia, yang dimaksudkan dengan mikroba terbatas pada jasad renik yang tidak termasuk kelompok parasit. (42)

Obat yang digunakan untuk membasmi mikroba, penyebab infeksi pada manusia, ditentukan harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Artinya, obat tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk mikroba, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes. Sifat toksisitas selektif yang absolut belum atau mungkin juga tidak akan diperoleh. (42)

II.10.2 Penggolongan Antimikroba (42)

- a. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antimikroba yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroba, dikenal sebagai **aktivitas bakteriostatik**; dan ada yang bersifat membunuh mikroba, dikenal sebagai **aktivitas bakterisid**.



- b. Berdasarkan perbedaan sifat antimikroba, dibagi menjadi dua kelompok yaitu berspektrum sempit dan berspektrum luas. Rata-rata antara kedua jenis spektrum ini kadang tidak jelas.
- c. Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok : (1) yang mengganggu metabolisme sel mikroba; (2) yang menghambat sintesis dinding sel mikroba; (3) yang mengganggu permeabilitas membran sel mikroba; (4) yang menghambat sintesis protein sel mikroba; dan (5) yang menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel mikroba.

II.10.3 Mekanisme Kerja Antimikroba (42)

1. Antimikroba yang menghambat metabolisme sel mikroba

Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidup. Berbeda dengan mamalia yang mendapatkan asam folat dari luar, kuman patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Apabila suatu zat antimikroba menang bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional. Akibatnya, kehidupan mikroba akan terganggu.

2. Antimikroba yang menghambat sintesis dinding sel mikroba

Dinding sel bakteri terdiri atas polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukan atau mengubahnya setelah dinding sel tersebut terbentuk.

3. Antimikroba yang mengganggu keutuhan membran sel mikroba

Membran sitoplasma mempertahankan bahan-bahan tertentu di dalam sel serta mengatur aliran keluar masuknya bahan-bahan lain. Membran sel memelihara keutuhan komponen-komponen seluler. Kerusakan pada membran ini akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel.

4. Antimikroba yang menghambat sintesis protein sel mikroba

Untuk kehidupannya, sel mikroba perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri atas dua sub uniti, yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Untuk berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Penghambatan sintesis protein terjadi dengan cara sebagai berikut:

- Zat antimikroba yang berkaitan dengan komponen ribosom 30S dan menyebabkan kode mRNA salah baca oleh tRNA pada waktu sintesis protein. Akibatnya, akan terbentuk protein abnormal dan nonfungsional bagi sel mikroba.
- Zat antimikroba yang berkaitan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida. Akibatnya, rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena lokasi asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru.

5. Antimikroba yang menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba

Zat antimikroba yang berkaitan dengan enzim polimerase-RNA (pada sub unit) sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Selain itu, dapat pula menghambat enzim DNA girase pada kuman yang fungsinya menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga bisa muat dalam sel kuman yang kecil.



II.11 KLT Bioautografi

II.11.1 Uraian Umum KLT Bioautografi

Bioautografi berasal dari kata bio = makhluk hidup, autografi = melakukan aktivitas sendiri. Menurut Betina (1972), bioautografi adalah suatu metode pendeteksian untuk menemukan suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan cara melokalisir aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram. Metode ini memanfaatkan pengerjaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). (43)

Bioautografi ini didasarkan atas efek biologi berupa antibakteri, antiprotozoa, antitumor dan lain-lain dari substansi yang diteliti. Ciri khas dari prosedur bioautografi adalah didasarkan atas teknik difusi agar, dimana senyawa antimikrobanya dipindahkan dari lapisan KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan dengan merata bakteri uji yang peka. Dari hasil inkubasi pada suhu dan waktu tertentu akan terlihat zone hambatan disekeliling dari spot dari KLT yang telah ditempelkan pada media agar. Zone hambatan ditampakkan oleh aktivitas senyawa aktif yang terdapat di

dalam bahan yang diperiksa terhadap pertumbuhan mikroorganisme uji.

(43)

Bioautografi dapat dipertimbangkan karena paling efisien untuk mendeteksi komponen antimikroba, sebab dapat melokalisir aktivitas meskipun dalam senyawa aktif tersebut terdapat dalam bentuk senyawa kompleks dan dapat pula diisolasi langsung dari komponen yang aktif.

(43)

II.11.2 Penggolongan Bioautografi (44)

1. Bioautografi langsung, yaitu mikroorganisme ditumbuhkan secara langsung di atas lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Prinsip kerja dari metode ini adalah suspensi mikroorganisme uji yang peka dalam medium cair disemprotkan pada permukaan KLT yang telah dihilangkan sisa eluen yang menempel pada lempeng kromatogram, setelah itu diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu.
2. Bioautografi kontak, dimana senyawa antimikroba dipindahkan dari lempeng KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan bakteri uji yang peka secara merata dan melakukan kontak langsung. Metode ini didasarkan atas difusi dari senyawa yang telah dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) atau kromatografi kertas. Senyawa antimikroba yang telah berdifusi dari lempeng kromatogram ke dalam media agar akan menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi pada waktu dan suhu yang tepat sampai noda yang

menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji tampak pada permukaan membentuk zona yang jernih.

