

**TESIS**

**KARAKTERISASI MOLEKULER ISOLAT AKTIF FUNGI ENDOFIT DARI DAUN  
BERUWAS LAUT (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.) SEBAGAI PENGHASIL  
SENYAWA ANTIBAKTERI**

*MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ACTIVE ENDOPHYTIC FUNGAL  
ISOLATES FROM BERUWAS LAUT LEAVES (*Scaevola taccada* (Gaertn.)  
Roxb.) AS PRODUCERS OF ANTIBACTERIAL COMPOUNDS*

**NASRUL HAQ**

**P062201016**



**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK**

**SEKOLAH PASCASARJANA**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2024**

**KARAKTERISASI MOLEKULER ISOLAT AKTIF FUNGI ENDOFIT DARI  
DAUN BERUWAS LAUT (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.) SEBAGAI  
PENGHASIL SENYAWA ANTIBAKTERI**

TESIS

Sebagai salah satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Ilmu Biomedik Konsentrasi Mikrobiologi

Disusun dan diajukan oleh

**NASRUL HAQ**

Kepada

**MAGISTER ILMU BIOMEDIK  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2024**

**LEMBAR PENGESAHAN TESIS**

**KARAKTERISASI MOLEKULER ISOLAT AKTIF FUNGI ENDOFIT DARI  
DAUN BERUWAS LAUT (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.) SEBAGAI  
PENGHASIL SENYAWA ANTIBAKTERI**

Disusun dan diajukan oleh

**NASRUL HAQ**

Nomor Pokok : P062201016

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu Biomedik Sekolah  
Pascasarjana Universitas Hasanuddin  
pada tanggal 19 Januari 2024  
dan telah dinyatakan memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc., Ph.D., Sp.Mk(K)  
NIP. 19690918 199603 2 001

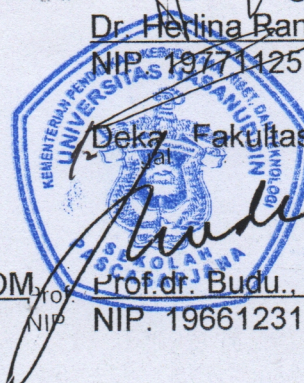
Ketua Program Studi Ilmu Biomedik

Prof. dr. Rahmawati Minhajat, Ph.D., Sp.PD, K-HOM  
NIP. 19680218 199903 2 002

Pembimbing Pendamping

Dr. Herlina Bante, S.Si., M.Si., Apt  
NIP. 19771125 200212 2 003

Dekan Fakultas/Sekolah Pascasarjana



Prof. dr. Budu., Ph.D., Sp.MK(K).M.Med ed  
NIP. 19661231 199503 1 009

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nasrul Haq  
NIM : P062201016  
Program Studi : Ilmu Biomedik  
Konsentrasi : Mikrobiologi

menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan dan pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa Sebagian atau keseluruhan isi tesis ini merupakan hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 20 Januari 2024

yang menyatakan

  
D3C0DAKX797290207  
**Nasrul Haq**

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL .....	v
DAFTAR GAMBAR .....	vi
DAFTAR SINGKATAN .....	vii
KATA PENGANTAR .....	viii
Abstrak.....	xi
Abstract.....	xii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Tumbuhan beruwas laut .....	6
B. Fungi Endofit .....	8
C. Polymerase Chain Reaction .....	9
1. Definisi Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	9
2. Prinsip-prinsip Dasar PCR.....	10
3. Template DNA.....	11
4. Primer .....	12
5. dNTPs ( <i>deoxynucleotide triphosphates</i> ) .....	13
6. Buffer PCR dan MgCl <sub>2</sub> .....	13
7. Enzim Polimerase DNA.....	14
D. Metabolit Sekunder .....	15
E. Antibakteri.....	20
F. Difusi Agar.....	23
G. Kromatografi Lapis Tipis.....	24
1. Fase Diam.....	25
2. Fase Gerak .....	25
3. Penanganan Chamber .....	25
4. Nilai Rf.....	26

H. KLT-Bioautografi .....	27
I. Kerangka Teori .....	29
J. Kerangka Konsep.....	30
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>31</b>
A. Rancangan penelitian .....	31
B. Waktu dan tempat penelitian.....	31
C. Populasi dan sampel.....	31
D. Kriteria inklusi dan esklsi.....	31
E. Definisi operasional .....	31
F. Bakteri Uji .....	33
G. Alat dan Bahan Peneltian.....	33
H. Prosedur Kerja .....	33
1. Sterilisasi Alat dan Bahan .....	33
2. Pengambilan dan penyiapan sampel .....	34
3. Isolasi Fungi Endofit .....	34
4. Pemurnian fungi endofit .....	34
5. Identifikasi Morfologi Fungi Endofit.....	34
6. Karakterisasi Isolat Fungi Endofit .....	35
7. Penyiapan bakteri uji .....	37
8. Uji antagonis .....	38
9. Produksi metabolit sekunder .....	38
10. Uji Aktivitas.....	39
11. Identifikasi Komponen Kimia .....	40
12. Karakterisasi Molekuler Isolat Fungi Endofit dengan PCR .....	40
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>44</b>
A. Isolasi fungi endofit dari daun beruwass laut.....	44
B. Uji antagonis.....	49
C. Identifikasi molekuler dengan metode PCR.....	50
1. Pengukuran kuantitas asam nukleat (Genomik DNA) hasil ekstraksi.....	50
2. Amplifikasi dengan Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	52
3. Hasil Sekuensing Produk PCR.....	53
4. Hasil BLAST Berdasarkan Database NCBI.....	54
5. Analisis Filogenetik dengan NCBI.....	56
D. Fermentasi dan ekstraksi .....	58

E. Uji aktivitas antibakteri metode difusi agar .....	58
F. Profil kromatogram dan uji aktivitas metode KLT bioautografi .....	61
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....	64
A. Kesimpulan.....	64
B. Saran.....	64
ALUR PENELITIAN.....	65
DAFTAR PUSTAKA .....	66
LAMPIRAN .....	73
1. Isolat murni fungi endofit.....	73
2. Hasil uji skrining antibakteri .....	74
3. Fermentasi .....	75
4. Uji aktivitas metode difusi agar.....	75
5. Profil kromatogram.....	76
6. Identifikasi komponen kimia.....	77
7. Hasil uji aktivitas KLT-Bioautografi.....	78

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil Isolat Fungi .....	45
Tabel 2. Hasil pemeriksaan makroskopik isolat fungi endofit pada .....	46
Tabel 3. Hasil pemeriksaan mikroskopik isolat fungi endofit .....	46
Tabel 4. Hasil uji antagonis .....	49
Tabel 5. Hasil pengukuran kuantitas genomik dna dengan spektrofotometer nanodrop .....	51
Tabel 8. Profil kromatogram esktrak etil asetat hasil fermentasi isolat IFDBL-15.61	
Tabel 9. Hasil Identifikasi golongan komponen kimia aktif pada ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat IFDBL-15 .....	62
Tabel 10. Nilai Rf dari UJI KLT-Bioautografi pada ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat IFDBL-15.....	62
Tabel 9. Hasil uji aktivitas ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat IFDBL-15 metode difusi agar.....	76



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Sampel tumbuhan beruwas laut ( <i>Scaevola taccada</i> (Gaertn.) Roxb.)	.6
Gambar 2. Cryptocandin A	17
Gambar 3. Cryptocin	17
Gambar 4. Ambuic acid	18
Gambar 5. Jesterone	18
Gambar 6. Subglutionol A	18
Gambar 7. Paclitaxel	19
Gambar 8. Isopestacin	19
Gambar 9. Pestacin	20
Gambar 10. Kerangka Teori	29
Gambar 11. Kerangka Konsep	30
Gambar 12. Hasil isolasi fungi endofit	44
Gambar 13. Hasil uji antagonis isolat IFDBL-15	50
Gambar 14. Hasil elektroforesis produk DNA	53
Gambar 15. Hasil sekuensing DNA isolat IFDBL-15	54
Gambar 16. Pohon filogenetik isolat IFDBL-15	57
Gambar 17. Makroskopik <i>Parengyodontium album</i> di Malt extract agar (MEA) (Leplat et al., 2020)	58
Gambar 18. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat IFDBL-15 dengan metode difusi agar	60
Gambar 19. Alur penelitian	65
Gambar 20. Isolat murni fungi endofit	73
Gambar 21. Hasil uji antagonis isolat fungi endofit	74
Gambar 22. Proses ekstraksi isolat IFDBL-15	75
Gambar 23. Hasil uji aktivitas ekstrak etil asetat isolat IFDBL-15	75
Gambar 24. Hasil profil kromatogram ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat IFDBL-15	76
Gambar 25. Hasil uji identifikasi komponen kimia ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat IFDBL-15	77
Gambar 26. Hasil uji aktivitas KLT Bioautografi	78