3. Bioautografi pencelupan, yaitu medium agar yang telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri di tuang di atas lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pada prakteknya, lempeng kromatografi yang telah dielusi, diletakkan dalam cawan petri, sehingga permukaannya tertutup oleh medium agar yang berfungsi sebagai "*base layer*" setelah medium agar memadat (base layernya memadat), selanjutnya dituangi medium yang telah disuspensikan dengan kultur mikroba yang berfungsi sebagai "*seed layer*", kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai.

Beberapa modifikasi telah dilakukan terhadap metode KLT bioautografi, seperti yang telah dilakukan oleh Nicolous dkk, menuangkan medium agar dengan 2,3,5-Trifenil Terazolium Chlorida dengan TTC dan ditanami dengan organisme yang diuji di atas kromatogram. Sedangkan Kline dan Golab, menyemprotkan medium agar secukupnya pada lempeng KLT dan segera dipadatkan. Medium agar yang lainnya didinginkan pada suhu 48°C dan diinokulasikan dengan organisme yang diuji. Zona hambatan diidentifikasi setelah masa inkubasi dengan melihat langsung pada lempeng KLT yang tidak tembus cahaya. Sedangkan Bickel dkk, menindihkan lempeng kromatografi pada medium agar pembedahan. (43)

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan Yang Digunakan

Alat-alat yang digunakan adalah Oven listrik (Memmert), Autoklaf, Inkubator, Tabung reaksi, Erlenmeyer flash, Gelas kimia (Bayker), Cawan petri besar dan kecil, LAF (Laminar Air Flow), Corong pisah, Gelas ukur (Pyrex), Dek glass, Pipet tetes, Pipet skala, Mikroskop, Timbangan analitik (Sartorius), Pinset, Pisau bedah, Gunting bedah, Stopwatch, Lampu spiritus, Chamber, Lampu spiritus, Lampu UV 254 dan 366.

Bahan-bahan yang digunakan adalah daun Legundi (*V. trifolia* Linn.), Potato Dextrose Agar (Difco), Potato Dextrose Broth (Difco), Yeast extract (Difco), Larutan hipoklorit 5,25% (Bayclin[®]), Aquadest, Etanol 70%, Kloroform, Metanol, Heksana, Etil asetat, Spiritus, Asam sulfat 10%, Aluminium foil, Kapas, Kloramfenikol, Kertas saring, Penotol, Pereaksi FeCl_3 5%, Pereaksi Vanilin- H_2SO_4 , Pereaksi Lieberman-Burchard, Pereaksi AlCl_3 5%, Pereaksi Sitroborat, Pereaksi Dragendorf, Lempeng KLT Silika gel GF₂₅₄- (Merck), Nutrien Agar (NA), Muller Hilton Agar (MHA).

diangkat dari permukaan medium. Cawan Petri kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambatan akan terlihat pada medium agar, dan dibandingkan dengan kromatogram hasil pengujian KLT.

III.8 Identifikasi Fungi Endofit

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.9 Pengumpulan dan Analisis Data

Data yang dikumpulkan berupa hasil analisis komponen kimia dan zona hambat yang dihasilkan oleh isolat terhadap tiap-tiap bakteri uji serta karakterisasi isolat yang meliputi bentuk dan warna koloni, bentuk spora dan penanda-penanda spesifik identifikasi lainnya.

III.10 Penarikan Kesimpulan

Kesimpulan diambil berdasarkan hasil data yang diperoleh.

III.7 KLT Bioautografi

III.7.1 Pembuatan Medium

1. Medium Nutrien Agar (NA)

Sebanyak 3 g ekstrak beef, 5 g pepton dan 15 g agar dicampur dan dilarutkan dengan air suling sampai 1 liter, kemudian dipanaskan dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2. Medium Muller Hilton Agar (MHA)

Sebanyak 38 g Muller Hilton Agar dilarutkan dengan air suling sampai 1 liter, kemudian dipanaskan dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

III.7.2 Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri uji masing-masing diambil satu ose, kemudian diinokulasikan dengan cara digoreskan pada medium NA miring, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Mikroba uji yang telah diremajakan, disuspensikan dengan larutan NaCl 0,9% steril sampai diperoleh 25% T yang diukur dengan spektrofotometer, sebagai blanko digunakan larutan NaCl 0,9%.

III.7.3 Uji Aktivitas Antimikroba

Medium MHA steril didinginkan sebanyak 10 ml kemudian diinokulasikan dengan bakteri uji (bakteri *S. aureus* dan *E. coli*) sebanyak 0,5 ml dan dituang ke dalam cawan Petri steril dan dilakukan secara aseptis. Setelah medium mulai memadat, lempeng KLT yang telah dielusi diletakkan di atas permukaan agar. Setelah 30 menit, lempeng tersebut

20 ml metanol) pada profil KLT ekstrak uji. Hasil positif jika bercak noda pada lempeng menunjukkan warna kuning.