## DAFTAR SINGKATAN

AB	: Antibiotik
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BS	: <i>Bacillus subtilis</i>
DNA	: Deoxyribonucleic acid
dNTPs	: Deoxynucleotide triphosphates
EC	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
IFDBL	: Isolat Fungi Daun Beruwas Laut
ITS	: Internal transcribed spacer
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
LAF	: Laminary Air Flow
MEGA	: Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MHA	: Muller Hinton Agar
MYB	: Maltosa Yeast Broth
NA	: Nutrien Agar
NaOCl	: Natrium Hipoklorit
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
PA	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	: Polymerase chain reaction
PDA	: Potato Dextrose Agar
PDB	: Potato Dextrose Broth
PDY	: Potato Dextrose Yeast
Rf	: <i>Retardation factor</i>
RNA	: <i>Ribonucleic acid</i>
SA	: <i>Staphylococcus aureus</i>
SE	: <i>Staphylococcus epidermidis</i>
ST	: <i>Salmonella typhi</i>
UV	: Ultraviolet

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah puji syukur senantiasa penulis haturkan kehadiran Allah SWT atas segala karunia, rahmat, hidayah, dan nikmatNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Karakterisasi Molekuler Isolat Aktif Fungi Endofit dari Daun Beruwass Laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.) sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri”** ini dengan baik sebagai persyaratan dalam mencapai gelar Magister Biomedik dari Program Studi Magister Ilmu Biomedik pada Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar.

Pertama-tama penulis ucapkan terima kasih yang tulus dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada orang tua, Ayahanda Alm. Ambo Wellang dan Ibunda Hj. Nurmah Abdal yang dengan kasih sayang dan ketulusannya telah memberikan doa dan dukungan yang senantiasa mengiringi langkah penulis hingga mencapai tahap ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tesis ini telah melewati banyak hambatan dan kesulitan. Namun dengan bantuan dan dukungan dari berbagai pihak sehingga dapat selesai dengan baik. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini penulis menghaturkan rasa terima kasih yang tulus kepada:

1. Rektor Universitas Hasanuddin Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc., selaku Rektor Universitas Hasanuddin.
2. Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M (K), M. Med Ed, selaku Dekan sekolah Pascasarjana Universitas Hasanuddin.

3. Prof. dr. Rahmawati Minhajat, Ph.D, Sp.PD-KHOM., FINASIM, Selaku Ketua Program Studi Ilmu Biomedik Universitas Hasanuddin.
4. dr. A.R. Sultan, DMM., M.Sc., Ph.D., Sp.MK, selaku ketua konsentrasi Mikrobiologi Universitas Hasanuddin.
5. dr. Rizalinda Sjahril, M.Sc., Ph.D., Sp.MK(K), Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt., Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, P.h.D., Sp.MK, dr. Ika Yustisia., Ph.D., Sp.MK., Dr. dr. Ilhamjaya Patteologi, M.Kes selaku penguji selaku dosen pembimbing utama, pembimbing pendamping dan dosen penguji tesis yang penuh dengan Ikhlas, kesabaran dan bijaksana dalam meluangkan banyak waktu untuk pengarahan agar tesis ini dapat terselesaikan dengan baik.
6. Para dosen Program Studi Ilmu Biomedik Khususnya konsentrasi Mikrobiologi yang telah mendidik penulis selama menjadi mahasiswa di Program Studi Ilmu Biomedik konsentrasi Mikrobiologi, suatu kehormatan untuk pernah menimba ilmu dari bapak/ibu sekalian.
7. Keluarga Besar Laboratorium Mikrobiologi Farmasi UMI dan Fakultas Farmasi UMI yang selalu memberikan masukan, dukungan dan bantuan selama penulis menjalani proses Pendidikan magister ini.
8. Fenti A. Tupanwael, S.Si., M.Biomed, dr. Muh. Aprizal, M.Biomed dan Unzia Sagita Putri, S.Si., M.Biomed sebagai teman-teman seperjuangan Angkatan 2020 program studi Ilmu Biomedik Konsentrasi Mikrobiologi terima kasih untuk kebersamaan, dukungan dan motivasi selama masa perkuliahan.

9. Serta semua pihak yang penulis tidak dapat sebutkan satu persatu, terima kasih telah memberikan banyak bantuan, dukungan dan doanya.

Akhirnya kepada semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis tuliskan satu persatu, semoga Allah selalu melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua. Semoga ini semua menjadi pahala jariyah yang senantiasa mengalir kepada kita semua. Aamiin

Makassar, 19 Januari 2024



**Nasrul Haq**

## ABSTRAK

**NASRUL HAQ.** *Karakterisasi Molekuler Isolat Aktif Fungi Endofit dari Daun Beruwas Laut (*Scaevola taccada* (gaertn.) Roxb.) sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri (Dibimbing oleh Rizalinda Sjahril dan Herlina Rante)*

Fungi endofit merupakan fungi yang hidup dan berkembang pada jaringan tumbuhan, bersimbiosis dengan tumbuhan inangnya yang dapat memproduksi metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan sebagai senyawa antibakteri, antioksidan, antivirus, dan antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi fungi endofit yang diperoleh dari daun beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.). Penelitian ini menggunakan metode tanam langsung untuk isolasi fungi endofit diisolasi menggunakan PDA (Potato Dekstrosa Agar). Produksi senyawa metabolit sekunder dengan metode fermentasi pada medium Maltosa Yeast Broth yang digojlok selama 18 hari dengan kecepatan 150 rpm. Identifikasi komponen kimia dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar dan KLT-Bioautografi, serta identifikasi molekuler dengan metode *Polymerase Chain Reaction*. Diperoleh hasil berupa 16 isolat fungi endofit, satu diantaranya (IFDBL -15) memperlihatkan aktivitas antibakteri terbaik. Area inhibisi pada uji aktivitas antibakteri secara berurutan terhadap *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 14990), *B. subtilis* (ATCC 6633), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* (ATCC 25923), dan *S. typhi* (NCTC 786) sebesar 15,47, 14,52, 14,64, 14,10, 15,92, dan 15,52 mm. Ekstrak hasil fermentasi isolat IFDBL-15 mengandung flavonoid, alkaloid, antrakuinon dan saponin. Uji aktivitas KLT-Bioautografi memperlihatkan 4 bercak aktif dengan 1 bercak menghambat semua bakteri uji yang diduga senyawa flavanoid (nilai Rf 0,45). Identifikasi molekuler gen ITS1 dan ITS4 dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* pada isolat IFDBL- 15 menunjukkan kekerabatan terdekat dengan spesies *Parengyodontium album* dengan tingkat kesesuaian identitas sebesar 99,83%. Kesimpulan, isolat fungi endofit IFDBL-15 mampu memproduksi metabolit sekunder yang bermanfaat sebagai antibakteri.

**Keywords:** *fungi endofit, beruwas laut, antibakteri, Scaevola taccada, Parengyodontium album*



 <b>GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS</b>	
Abstrak ini telah diperiksa.	Paraf Ketua / Sekretaris.
Tanggal : _____	

## ABSTRACT

**NASRUL HAQ.** *Molecular Characterization of Active Isolates of Endophytic Fungi from Sea Beruwas Leaves (*Scaevola taccada* (gaertn.) Roxb.) as Producers of Antibacterial Compounds* (Supervised by **Rizalinda Sjahril** and **Herlina Rante**)

Endophytic fungi live and thrive within plant tissues, forming a symbiotic relationship with their host plants capable of producing secondary metabolites that can be harnessed as antibacterial, antioxidant, antiviral, and anticancer compounds. This research aimed to isolate and identify endophytic fungi obtained from beruwas laut leaves (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.). Direct seeding method was employed for endophytic fungi isolation using Potato Dextrose Agar (PDA). Secondary metabolite production was performed via fermentation on Maltose Yeast Broth medium, agitated for 18 days at 150 rpm. Chemical component identification was performed using Thin-Layer Chromatography (TLC). Antibacterial activity was assessed through agar diffusion and TLC-Bioautography methods, while molecular identification was conducted using Polymerase Chain Reaction. The result is 16 isolates of endophytic fungi, among which one (IFDBL-15) exhibited the most potent antibacterial activity. The inhibition area in the antibacterial activity test against *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 14990), *B. subtilis* (ATCC 6633), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* (ATCC 25923), and *S. typhi* (NCTC 786) were 15.47, 14.52, 14.64, 14.10, 15.92, and 15.52 mm, respectively. The fermentation extract of the IFDBL-15 isolate contained flavonoids, alkaloids, anthraquinones, and saponins. TLC-Bioautography activity revealed four active spots, with one spot inhibiting all test bacteria suspected to be a flavonoid compound (Rf value of 0,45). Molecular identification using ITS1 and ITS4 gene regions via Polymerase Chain Reaction showed that the IFDBL-15 isolate exhibited the closest relationship to the species *Parengyodontium album* with an identity match of 99.83%. In conclusion, the IFDBL-15 endophytic fungi isolate has shown the potential to generate beneficial secondary compounds as an antibacterial agent.

**Keywords:** *endophytic fungi, beruwas laut, antibacterial, Scaevola taccada, Parengyodontium album*

 <b>GUGUS PENJAMINAN MUTU (GPM) SEKOLAH PASCASARJANA UNHAS</b>	
Abstrak ini telah diperiksa.  Tanggal : _____	Paraf Ketua / Sekretaris. 

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Negara beriklim tropis seperti Indonesia menjadi salah satu negara yang sangat berpotensi dalam prevalensi tinggi kasus penyakit infeksi. Penyakit infeksi ini disebabkan oleh mikroorganisme, salah satunya adalah bakteri (Heni et al., 2015). Dalam penanganan penyakit infeksi, penggunaan antibiotik dan antimikroba menjadi salah satu pilihan utama. Namun, peningkatan penggunaan antibiotik di Masyarakat menimbulkan masalah baru yaitu resistensi. Resistensi muncul sebagai akibat penggunaan antibiotik yang tidak beraturan atau dosis yang kurang tepat sehingga bakteri mampu membentuk kekebalan untuk mempertahankan diri (Nawea et al., 2017 dan Mao et al., 2021). Bakteri yang memiliki kekebalan terhadap obat merupakan ancaman besar bagi kualitas kesehatan manusia di dunia. Saat ini, beberapa antibiotik telah kehilangan keampuhannya dan agen antimikroba baru sangat dibutuhkan (Álvarez-Martínez et al., 2020). Resistensi ini yang mendorong peningkatan upaya menemukan senyawa antibiotika baru baik dalam bentuk sintesis senyawa maupun diperoleh dari produksi metabolit mikroba. Penelusuran ini telah dilakukan dari berbagai sumber diantaranya dari bakteri, fungi, hewan, maupun dari tumbuhan (Álvarez-Martínez et al., 2020).

Eksplorasi aktivitas antimikroba yang banyak merepresentasikan produk alami berasal dari hewan, bakteri, jamur dan tumbuhan terus dilakukan. Senyawa-senyawa alami yang berasal dari sumber yang heterogen telah terbukti memiliki kemampuan antimikroba, termasuk melawan bakteri yang sudah termasuk resisten terhadap antibiotik. Berbagai senyawa alami, terutama



fitokimia, telah menunjukkan kapasitas sinergis dengan penemuan-penemuan senyawa antibiotik. (Álvarez-Martínez et al., 2020).

Seiring dengan penggunaan senyawa metabolit dari tumbuhan, muncul kendala baru yaitu pemanfaatan metabolit secara langsung dari tumbuhan yakni keterbatasan siklus hidup tumbuhan dan populasi tumbuhan yang semakin terbatas. Salah satu pilihan untuk mengatasi keterbatasan tersebut adalah menggunakan fungi endofit, salah satu mikroorganisme yang dapat tumbuh pada jaringan tanaman serta dapat memproduksi senyawa bioaktif yang sama atau berbeda dengan inangnya, senyawa-senyawa metabolit yang diperoleh diantaranya flavonoid, asam fenolik, alkaloid, *benzopyranones*, kuinon, terpenoid, tetralones, steroid, *xanthones*, dan sebagainya (Molina et al., 2012) dan (Elita et al., 2019).. Sampai saat ini, produk alami yang dihasilkan dari jamur endofit telah banyak dimanfaatkan dalam aplikasi yang luas diantaranya dapat digunakan sebagai antibiotik, antioksidan, antikanker, immunosupresan, bahan kimia pertanian, antiparasitiks, antidiabetes dan antijamur (Visalakchi & Muthumary, 2010).

Fungi endofit adalah fungi yang ditemukan tumbuh dan berkoloni pada jaringan tumbuhan yang berfungsi sebagai inang, namun tidak merugikan inang tersenut. Fungi endofit banyak ditemui pada bagian tumbuhan terutama pada setiap bagian-bagian utamanya yakni daun, batang dan akarnya. Fungi endofit mampu memproduksi metabolit sekunder maupun senyawa bioaktif sebagaimana tumbuhan inang juga mampu menghasilkan senyawa tersebut. Hal tersebut terjadi karena adanya transfer genetik yang terjadi antara tanaman inang dengan fungi endofit, dan menyebabkan senyawa-senyawa bermanfaat dari tanaman tersebut juga dapat dihasilkan oleh fungi endofit yang berkoloni didalam tumbuhannya (Hasiani et al., 2015). Selain itu, fungi endofit dengan

siklus hidup yang relatif pendek dan menunjukkan kemampuan untuk menghasilkan senyawa-senyawa metabolit dalam bentuk senyawa bioaktif untuk jumlah besar. Sehingga dapat menjadi alternatif untuk memperoleh sumber bahan obat yang alami, ekonomis, dan ramah lingkungan dengan waktu yang relative singkat tanpa merusak ekologi dan menghasilkan jumlah dengan skala besar (Deponda et al., 2019; Murdiyah, 2017).

Indonesia menjadi salah satu negara yang masyarakatnya menggunakan tumbuhan sebagai obat alami dan menjadi alternatif pengobatan dalam waktu yang lama. Potensi tumbuhan sebagai obat yang bersifat alami juga terus diteliti dan dikembangkan (Pulungan & Brata, 2017). Terdapat puluhan ribu jenis tanaman di dunia, diantaranya terdapat di Indonesia sekitar 30.000 jenis dan sekitar 940 jenis telah menunjukkan khasiat sebagai obat dan digunakan dalam pengobatan secara dalam pengobatan tradisional masyarakat Indonesia (Zulyetti, 2019).

Salah satu tanaman yang banyak digunakan adalah tanaman beruwass laut. Tanaman ini banyak digunakan sebagai bagian etnomedis di Indonesia. Secara empiris, beruwass laut banyak digunakan sebagai penyembuhan luka, pengobatan diabetes, bengkak pada kaki, sakit kepala, batuk, infeksi mata, pegal, dan flu (Apriandi, 2019).

Beruwass laut memiliki aktivitas antibakteri alami terhadap bakteri patogen karena mampu menghasilkan senyawa bioaktif dan digunakan untuk menghambat bakteri dengan mekanisme merusak dinding sel. Senyawa yang dimiliki oleh beruwass laut yaitu fenol dan flavonoid. Kandungan dari tumbuhan beruwass laut berupa glikosid jenis skaevolin, alkaloid, fenol, serta saponin. *Scaevola taccada* juga mengandung beberapa kebutuhan tubuh seperti mineral dan vitamin. Beruwass laut ini juga digunakan sebagai tumbuhan obat

tradisional, banyak ditemukan di sekitar perairan pantai, khususnya di daerah kabupaten Pinrang, Kecamatan Suppa. Tanaman ini berkhasiat untuk mengobati infeksi mata, penyakit diabetes, sakit kepala, batuk, flu, dan sebagainya.

Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Kosman & Tappang (2012) terkait golongan senyawa kimia dari fraksi dietil eter daun beruwas laut menunjukkan golongan komponen kimia yang ditemukan adalah golongan flavonoid. Rajei (2022) dalam penelitiannya menyatakan bahwa ekstrak etanol daun beruwas laut mengandung senyawa terpen, fenol, tannin, dan flavonoid dan aktif terhadap bakteri bakteri *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes*, *Shigella dysenteriae* pada pengujian KLT-Bioautografi.

Berdasarkan uraian diatas bahwa tanaman beruwas laut memiliki khasiat dalam banyak pengobatan berbagai penyakit, namun penggunaannya sebagai antimikroba secara ilmiah masih kurang. Hal inilah yang mendasari kami untuk melakukan penelitian yang berjudul Karakterisasi Molekuler Isolat Aktif Fungi Endofit dari Beruwas Laut sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri.

## **B. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah fungi endofit dari daun beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.) mampu menghasilkan senyawa antibakteri?

2. Bagaimana profil kromatogram senyawa antibakteri dari metabolit sekunder fungi endofit daun beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.)?
3. Bagaimana karakteristik molekuler isolat aktif dari fungi endofit daun beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.)?

### **C. Tujuan Penelitian**

1. Memperoleh isolat aktif fungi endofit dari daun beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.) sebagai sumber penghasil senyawa antibakteri
2. Menentukan profil kromatogram senyawa kimia yang dihasilkan oleh isolat aktif fungi dari endofit daun beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.)
3. Menentukan karakteristik molekuler isolat aktif fungi dari endofit daun beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.)