III.6.2.3 Steroid

a. Lieberman-Burchard

Identifikasi senyawa steroid dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi Lieberman-Buchard (3 ml asam asetat anhidrat dan 3 ml H_2SO_4 pekat dalam 24 ml etanol absolut) pada profil KLT ekstrak uji. Hasil positif jika bercak noda pada lempeng menunjukkan warna ungu.

b. Vanilin- H_2SO_4

Identifikasi senyawa steroid dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi Vanilin- H_2SO_4 (1 gram vanilin dalam 100 ml H_2SO_4 pekat) pada profil KLT ekstrak uji. Kemudian dipanaskan. Hasil positif jika bercak noda pada lempeng menunjukkan warna merah ungu.

c. H_2SO_4 10%

Identifikasi senyawa steroid dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi H_2SO_4 10% (5,1 ml H_2SO_4 pekat dalam 50 ml air) pada profil KLT ekstrak uji. Kemudian dipanaskan. Hasil positif jika bercak noda pada lempeng menunjukkan warna merah keunguan.

III.6.2 Identifikasi Komponen Kimia

III.6.2.1 Alkaloid

Identifikasi senyawa alkaloid dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi Dragendorf ((1) 0,6 gram bismutsubnitrat dalam 2 ml HCl pekat dan 10 ml air (2) 6 gram KI dalam 10 ml air. Larutan 1 dan 2 dicampur dengan 7 ml HCl pekat dan 15 ml air) pada profil KLT ekstrak uji. Hasil positif jika bercak noda pada lempeng menunjukkan warna coklat jingga dengan latar belakang kuning.

III.6.2.2 Flavonoid

a. FeCl_3 5%

Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi FeCl_3 5% (5 gram FeCl_3 dalam 100 ml etanol absolut) pada profil KLT ekstrak uji. Hasil positif jika bercak noda pada lempeng menunjukkan warna hijau kehitaman.

b. AlCl_3 5%

Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi AlCl_3 5% (5 gram AlCl_3 dalam 100 ml etanol absolut) pada profil KLT ekstrak uji. Hasil positif jika bercak noda pada lempeng menunjukkan warna kuning.

c. Sitroborat

Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan menyemprotkan pereaksi Sitroborat (0,5 gram asam sitrat dan 0,5 gram asam borat dalam

koloni yang murni dipindahkan ke media PDA agar miring untuk disimpan sebagai *stock culture*.

III.5 Produksi Metabolit Sekunder dari Fungi Endofit (12)

Isolat fungi endofit yang diperoleh kemudian difermentasikan dalam 50 ml media PD-Y (Potato Dextrose Broth 26,5 g/l, Yeast extract 2g/l) pada suhu kamar selama 5-7 hari. Koloni dan supernatan yang terbentuk dipisahkan dan diambil supernatannya (hasil fermentasi). Hasil fermentasi diekstraksi dengan 50 ml n-Heksana dengan menggunakan corong pisah selama 1 menit hingga diperoleh dua lapisan yaitu lapisan atas merupakan lapisan heksana dan lapisan bawah merupakan lapisan air. Hal ini dilakukan sebanyak 3 kali. Kemudian lapisan heksana diuapkan pada suhu kamar hingga diperoleh ekstrak kering.

III.6. Analisis Komponen Kimia

III.6.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak uji yang telah diuapkan tadi kemudian ditotolkan pada lempeng silika gel GF 254 dan dielusi dengan eluen heksana : etil asetat (2:1). Bercak yang diperoleh diamati di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya, profil yang diperoleh lalu diidentifikasi komponen kimianya dan dilakukan uji aktivitas antibakterinya menggunakan metode KLT Bioautografi.

III.2 Pengambilan dan Penyiapan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun dari tanaman legundi (*V. trifolia* Linn.) yang diambil di Program Reguler Sore Fakultas Farmasi UNHAS Makassar.

Tanaman yang digunakan adalah bagian daun dari tanaman legundi yang masih segar. Sampel dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Setelah pencucian bagian-bagian tanaman dipotong kecil-kecil, selanjutnya dilakukan desinfeksi berturut-turut dengan larutan etanol 70% selama 60 detik, NaOCl 5,25% selama 90 detik, etanol 70% selama 30 detik. Potongan tanaman dikeringkan di atas kertas saring steril, kemudian dipotong-potong kecil kembali. Selanjutnya tiap potongan dibelah menjadi 2 bagian yang sama secara longitudinal.

III.3 Isolasi Fungi Endofit

Potongan sampel tanaman yang sudah disterilkan ditanam pada cawan petri yang berisi media PDA yang diberi kloramfenikol 0,05% secara aseptik. Kemudian diinkubasi pada suhu kamar 5 sampai 21 hari tergantung tingkat pertumbuhan fungi. Isolat yang diperoleh diamati bentuk dan warna koloni, selanjutnya diamati di bawah mikroskop.