### **D. Manfaat Penelitian**

1. Penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk menambah wawasan dan pengetahuan tentang fungi endofit dari beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.) yang memiliki aktivitas sebagai senyawa antibakteri terhadap bakteri.
2. Manfaat praktis
  - a. Manfaat bagi peneliti diharapkan penelitian ini menjadi sarana pengembangan dan aplikasi ilmu pengetahuan yang telah dipelajari
  - b. Manfaat bagi peneliti selanjutnya diharapkan penelitian ini menjadi salah satu sumber data rujukan untuk pengembangan penelitian selanjutnya.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tumbuhan beruwas laut

Beruwas laut merupakan tumbuhan yang habitatnya banyak ditemukan tumbuh di daerah pesisir pantai. Tumbuhan ini merupakan semak lebat yang tumbuh dengan ketinggian hingga 4 m. Karakter pertumbuhannya di pesisir yang sangat dekat dengan laut, terkena air garam, umumnya pada daerah berpasir atau berkerikil (Sutar et al., 2017).



(a)

(b)

Gambar 1. Sampel tumbuhan beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.)

*(a) Tanaman, (b) Daun (gambar merupakan koleksi pribadi)*

Tumbuhan ini memiliki daun yang sedikit sukulen dengan panjang sekitar 20 cm, berseling rapat dan tumbuh berkumpul pada batangnya. Daun dengan pinggiran halus, tampilan berdaging, dan berwarna hijau kekuningan. Buahnya berupa buah beri berdaging putih dengan panjang sekitar 1 cm dan mengapung di air laut. Bilahnya memanjang dan membulat di ujungnya dengan panjang 5-20 cm dan lebarnya 5-7 cm. Serta biji berwarna krem dan bergerigi. Bunganya berwarna putih, biasanya dengan garis-garis ungu, memiliki bentuk tidak

beraturan dengan 5 kelopak bunga di satu sisi bunga sehingga tampak seperti terbelah dua dengan panjang 8-12 mm dan memiliki aroma menyenangkan (Sutar et al., 2017).

Beruas laut juga dikenal sebagai kubis pantai, sawi laut, selada laut, naupaka pantai, *Naupaka*. *S. taccada*, tanaman berbunga milik keluarga *Goodeniaceae*. Secara taksonomi dapat diklasifikasikan sebagai berikut (ITIS, 2022):

Kingdom : *Plantae*  
Subkingdom : *Viridiplantae*  
Infrakingdom : *Streptophyta*  
Superdivision : *Embryophyta*  
Division : *Tracheophyta*  
Subdivision : *Spermatophytina*  
Class : *Magnoliopsida*  
Superorder : *Asteranae*  
Order : *Asterales*  
Family : *Goodeniaceae*  
Genus : *Scaevola* L.  
Species : *Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb

*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb. (sinonim, *Scaevola taccada* var. *sericea* (Vahl) Merr.; Keluarga *Goodeniaceae*), tanaman berbunga, umumnya ditemukan di semak belukar pantai di sekitar Samudra Hindia tropis dan Kepulauan tropis Pasifik. Tumbuhan ini juga dikenal sebagai *Naupaka Kahakai* (Hawaii), *Magoo* (Divehi), *Merambong* (Melayu), *Ngahu* (Tongan) dan *Ruk Talay* (Thai). Di Asia Tenggara, ada beberapa manfaat pengobatan yang dimiliki beruas laut. Mengobati penyakit disentri, infeksi syphilis, dan beri-beri digunakan rebusan akarnya (Filipina), pengobatan penyakit kulit digunakan akar untuk keracunan makanan dan daunnya sebagai anti inflamasi (Thailand). Untuk meredakan batuk serta malaria digunakan daunnya dengan cara dikunyah. Sementara daunnya digunakan untuk pengobatan batuk atau flu

(bagian utana Nugini). Spesies ini mengandung kumarin, terpenoid dan steroid (Wohlrabe & Hänsel, 1977).

Tumbuhan ini memiliki kandungan kimia berupa scaevolasida, asam klorogenat, saponin, glikosida, lipid dan alkaloid. Hasil penelitian menunjukkan adanya senyawa loganin, sylvestroside-III, dimethyl acetal, cantleyoside dan dimethyl acetal pada bagian tanamannya (Sutar et al., 2017).

## **B. Fungi Endofit**

Fungi endofit adalah kelompok fungi yang hidup dan berkembang di jaringan tumbuhan hidup dan tidak bersifat merugikan tanaman inangnya. Fungi ini umumnya mampu memproduksi senyawa-senyawa metabolit sekunder yang mampu menunjukkan aktivitas biologis dan yang dimanfaatkan sebagai senyawa antibakteri, antijamur, antivirus, maupun sebagai antikanker. Kemampuan suatu fungi endofit untuk memproduksi senyawa bioaktif dan metabolit sekunder yang sama dengan inangnya menjadi keuntungan dan peluang besar baik dalam isolasi fungi endofit maupun dalam mempertahankan tumbuhan aslinya (Fitriana et al., 2019).

Dari ratusan ribu tanaman yang tumbuh dibumi, setiap tanaman mengandung mikroorganisme endofit, baik bakteri maupun jamur. Setiap tanaman tidak hanya memiliki satu endofit, bahkan terdiri dari beberapa jenis yang dapat menghasilkan metabolit yang berbeda atau bahkan lebih baik dari tanamannya. Sehingga tidak lagi harus membunuh tanaman asli yang membutuhkan waktu untuk tumbuh kembali (Radji, 2005).

Senyawa bioaktif seperti antioksidan, antikanker, antibakteri, antivirus, dan antifungi diproduksi oleh fungi endofit. Fungi endofit dapat dengan mudah dipisahkan dari tanaman asalnya dan ditumbuhkan pada media yang sesuai.

Selain itu, senyawa metabolit yang dihasilkan oleh endofit dapat diisolasi, dimurnikan, dan struktur molekul dapat diidentifikasi. (Deshmukh et al., 2018).

Fungi endofit mampu hidup untuk bersimbiosis dan saling berbagi dengan tumbuhan asalnya. Fungi endofit memperoleh nutrisi dari tumbuhan, dan kemudian diproduksi untuk menjaga tumbuhan dari penyakit dan serangan lainnya (Kouipou & Boyom, 2019). Fungi endofit juga merupakan penghasil senyawa bioaktif dapat dikembangkan sebagai bahan obat. Berbagai jenis tumbuhan terutama yang berkhasiat sebagai obat dapat digunakan sebagai sumber isolat fungi endofit. Fungi endofit dari tumbuhan obat dapat menjadi sumber metabolit sekunder (Vasundhara et al., 2019).

## **C. Polymerase Chain Reaction**

### **1. Definisi Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Pada tahun 1985, Karry Mullis mengembangkan sebuah teknik yang digunakan untuk melakukan sintesis serta amplifikasi DNA yang dapat dilakukan secara *in vitro*, teknik ini disebut Polymerase Chain Reaction (PCR). PCR dapat mengamplifikasi jutaan segmen DNA dalam beberapa jam. Penemuan PCR dan teknik lain seperti sekuensing DNA sangat berpengaruh terhadap pengembangan diagnosa penyakit, forensik, dan evolusi molekuler (Bartlett & Stirling, 2003; Handoyo & Rudiretna, 2001; Hermansyah et al., 2018).

Dalam beberapa kasus, isolat biakan fungi tidak dapat diidentifikasi dengan benar hanya berdasarkan morfologi dan pemeriksaan mikroskopik. Dalam kasus ini, tes molekuler digunakan untuk mengidentifikasi DNA mikroorganisme yang merupakan fungi. Ini dilakukan dengan menggunakan Reaksi Berantai Polimerase atau PCR, teknik yang sangat sensitif dan cepat



untuk menemukan keberadaan patogen bahkan dalam ukuran yang sangat kecil. Penemuan tentang struktur DNA merupakan teknik identifikasi molekuler yang dikembangkan dalam mempermudah taksonomi fungi. Sekuen pada setiap gen penyandi ribosom DNA dapat dimanfaatkan sebagai karakter dalam proses identifikasi molekuler organisme. Hal ini disebabkan oleh gen yang memiliki kedua sekuen yang terkonservasi dan variabel (Dzikrina et al., 2022).

## **2. Prinsip-prinsip Dasar PCR**

Dua pasang fragmen oligonukleotida (primer) bekerja sama dengan masing-masing utas DNA dengan mengulangi siklus denaturasi, kemudian memisahkan 2 utas DNA secara fisi dengan suhu tinggi; annealing, lalu suhu diturunkan untuk memberikan kesempatan DNA polymerase menempel pada untai DNA tertentu yang sudah bergabung dengan primernya; dan polimerase, di mana DNA polymerase membaca utas tunggal DNA dengan menambatkan primernya (Budiarto, 2015).

Secara teknis, metode konvensional untuk penggandaan DNA dengan PCR dapat dilakukan dengan tiga langkah berulang. Dalam proses penggandaan DNA menggunakan PCR, ada 7 komponen yang dibutuhkan: templat atau cetakan DNA, enzim DNA polimerase, sepasang primer, dNTP, kofaktor  $MgCl_2$ , larutan penyangga, dan air. Komponen-komponen ini dicampur di dalam tabung 200  $\mu$ L dalam kondisi dingin sebelum proses PCR dilakukan.

Waktu yang dibutuhkan pada setiap langkah dalam satu siklus PCR didasarkan pada mesin yang digunakan, tetapi waktu denaturasi biasanya tidak lebih dari 30 detik. Annealing ditentukan berdasarkan panjang primer

dan spesifikasinya, biasanya antara 15 detik dan 1 menit. Meskipun demikian, lama polimerasi sangat bergantung pada panjang fragmen DNA yang dibuat. Untuk keberhasilan proses metode ini, salah satu dari tujuh komponen penting PCR adalah penyusunan primer yang baik. Pasangan primer terbaik tidak terbentuk ketika amplifikasi DNA selesai dan primer hanya menempel pada gen targetnya (Budiarto, 2015; Setyawati & Zubaidah, 2021).

### **3. Template DNA**

Pembentukan molekul DNA baru dimulai dengan DNA templat. Templat DNA ini dapat mengandung fragmen DNA dari DNA kromosom, DNA plasmid, atau fragmen DNA dari berbagai sumber. Untuk menyiapkan DNA templat untuk PCR, dapat menggunakan metode lisis sel atau mengisolasi DNA kromosom atau plasmid dengan metode konvensional. Tujuan eksperimen menentukan metode penyiapan DNA templat.

Metode yang populer dan cepat untuk mendedahkan DNA kromosom dan DNA plasmid adalah lisis. Prinsipnya adalah merusak dinding sel tanpa merusak DNA yang diinginkan, jadi biasanya dilakukan dengan menggunakan buffer lisis. Komposisi buffer lisis yang digunakan dipengaruhi oleh jenis sampel. Penyiapan DNA templat juga dapat dilakukan dengan mengisolasi DNA kromosom atau DNA plasmid. Teknik ini memerlukan prosedur yang lebih rumit dibandingkan dengan metode lisis, tetapi prinsipnya adalah pemisahan DNA kromosom atau DNA plasmid dari dinding sel dan kemudian pemisahan DNA kromosomal. Akibatnya, kualitas DNA yang lebih baik dan murni akan diperoleh.

#### 4. Primer

PCR memerlukan primer. Selain berfungsi sebagai pembatas fragmen DNA target yang akan diamplifikasi selama proses PCR, primer juga memberikan gugus hidroksi (-OH) pada ujung 3' yang diperlukan untuk keberadaan DNA. Perancangan primer dapat dilakukan dengan menggunakan urutan DNA atau protein yang dituju. Jika urutan DNA atau protein belum diketahui, perancangan primer dapat didasarkan pada hasil analisis homologi dari urutan DNA atau protein yang telah diketahui yang memiliki hubungan kekerabatan dekat. Informasi tentang urutan DNA atau protein dapat diperoleh dari database GenBank.

Dalam proses perancangan primer, kriteria berikut harus dipertimbangkan:

a. Panjang primer

Panjang primer yang dipilih harus antara 18 dan 30 basa; primer dengan panjang kurang dari 18 basa akan memiliki spesifisitas yang rendah dan dapat menempel di tempat yang tidak diinginkan, menyebabkan spesifisitas primer yang rendah.

b. Komposisi primer.

Sangat penting untuk mempertimbangkan komposisinya saat merancang primer. Dimungkinkan untuk menghindari mispriming di tempat lain karena spesifisitas primer menurun, sehingga rentetan nukleotida yang sama harus dihindari.

c. Melting temperature ( $T_m$ )

Suhu di mana separuh untai ganda DNA terpisah dikenal sebagai temperatur meleleh ( $T_m$ ).  $T_m$  primer terkait dengan komposisi primer dan panjang primer, dan memilihnya sangat penting karena akan

mempengaruhi suhu annealing proses PCR. Suhu ideal  $T_m$  primer adalah 50–65°C.

d. Interaksi primer-primer

Menghindari interaksi primer-primer seperti self-homology dan cross-homology. Mispriming pada area lain yang tidak diinginkan juga dapat mengurangi spesifisitas primer dan mengurangi konsentrasi primer yang digunakan. Keadaan ini akan berdampak pada efisiensi PCR.

### **5. dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*)**

Sebagai dNTP, dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat), dan dGTP (deoksiguanosisin trifosfat) adalah namanya. dNTP berfungsi sebagai pembungkus DNA yang diperlukan untuk proses ekstensi DNA selama proses PCR. Mereka akan menempel pada gugus –OH pada ujung 3' dari primer, membentuk untai baru yang terkait dengan untai DNA templat. Konsentrasi dNTP yang ideal harus ditentukan untuk PCR.

### **6. Buffer PCR dan $MgCl_2$**

PCR tidak akan terjadi pada pH tertentu. Akibatnya, buffer PCR diperlukan untuk melakukan proses PCR. Buffer ini menjaga pH medium. Tidak hanya buffer PCR yang diperlukan, tetapi juga ion  $Mg^{2+}$ , yang berasal dari  $MgCl_2$ .  $MgCl_2$  berfungsi sebagai kofaktor yang menstimulasi aktivitas DNA polimerase. Adanya  $MgCl_2$  meningkatkan interaksi primer antara templat yang membentuk kompleks larut dan dNTP (senyawa antara). Konsentrasi  $MgCl_2$  memengaruhi perolehan dan spesifisitas PCR. Sebaiknya buffer PCR dan  $MgCl_2$  terpisah, tetapi senyawa  $MgCl_2$  biasanya sudah ada dalam buffer PCR. Ini memudahkan perubahan konsentrasi  $MgCl_2$  sesuai kebutuhan.

## 7. Enzim Polimerase DNA

Untuk proses PCR, enzim polimerase DNA diperlukan untuk tahap ekstensi DNA. Enzim ini dibuat oleh bakteri termofilik atau hipertermofilik, yang berfungsi sebagai katalisis untuk reaksi polimerisasi DNA. Jenis bakteri dan lokasi isolasi menentukan aktivitas polimerase DNA. Mengamplifikasi fragmen DNA pendek (kurang dari tiga kilo basa) lebih mudah dilakukan dengan teknik PCR, tetapi panjang fragmen DNA yang dapat diamplifikasi mencapai 35 kilo basa. Untuk mengamplifikasi fragmen DNA panjang (lebih dari tiga kilo basa), diperlukan polimerase DNA dengan aktivitas yang kuat dan juga buffer PCR dengan pH dan kapasitas tinggi.

PCR ini menghasilkan sintesis dan penggandaan DNA di luar sel organisme, tepatnya dalam suatu "mesin PCR". Pada dasarnya, prinsip yang digunakan dalam sintesis DNA sama dengan prinsip yang digunakan dalam replikasi DNA, yang terjadi *in vivo*. Dalam proses PCR, materi utama adalah DNA utas ganda yang diisolasi dari organisme. Beberapa bahan ini direaksikan dengan enzim DNA polymerase,  $MgCl_2$ , deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), dan primer, yang merupakan potongan pendek DNA utas tunggal yang mengawali sintesis DNA. Setelah campuran PCR homogen, campuran itu siap untuk direaksikan dalam "mesin PCR". Di sana, proses sintesis dan penggandaan DNA terjadi dalam tiga tahap: denaturation, annealing, dan extension.

Optimasi proses PCR diperlukan untuk mendapatkan hasil PCR yang optimal. Ini dapat dicapai dengan mengubah kondisi yang digunakan untuk PCR, biasanya dengan mengubah jenis polimerase DNA, suhu, konsentrasi, buffer PCR, waktu, dan dNTP,  $MgCl_2$ , dan DNA polimerase (Hermansyah et al., 2018; Van Pelt-Verkuil et al., 2008).

#### **D. Metabolit Sekunder**

Dua jenis metabolit adalah metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer berfungsi untuk pertumbuhan dan kehidupan makhluk hidup dalam jumlah terbatas, sedangkan metabolit sekunder dihasilkan dari metabolit primer dalam kondisi stres. Antibiotik, pigmen, toksin, efektor kompetisi dan simbiosis ekologi, feromon, inhibitor enzim, agen imunomodulasi, reseptor antagonis dan agonis, pestisida, antitumor, dan promotor pertumbuhan tumbuhan dan hewan adalah beberapa contoh metabolit sekunder. (Nofiani, 2008; Saifudin, 2014).