III.4 Pemurnian Fungi Endofit

Koloni-koloni fungi yang tumbuh masing-masing dipindahkan ke dalam cawan yang berisi media PDA dan diinkubasi selama 3 – 7 hari, dilakukan berulang-ulang hingga diperoleh koloni yang murni. Setiap

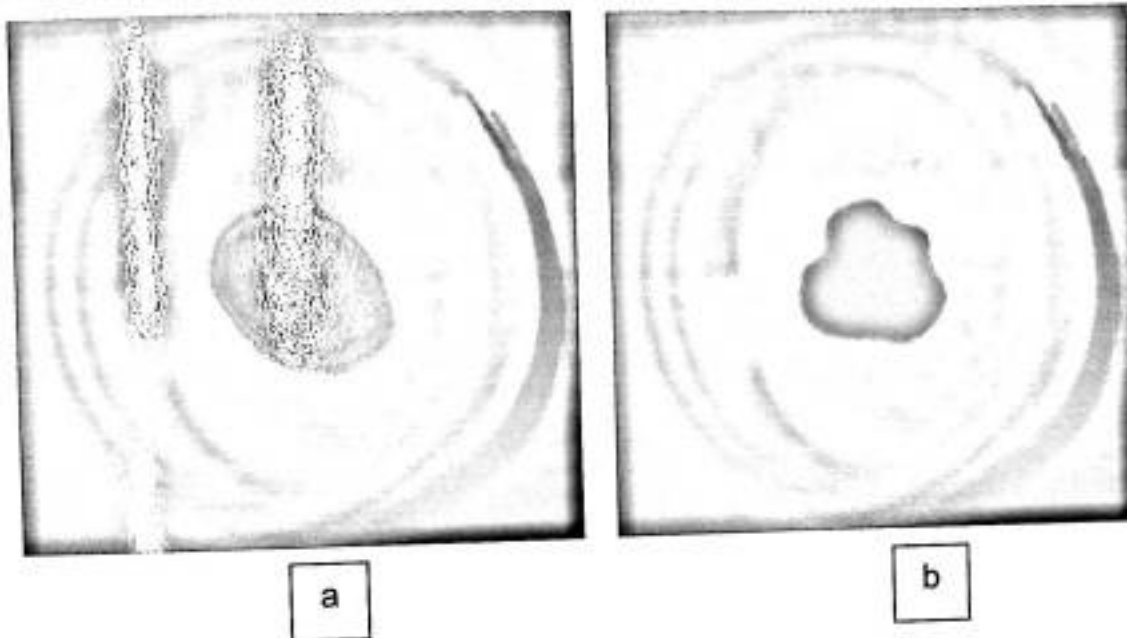
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN



IV.1 Hasil

Berdasarkan hasil orientasi diperoleh 2 isolat fungi yaitu isolat A dan B. Hal ini dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Isolat Murni Fungi Endofit Daun Legundi (*V. trifolia* Linn.)
(a) Isolat Fungi A
(b) Isolat Fungi B

Setelah isolat fungi A dan B difermentasi selama 7 hari pada suhu kamar dengan menggunakan medium PD-Y (Potato Dextrose Broth dan Yeast Extract), hasil fermentasi kemudian diekstraksi dengan heksana dan selanjutnya diuapkan hingga diperoleh ekstrak heksana kering (14,128 gram). Ekstrak heksana yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan metode kromatografi lapis tipis dengan eluen heksana:etil asetat (2:1). Hasil analisis KLT menunjukkan bahwa ekstrak heksana isolat fungi A dan

B tidak mengandung alkaloid dan flavonoid. Fungi A menghasilkan senyawa golongan steroid/terpenoid dan fungi B mengandung fenolik/tanin sebagai metabolit sekunder yang dihasilkan. Hal ini dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Identifikasi Komponen Kimia Terhadap Ekstrak Heksana dari Hasil Fermentasi Fungi A dan B

No	Pereaksi penampak noda	Warna		Nilai Rf	
		Fungi A	Fungi B	Fungi A	Fungi B
1	Dragendorf	-	-	-	-
2	FeCl ₃ 5%	-	Hijau kehitaman	-	0,5
3	AlCl ₃ 5%	-	-	-	-
4	Sitroborat	-	-	-	-
5	Lieberman-Burchard	Ungu	-	0,8	-
6	Vanilin - H ₂ SO ₄	Ungu	-	0,8	-
7	H ₂ SO ₄ 10%	Ungu	Ungu	0,6	0,6

Berdasarkan hasil Bioautografi diperoleh bahwa ekstrak heksana dari hasil fermentasi isolat fungi A dan B tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri.

1.2 Pembahasan

Sampel tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah daun legundi yang termasuk dalam famili Verbenaceae. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komponen kimia yang dihasilkan oleh fungi endofit dari daun legundi dan bagaimana efek antibakteri hasil fermentasi dari fungi endofit legundi.