Suatu mikroba menghasilkan senyawa yang disebut metabolit sekunder untuk bertahan hidup dalam interaksi dengan lingkungannya daripada memenuhi kebutuhan utamanya (tumbuh dan berkembang). Senyawa antibiotik yang merupakan metabolisme sekunder diproduksi oleh mikroorganisme endofit melindungi tanaman dari hewan pemangsa, insekta, atau mikroba patogen. Senyawa ini tidak selalu diproduksi, hanya ketika dibutuhkan atau dalam tahap tertentu (P. Zhang et al., 2016). Hal ini diperkuat oleh lima alasan. Pertama, banyak metabolit sekunder dibuat oleh organisme yang tidak memiliki sistem imun karena mereka berfungsi sebagai mekanisme pertahanan alternatif. Kedua, metabolit sekunder memiliki struktur dan mekanisme kerja yang kuat, dan jalur metabolismenya kompleks dan mahal secara energetika. Ketiga, metabolit sekunder bekerja dalam situasi di mana mereka bersaing dengan mikroba, tanaman, atau binatang. Keempat, metabolit sekunder dibuat oleh kelompok gen bioselular. Kelima, sporulasi umumnya diikuti dengan pembentukan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibiotik. Ini terjadi pada sel mikroba yang peka terhadap mikroba, tumbuhan, atau binatang. Mikroba peka ini biasanya membutuhkan perlindungan khusus ketika nutrisi

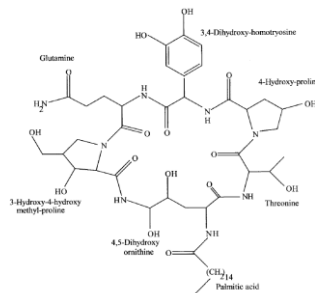
habis. Pembentukan metabolit sekunder dikontrol oleh nutrisi, penurunan kecepatan pertumbuhan, kontrol feedback, inaktivasi enzim, dan induksi enzim. (Zheng et al., 2021).

Fungi endofit menghasilkan metabolit sekunder berupa antibakteri, yang memberikan pilihan baru untuk mengatasi resistensi obat yang terus berkembang. Selain itu, hal ini juga digunakan untuk menghilangkan penyakit infeksi, yang merupakan salah satu penyebab utama kematian (Vasundhara et al., 2019). Setiap senyawa memiliki fungsi atau efek yang berbeda, dan metabolit sekunder adalah molekul kecil dengan berbagai struktur dan spesifisitas. Secara umum, metabolit sekunder melakukan banyak hal untuk melindungi diri atau tetap ada di lingkungan yang tidak baik, seperti melawan atau mengatasi penyakit dan hama, menarik penyerbuk, dan bertindak sebagai molekul pemberi sinyal. Singkatnya, organisme menggunakan metabolit sekunder untuk berkomunikasi dengan lingkungannya. Biomolekul yang berfungsi sebagai timbal dapat digunakan sebagai metabolit sekunder dalam penemuan dan pengembangan obat baru. Alkaloid, flavonoid, steroid, saponin, terpen, dan tannin adalah metabolit sekunder tanaman yang umum (Aly et al., 2013).

Dalam farmakologi, metabolit sekunder dapat digunakan sebagai antioksidan, antibiotik, antikanker, antikoagulan darah, penghambat efek karsinogenik, antiagen pengendali hama yang ramah lingkungan, inhibitor enzim, pigmen, toksin, efektor simbiosis dan kompetisi ekologi, feromon, agen imunomodulasi, pestisida, antitumor, reseptor agonis dan antagonis, dan penghambat pertumbuhan tumbuhan dan hewan (Kusari et al., 2012).

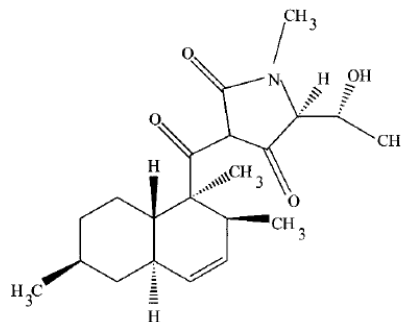
Beberapa metabolit sekunder dari mikroba endofit yang telah diisolasi, dimurnikan, dan dielusidasi struktur. Salah satu metabolit sekunder tersebut adalah (Deshmukh et al., 2018; Hashem et al., 2023; Strobel et al., 2004):

1. Antibiotik *Cryptocandin* berasal dari mikroba endofit *Cryptosporiopsis quercina* dari tanaman obat *Tripterigeum wilfordii*. Ini berfungsi sebagai antijamur terhadap jamur patogen manusia seperti *Candida albicans* dan *Trichopyton spp.*



Gambar 2. Cryptocandin A

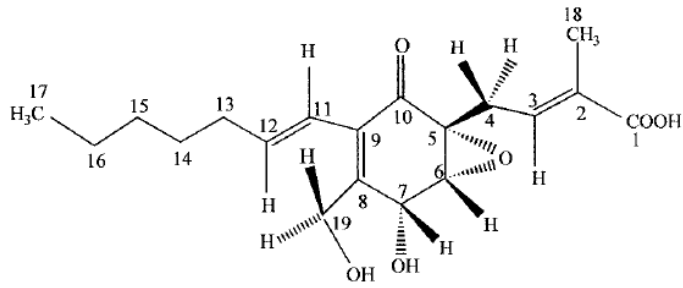
2. *Cryptocin*, asam tetramic yang unik, juga diproduksi oleh *C. quercina*. Senyawa yang tidak biasa ini memiliki aktivitas ampuh melawan *Pyricularia oryzae* serta jumlah jamur patogen tanaman lainnya.



Gambar 3. Cryptocin

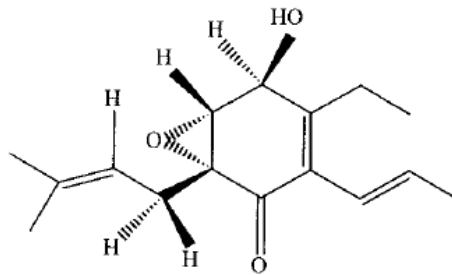
3. Asam ambuat, salah satu metabolit sekunder yang bersifat sebagai agen antijamur yang dihasilkan dari *P. microspora* ditemukan sebagai isolat representative.





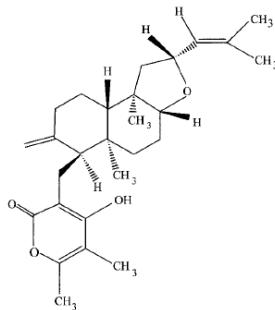
Gambar 4. Ambuic acid

4. Fungi *Pestalotiopsis jesteri*, dari daerah Sungai Sepik di Papua Nugini, menghasilkan *jesterone* dan *hidroksi-jesterone*, yang menunjukkan antijamur aktivitas terhadap berbagai tanaman-patogen jamur.



Gambar 5. Jesterone

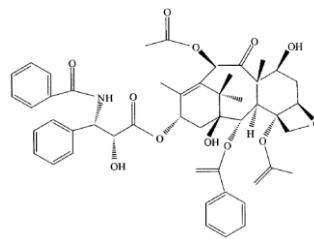
5. Fungi *F. subglutinans* menghasilkan Subglutinol A yang memiliki manfaat sebagai immunosupresan.



Gambar 6. Subglutinol A

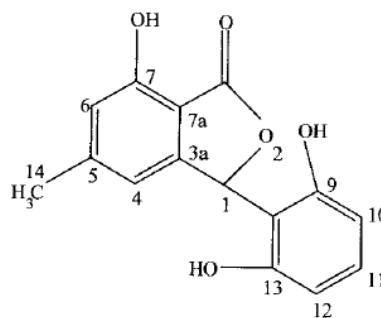
6. Mikroba endofit dari tanaman *Grevillea pteridifolia*. Kakadumycin adalah metabolit dari Endofit ini. Kakadumycin ini juga berfungsi sebagai antimalaria, dan sifat antibakterinya mirip dengan munumbicin D

7. Jamur endofit *Cytonaema* sp. Dengan metabolit cytonic acid A dan B, yang memiliki struktur molekul isomer p-tridepside dan berfungsi sebagai antivirus. Selain itu, cytonic acid A dan B juga berfungsi sebagai protease inhibitor dan memiliki kemampuan untuk menghentikan pertumbuhan cytomegalovirus manusia.
8. *Paclitaxel*, sebuah diterpenoid yang diperoleh dari tanaman *Taxus*, merupakan antikanker pertama yang ditemukan dari produksi oleh mikroba endofit.