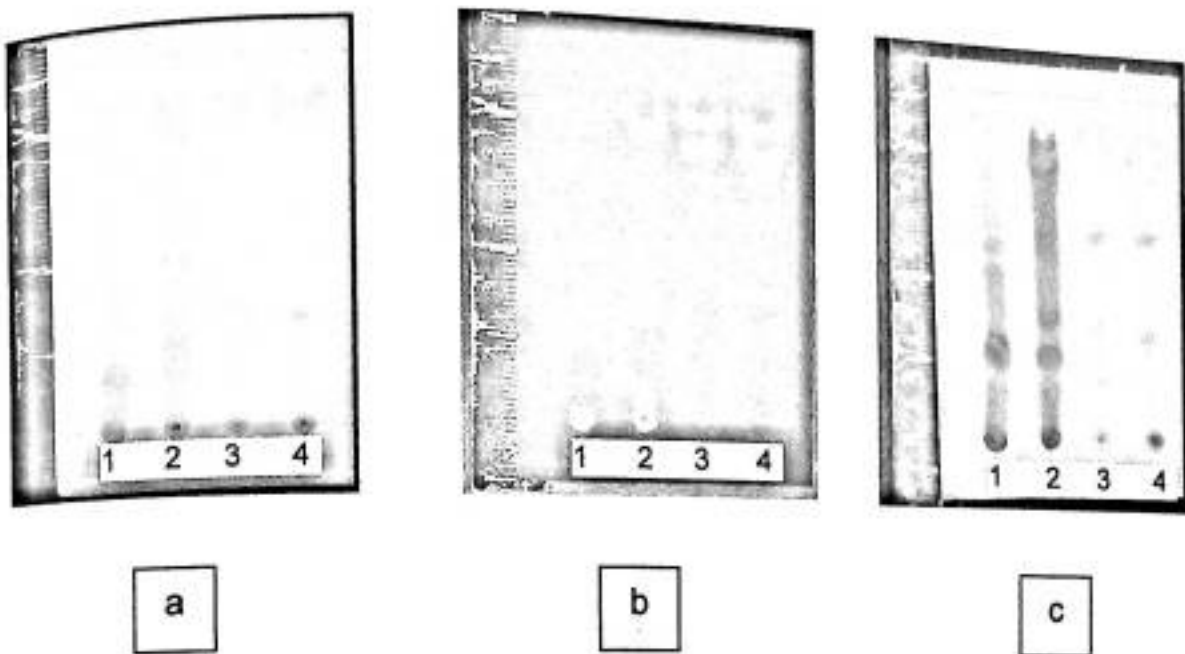
Isolasi fungi endofit ini diperoleh dua isolat yaitu isolat A dan isolat B. Hal ini dapat dilihat pada gambar 1.

Dalam hal isolasi jamur endofit ini dilakukan sterilisasi permukaan dikarenakan dikhawatirkan adanya kontaminan pada permukaan sampel sehingga isolat yang diperoleh bukan isolat murni melainkan kontaminasi lingkungan. Kondisi sterilisasi permukaan sampel yang baik didapatkan pada kombinasi etanol 70% v/v selama 1 menit dengan perendaman dalam NaOCl 5,25% selama 1,5 menit. Penggunaan etanol dan NaOCl lazim digunakan sebagai bahan sterilisasi permukaan dalam menumbuhkan kalus pada kultur jaringan tanaman dan mikroba endofit dari bagian tumbuhan. Waktu perendaman membutuhkan penyesuaian dengan kondisi lingkungan, umumnya dilakukan selama satu menit hingga tujuh menit (45). Etanol berfungsi sebagai surfaktan dan NaOCl adalah bahan untuk sterilisasi yang sebenarnya.

Isolasi fungi digunakan media PDA (Potato Dextrose Agar) yang merupakan media umum untuk pertumbuhan fungi. Pada media isolasi dapat dilakukan beberapa tindakan pencegahan kontaminasi bakteri

dimana terkadang dapat pula memanfaatkan substrat yang sama dengan fungi. Hal ini dapat dicegah dengan mengatur pH medium pada kisaran 3,5 – 5,5 dengan menambahkan asam tartrat 0,5% atau penambahan antibiotik kloramfenikol 0,05% setelah medium disterilkan, kloramfenikol merupakan antibiotik berspektrum luas yang efektif sebagai bakterisid pada konsentrasi 0,05%.

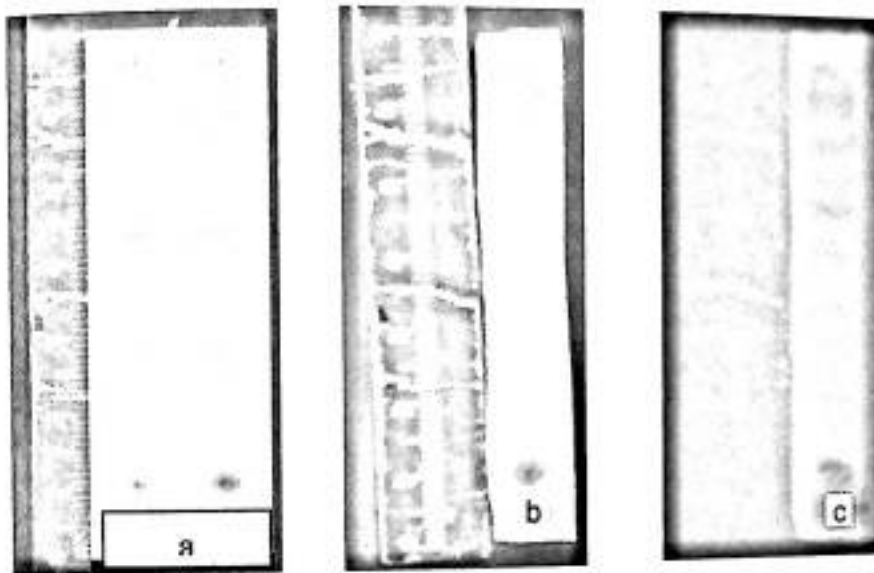
Isolat murni yang telah diperoleh (A dan B), dilanjutkan dengan fermentasi cair untuk memproduksi senyawa-senyawa tertentu atau metabolit sekunder menggunakan medium PD-Y (Potato dekstroza broth + yeast extract) selama tujuh hari pada suhu kamar, dimana ekstrak yeast merupakan sumber nitrogen dan juga mengandung asam-asam amino dan peptida, vitamin larut air dan karbohidrat. Hasil fermentasi selanjutnya diekstraksi dengan heksana hingga diperoleh ekstrak heksana kering. Berdasarkan hasil penelitian maka penelitian ini difokuskan pada isolat ekstrak heksana fungi A dan B dengan alasan adanya bercak dengan nilai Rf sebesar 0,6 yang merupakan bercak spesifik yang tidak dihasilkan oleh ekstrak heksana tanaman asal dan tidak sama dengan bercak pada viteksikarpin dan viteosin-A murni yang merupakan pembanding. Bercak ini diidentifikasi sebagai senyawa golongan steroid. Hal ini dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 2. Kromatogram dengan Menggunakan Eluen Heksana : Etil asetat (2:1) terhadap (1) viteksikarpin dan viteosin-A murni, (2) ekstrak heksana daun legundi (3) ekstrak heksana isolat fungsi A, (4) ekstrak heksana isolat fungsi B
 (a) Dilihat pada lampu UV 254 nm
 (b) Dilihat pada lampu UV 366 nm
 (c) Setelah disemprot H_2SO_4 10%

Pada penelitian ini dilakukan analisis komponen kimia terhadap metabolit sekunder yang dihasilkan oleh fungsi A dan B ekstrak heksana. Setelah diperoleh profil KLT yang baik yaitu pada eluen heksana : etil asetat (2:1), selanjutnya dilakukan identifikasi golongan komponen kimia. Analisis bercak KLT menggunakan H_2SO_4 10% dengan nilai Rf pada kedua fungsi A dan B masing-masing 0,6, Lieberman-Burchard dan Vanilin- H_2SO_4 dengan nilai Rf sebesar 0,8 cm, tetapi bercak spesifik hanya terdapat pada fungsi A. Hal ini menunjukkan bahwa bercak tersebut merupakan golongan senyawa steroid. Selanjutnya dilakukan analisis bercak KLT menggunakan $FeCl_3$ 5% dan diperoleh bercak spesifik hanya pada fungsi B dengan nilai Rf 0,5. Hal ini menunjukkan bahwa bercak

tersebut merupakan golongan senyawa fenolik/tannin. Profil KLT dapat dilihat pada gambar 3 dan 4. Pada analisis bercak menggunakan Dragendorff, $AlCl_3$ dan Sitroborat semuanya menunjukkan hasil yang negatif.



Gambar 3. Kromatogram Ekstrak Heksana Isolat Fungi dengan Menggunakan Eluen Heksana : Etil asetat (2:1)
(a) setelah disemprot H_2SO_4 10% (Fungi A dan B)
(b) setelah disemprot Lieberman-Burchard (Fungi A)
(c) setelah disemprot Vanilin- H_2SO_4 (Fungi A)



Gambar 4. Kromatogram Ekstrak Heksana Isolat Fungi B dengan Menggunakan Eluen Heksana : Etil asetat (2:1)
(a) setelah disemprot FeCl_3 5%

Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode KLT Bioautografi dilakukan untuk menguji efek antibakteri ekstrak heksana dari hasil fermentasi isolat fungi A dan B terhadap pertumbuhan bakteri uji (*S. aureus* dan *E. coli*). Pemisahan dengan KLT dilakukan dengan fase diam silika gel dengan fase gerak berupa campuran heksana : etil asetat (2:1). Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa semua bercak pada kromatogram tidak menghambat pertumbuhan bakteri uji baik terhadap *S. aureus* maupun *E. coli*.