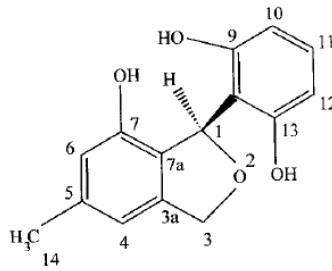


Gambar 7. Paclitaxel

9. *Colletotrichum* sp., zat anti malaria, adalah endofit dari tanaman *Artemisia annua* dan menghasilkan artemisinin sebagai metabolit yang dapat berfungsi sebagai anti malaria. (Radji, 2005).
10. Pada tumbuhan *Terminalia morobensis* berhasil diisolasi endofit *P. microspore*, endofit ini menghasilkan Pestacin dan isopestacin. Struktur molekul keduanya mirip dengan flavonoid, baik pestacin maupun isopestacin memiliki sifat antioksidan.



Gambar 8. Isopestacin



Gambar 9. Pestacin

## E. Antibakteri

Senyawa yang dibuat oleh mikroorganisme, antibakteri, dapat menghambat dan bahkan membunuh kehidupan mikroorganisme dalam jumlah kecil (Menon & satria, 2017). Antibakteri adalah zat yang menghentikan atau membunuh bakteri. Menurut mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi menjadi dua kategori: bakteriostatika, yang menghentikan perkembangan bakteri, dan bakterisida, yang membunuh bakteri (Rollando, 2019).

Mekanisme kerja dari senyawa antibakteri diantaranya yaitu (Anggita et al., 2022; B.G. Katzung, 2017; Giguère & Dowling, 2013) :

### a. Menghambat sintesis dinding sel

Pengikatan obat pada reseptor sel bakteri, protein pengikat penisilin (PBP). PBP adalah enzim bakteri yang membantu membuat dinding sel dan mempertahankan bentuk bakteri, tetapi beberapa PBP mengkatalisis pembentukan ikatan silang di antara rantai peptidoglikan. Ini adalah tahap awal proses kerja antibiotik ini. Reaksi transpeptidase, yang melibatkan transfer satu atau lebih asam amino dari satu rantai peptida ke rantai peptida lainnya, akan dihambat ketika obat disuntikkan pada satu atau lebih reseptor, yang menghambat sintesis peptidoglikan, yang sangat penting

untuk kestabilan dinding sel. Penisilin, sefalosporin, karbapenem, dan monobaktam adalah beberapa antimikroba yang bekerja melalui mekanisme ini.

b. Menghambat fungsi membran plasma

Membran sitoplasma sel hidup mengikat sitoplasma, yang berfungsi sebagai barier permeabilitas selektif, melakukan transportasi aktif, dan mengontrol komposisi internal sel. Jika integritas membran sel ini terganggu, ion dan makromolekul akan keluar dari sel, menyebabkan kerusakan dan kematian sel. Beberapa bahan kimia atau obat dapat mempercepat kerusakan membran sitoplasma bakteri.

c. Menghambat sintesis asam nukleat

Dalam mekanisme kerja antimikroba ini, rantai polipeptida enzim polimerase melekat pada faktor yang menunjukkan spesifisitas dalam pengenalan letak promotor dalam proses transkripsi DNA, sehingga berikatan secara nonkovalen dan kuat pada subunit RNA polimerase. Ini mempengaruhi proses inisiasi secara khusus, menghambat sintesis RNA bakteri.

d. Menghambat sintesis protein

Protein adalah sumber energi bakteri untuk berkembang. Sintesis protein ini dilakukan melalui prosedur konvensional. Pertama, bakteri harus dapat memperoleh dan memiliki bahan baku atau bahan penyusun seperti nukleosida trifosida, asam amino, dan RNA. Jika kondisi ini terpenuhi, enzim bakteri tertentu mentranskripsi gen bakteri yang berada di sana menjadi RNA. RNA kemudian diubah menjadi protein.

DNA dari gen bakteri akan ditranskrisikan untuk membentuk molekul RNA yang disebut sebagai RNA messenger atau mRNA. Proses ini dilakukan dengan bantuan enzim RNA polimerase. Ribosom mengikat dan membaca mRNA dan, berdasarkan informasi yang diperoleh, memasukkan asam amino yang dikirim oleh tRNA ke dalam protein yang baru. Proses ini disebut translasi, di mana ribosom membuat protein dari informasi yang ada dalam mRNA. Kompleks besar ini terdiri dari protein dan RNA ribosom (rRNA). Ribosom bakteri 70S terdiri dari subunit 50S yang mengandung 2 molekul rRNA dan 34 protein, dan subunit 30S mengandung 1 molekul rRNA dan 21 protein.

e. Menghambat sintesis asam folat

Sulfonamida dan trimetoprim adalah contoh antibiotik yang berfungsi untuk menghentikan metabolisme asam folat. Sulfonamida berasal dari sulfanilamida, yang memiliki struktur yang hampir sama dengan para-aminobenzic acid (PABA) yang diperlukan untuk sintesis asam folat bakteri. PABA diubah menjadi asam dihidrofolat oleh dihydropteroate syntetase, kemudian diubah menjadi asam tetrahidrofolat yang diperlukan untuk sintesis asam amino, purin, dan pirimidin. Efek enzim dihydropteroate syntetase dihambat oleh obat golongan sulfonamida. Obat seperti trimetoprim, yang termasuk dalam kelompok penghambat reduksi folat, berfungsi dengan menghentikan enzim dihidrofolat reduktase yang dibutuhkan bakteri untuk mengubah asam dihidrofolat menjadi asam tetrahidrofolat. Akibatnya, sintesis asam amino, purin, dan pirimidin tidak dapat terjadi.

## F. Difusi Agar

Beberapa metode dapat digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri suatu senyawa, termasuk metode difusi, metode difusi agar, dan metode difusi dilusi. Metode difusi, yang dapat dilakukan dalam tiga cara, yaitu sumuran, cakram, dan silinder, adalah yang paling umum digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri suatu senyawa. Metode difusi bekerja dengan menambahkan zat antibakteri ke dalam media padat yang telah diinokulasikan mikroba uji. Hasil pengamatan dari metode ini adalah bahwa ada atau tidaknya area bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram yang menunjukkan zona yang menghambat pertumbuhan bakteri (Nurhayati et al., 2020).

Metode sumuran dimulai dengan memadatkan media agar yang telah diinokulasi bakteri uji kemudian membuat lubang tegak lurus. Lubang dibuat dalam jumlah dan letak yang sesuai dengan tujuan penelitian, dan kemudian sampel yang akan diuji dimasukkan ke dalam lubang. Setelah inkubasi selesai, pertumbuhan bakteri dapat diamati untuk memastikan bahwa tidak ada hambatan di sekitar lubang (Nurhayati et al., 2020).

Metode difusi cakram dilakukan dengan kertas cakram. Bahan antimikroba yang menyerap ditambahkan ke dalam bahan uji, kemudian kertas cakram diletakkan pada media padat yang telah diinokulasi dengan biakan mikroba uji. Metode ini kemudian diinkubasi selama 18 hingga 24 jam pada suhu 35 °C. Penghambatan pertumbuhan mikroba ditunjukkan dengan rea atau zona bening di sekitar kertas cakram. Area atau zona bening memiliki diameter yang sebanding dengan jumlah mikroba uji yang ditambahkan ke kertas cakram. Metode cakram memiliki keuntungan bahwa pengujian dapat dilakukan dengan lebih cepat pada penyiapan cakram (Nurhayati et al., 2020).

Metode silinder melibatkan menempatkan sejumlah silinder. Silinder ini terbuat dari besi tahan karat atau gelas yang diletakkan di atas media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Silinder diisi dengan larutan diuji dan diinkubasi. Setelah inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk mengetahui apakah ada hambatan di sekitar lubang (Kusmiyati & Agustini, 2007).

## **G. Kromatografi Lapis Tipis**

Metode kromatografi lapis tipis (KLT) sangat membantu dalam pemisahan senyawa organik. Ini sering digunakan untuk melacak perkembangan reaksi organik dan memeriksa kemurnian produk karena prosesnya sederhana dan cepat. Fase stasioner KLT terdiri dari lapisan tipis bahan padat seperti alumina atau silika yang didukung oleh permukaan inert seperti kaca, aluminium foil, atau plastik yang tidak larut, meskipun mirip dengan kromatografi kertas. Di bagian bawah pelat KLT terlihat campuran senyawa dan dibiarkan mengering. Setelah itu, pelat dimasukkan ke dalam wadah tertutup yang berisi pelarut, atau fase gerak, yang memungkinkan senyawa bergerak di bawah tingkat cairan hingga suatu titik (Rohman et al., 2023).