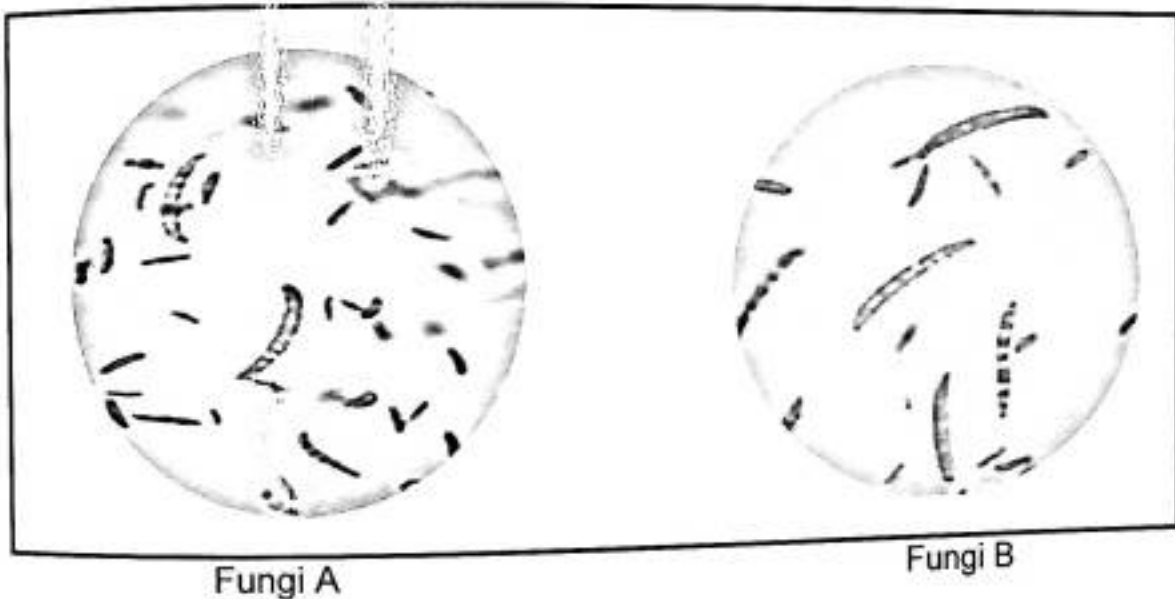
Identifikasi isolat fungi A dan B secara makroskopik menunjukkan :

- a. Isolat Fungi A : Koloni berwarna kehitaman, bentuk bulat, agak basah seperti beludru.
- b. Isolat fungi B : koloni berwarna kehitaman, bentuk tidak beraturan, agak basah seperti beludru. Hal ini dapat dilihat pada gambar 1

Identifikasi isolat fungi A dan B secara mikroskopik menunjukkan :

- a. Isolat fungi A : Konidia tunggal (tidak bercabang), bentuk batang (basil) dengan ujung agak runcing panjang dan ada yang pendek dan bersepta.
- b. Isolat fungi B : Konidia tunggal (tidak bercabang), bentuk batang (basil) dengan ujung agak runcing dan kebanyakan memanjang, serta bersepta.

Hal ini dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Hasil Identifikasi Mikroskopik Isolat Fungi A dan B

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

1. Diperoleh dua isolat fungi endofit dari daun legundi (*V. trifolia* Linn.).
2. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menunjukkan isolat fungi endofit A menghasilkan golongan senyawa steroid/terpenoid sedangkan isolat fungi B menghasilkan golongan fenolik/tanin.
3. Metabolit sekunder yang dihasilkan dari kedua isolat fungi endofit hasil fermentasi menunjukkan tidak adanya aktivitas antibakteri antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli*.

V.2 Saran

1. Sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai optimalisasi medium dan teknik fermentasi dalam memproduksi senyawa-senyawa tertentu dari isolat yang aktif.
2. Sebaiknya dilakukan pembuktian lebih lanjut melalui studi elusidasi struktur dari hasil identifikasi komponen kimia yang diperoleh.
3. Sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai identifikasi sumber nutrisi yang diperoleh dari tanaman asalnya untuk dibandingkan dengan sumber nutrisi dari fungi endofit.
4. Sebaiknya dilakukan ekstraksi intraseluler dari fungi endofit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wahyuono, S., dkk. 1999. Characterization of Bioactive Substance α Mangostin Isolated from The Hull of *Garcinia Mangostana* L., *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol 10 No. 3. 127-134
2. Sidik, R. 2004. *Tanaman Obat Kekayaan Hayati Terabaikan*. *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol IV No. 4
3. Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol II No. 3. 113-126
4. Strobel, G. 2004. *Natural Products from Endophytic Microorganism*. *J Nat Prod*. Vol 67. 257-268
5. Mahesh, B., Tejesvi, M.V., et all. 2005. Endophytic Mycoflora of Inner Bark of *Azadirachta indica* A. Juss. *Current Science*. Vol 88 No.2. 218-219
6. Strobel, G., and Daisy, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol 67 No. 4. 491-502
7. Pujiastuti., dan Hendarti, N. 1999. Penelusuran Beberapa Tanaman Obat Berkhasiat Sebagai Analgetik. *Media Penelitian dan Pengembangan kesehatan*. Vol 9. 20-22
8. Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Edisi I. Badan Penelitian dan Pengembangan Departemen Kehutanan. Jakarta. 1680-1681
9. Syamsulhidayat, S.S, Hutapea, J.R. 1993. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Jilid I. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 588-589
10. Alam, G. 2004. Pharmacognosy of *Vitex trifolia* L. *Majalah Obat Tradisional*. Vol 9 No. 30 : 15.
11. Alam, G., Wahyuono, S., Ganjar, I., Hakim, L., Timmermen, H., & Verpoorte, R. 2002. Tracheospasmolytic Activity Viteosin-A and Vitexicarpin Isolated from *Vitex trifolia*. *Planta Medica*. Vol. 68. 1047-1049.

37. Gritter, R.J., Bobbits, J.M dan Schwating, A.E. 1985. *Pengantar Kromatografi*. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata. 1991. Edisi II. ITB. Bandung. 10-11
38. Hostettmann, K. Hostettmann, M. Marston, A. 1985. Cara Kromatografi Preparatif Penggunaan pada Isolasi Senyawa Alam. Penerjemah Dr. Kosasih Padwamawinata. Penerbit ITB. Bandung. 10
39. Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Eight Edition. The Williams and Wilkins Company. Baltimore. 290, 292.
40. Bonang, C & Koeswandono, E. S. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran*. PT Gramedia. Jakarta. 318, 163
41. Brooks, Geo F., Butel, S Janet. Morse, Stephen A. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan oleh Bagian Farmakologi FK-UNAIR. 2005. Penerbit Salemba Medika. Jakarta. 224, 235
42. Ganiswara, S. G., Setabudy R., Suyatna F.D., Purwastyastuti., Nafrialdi (eds). 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi IV. Bagian Farmakologi Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 571 – 573
43. Djide, M. N., Sartini, Kadir S. 2006. *Analisis Mikrobiologi Farmasi*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas MIPA UH. Makassar. 295-298
44. Choma, I. 2005. *The Use of Thin-Layer Chromatography With Direct Bioautography For Antimicrobial Analysis*. <http://www.lcgeurope.com/lcgeurope> solutions for separation scientists. Diakses Juni 2008
45. Sugijanto, N.E, Indrayanto, G. & 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. 132, 137-138

25. Strobel, Gary., Daisy, Dryn., 2002, *Naphthalene, an insect repellent is produce by Muscodor vitigenus, a novel endophytic fungus*, Microbiology, vol. 148 agustus 2002. 3737-3738.
26. Wolf, F. A., Wolf, F.T. 1969. *The Fungi*. Hafner Publishing Company. New York. 14-15
27. Labeda, P David., 1990, *Isolation of Biotechnological Organism from Nature*, Mc. Graw-Hill Publishing Company, New York. 26-29, 260
28. Fardiaz, Srikandi. 1988, *Fisiologi Fermentasi*, Lembaga sumber daya informasi – IPB, Bogor. 79, 105-107
29. Casida Jr. L. E. 1968, *Industrial Microbiology*. John wiley and sons.inc, New York. 5, 7-8, 55, 100-113,117, 219.
30. Turner, W. B. 1971. *Fungal Metabolites*. Academic Press. London and New York. 16-18
31. Aisyah, I. 2004. Skrining Mikroba Endofit Penghasil Antimikroba Dari Tanaman Temu Putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe) Terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* Dan *Aspergillus niger*, *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Sains dan Teknologi Nasional. Jakarta. 2, 11-13.
32. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 1979. *Farmakope Indonesia*. Edisi Ketiga. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 6, 816-817
33. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 1996. *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 4-6, 10-12
34. Suradikusumah, Elly. 1989. *Kimia Tumbuhan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat IPB. Bogor. 5
35. Adnan, M. 1997. *Teknik Kromatografi untuk Analisis Bahan Makanan*. Edisi Pertama. Cetakan Pertama. Penerbit ANDI. Yogyakarta. 9.
36. Stahl. E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. ITB. Bandung. 73

12. Randu, S., and Kqueen, C.Y. 2002. Preliminary Screening of Endophytic Fungi from Medical Plants in Malaysia for Antimicrobial Activity. *Malaysian journal of Medical Sciences*. Vol 9 No.2. 23-33
13. Backer, C.A and Van den Brick Jr. 1962. *Flora of Java*. Ed. II. Leiden. 326 – 364.
14. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.1978. *Materia Medika Indonesia*. Jilid V. Jakarta. 510-512
15. Bhakti Husada. 1985. *Tanaman Obat Indonesia*. Jilid I. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 52, 83
16. Campbell, Neil A., Reece, Jane B., Mitchell, Lawrence G. 1999. *Biologi*. Terjemahan oleh Prof. Dr. Ir. Wasmen Manalu. 2000. Penerbit Erlangga, Jakarta. 185
17. Rubini, M.R., Silva-Ribeiro, R.T. 2005. Diversity of Endophytic fungal Community of Cacao (*Theobroma cacao* L.) and Biological Control of *Crinipellis pernicioso*, Causal Agent of Witches Broom Disease. *International J. of Biological Science*. 1, 24-33
18. Tjitrosoepome, G. 2004. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 131, 133.
19. Tan, RX and WX Zou. 2001. *Endophytes : a rich source of functional metabolites*. *Nat Prod.Rep*. 18 : 448-459
20. Sakiyama, C. C. H., Paula, E. M. 2001. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffe cherries. *Letters of applied Microbiology*. Vol. 33. 117-118.
21. Carrol, G.C. 1988. *Fungal Endophytes in Stems and Leaves, From Latent Pathogens to Mutualistic Symbiont*. *Ecology*. 69 . 2 -9
22. Petrini, O., T.N. Sieber, L. Toti dan O. Viret., 1992. *Ecology Metabolite Production and Substrate Utilization in Endophytic Fungi*. *Natural Toxins* 1:185-196.
23. Worang, Rantje L. 2003. Fungi Endofit Sebagai Penghasil Antibiotika, *Makalah Individu*, Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
24. Rao, S.N.S. 1994. *Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*. Edisi kedua. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.