Metode pemisahan kromatografi lapis tipis (KLT) memiliki banyak keunggulan. Karena teknik KLT sangat fleksibel, dapat diterapkan pada hampir semua jenis senyawa. Karena menggunakan bahan adsorben yang efektif dan pelarut yang murni, proses pemisahan ini dapat dilakukan dengan biaya yang relatif murah. KLT dijamin berhasil dalam memisahkan campuran senyawa yang tidak diketahui karena dapat dilakukan dalam waktu singkat. Namun, kelemahan KLT adalah kemungkinan hasil yang kurang bersih, terutama jika plat dibuat secara manual. Kromatografi lapis tipis biasanya dilakukan dengan menggunakan substrat seperti kaca atau logam yang dilapisi dengan lapisan tipis silika gel atau alumina sebagai fase diam. Zat yang dapat berfluoresensi

dalam sinar ultraviolet (UV) juga sering digunakan sebagai fase gerak dalam KLT (Rohman et al., 2023; Rosamah, 2019).

### **1. Fase Diam**

Dalam kromatografi lapis tipis (KLT), fase diam adalah zat penjerap dengan ukuran partikel kecil dengan diameter antara 10 dan 30  $\mu\text{m}$ . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam, semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensi dan resolusi. Fase diam ini dapat berupa bahan padat atau cair yang dilapisi pada pendukung. Silika dan serbuk selulosa adalah bahan yang paling umum digunakan sebagai fase diam dalam KLT. Ini karena sifat penyerapan dan pemisahan mereka yang sangat baik selama proses KLT (Fatimah et al., 2020).

### **2. Fase Gerak**

Fase gerak dalam kromatografi lapis tipis (KLT) adalah media pengangkut yang terdiri dari satu atau beberapa pelarut. Karena gaya kapiler, fase gerak bergerak melalui fase diam. Dalam beberapa kasus, sistem pelarut yang terdiri dari beberapa komponen dapat digunakan. Sifat kekuatan elusi dan polaritas KLT memungkinkan perubahan komposisi fase gerak untuk mengubah proses pemisahan. Mengubah komposisi fase gerak dapat memengaruhi cara senyawa berinteraksi dengan fase diam, yang memungkinkan kontrol yang lebih baik atas proses pemisahan (Gandjar & Rohman, 2017).

### **3. Penanganan Chamber**

Dalam penanganan chamber kromatografi lapis tipis (KLT), banyak hal yang harus diperhatikan. Ini termasuk kondisi chamber dan jenis chamber yang digunakan. Sangat penting untuk memastikan bahwa chamber bersih, bebas



dari kotoran, dan kering. Jika ada kelembaban atau kotoran dalam chamber, ini dapat mengganggu hasil kromatogram yang dihasilkan dan mempengaruhi reproduksibilitas pemisahan dalam KLT. Setelah kejenuhan uap pelarut, sorben adsorpsi uap pelarut pada lempeng KLT, dan efek tepi muncul sebagai hasil dari perbedaan gaya kapiler antara sisi tengah dan sisi tepi lempeng KLT. Proses pemisahan sangat dipengaruhi oleh semua komponen ini. Oleh karena itu, untuk mengurangi efek yang tidak diinginkan dan meningkatkan resolusi pemisahan, fitur chamber sering diubah (Gandjar & Rohman, 2017).

#### 4. Nilai Rf

Dalam kromatografi lapis tipis (KLT), faktor retardasi (Rf) menunjukkan pergerakan atau migrasi senyawa. Nilai Rf analit dihitung dengan membandingkan jarak perpindahan atau migrasi analit dengan jarak perpindahan atau migrasi fase gerak dalam KLT. Nilai Rf analit adalah ukuran yang menunjukkan posisi suatu noda atau spot pada fase diam setelah mengalami proses elusi. Retardasi faktor dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut (Gandjar & Rohman, 2017; Rohman et al., 2023).

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Nilai Rf adalah angka yang berkisar antara 0 dan 1 dalam kromatografi lapis tipis (KLT). Nilai Rf yang dianggap ideal untuk deteksi ultraviolet (UV) adalah 0,2 hingga 0,8, dan untuk deteksi ultraviolet (UV) adalah 0,2 hingga 0,9. Nilai Rf relatif yang baik untuk deteksi ultraviolet adalah antara 20 dan 80. Ketika nilai Rf kurang dari 0,2, itu menandakan bahwa belum terjadi keseimbangan antara komponen senyawa dengan fase gerak. Nilai Rf yang dapat

direproduksi dengan baik diperoleh dengan mengontrol kondisi pengembangan, seperti menjaga komposisi campuran pelarut tetap sama dan menjaga kejenuhan chamber (Gandjar & Rohman, 2017).

## H. KLT-Bioautografi

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode kromatografi dengan kesetimbangan absorpsi, dimana absorben yang digunakan yaitu silika gel, selulosa dan aluminium oksida yang bertindak sebagai penunjang fase diam. Dan fase geraknya berupa media cair berupa larutan. KLT digunakan untuk pemisahan sejumlah komponen dari suatu senyawa. Sebuah bagian yang dipisahkan dapat diidentifikasi dengan membandingkan kecepatan bergerak bagian terlarut dalam fase gerak. Rf (Perlambatan faktor) adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan perbedaan kecepatan (Deponda et al., 2019). Bioautografi berasal dari kata "bio", yang berarti "hidup", dan "autografi", yang berarti melakukan sesuatu secara mandiri. Senyawa antimikroba baru yang belum teridentifikasi dapat ditemukan melalui proses pendeteksian yang dikenal sebagai bioautografi (Papatungan et al., 2019).

Bioautografi adalah teknik sederhana untuk menunjukkan aktivitas antimikroba. Ini menggunakan kromatografi lapis tipis untuk melihat reaksi mikroorganisme terhadap zat yang diuji, yang didasarkan pada aktivitas biologi zat yang diuji. Senyawa antimikroba yang terkandung dalam sampel tumbuhan dapat ditemukan melalui bioautografi (Pelu, 2022)

Bioautografi dapat dibagi atas 3 kelompok yaitu (Pelu, 2022):

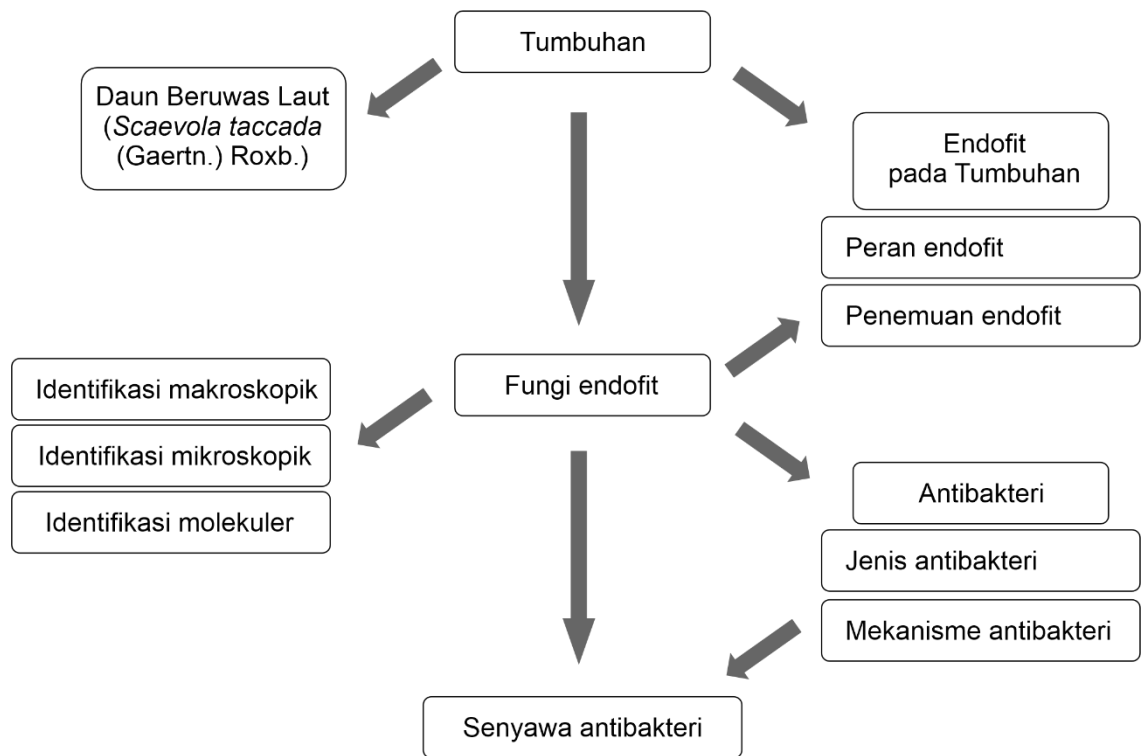
1. Bioautografi langsung dilakukan dengan menyemprotkan suspensi mikroba uji yang peka dalam medium cair ke permukaan KLT hasil elusi yang telah disersihkan dari sisa eluen yang menempel dikromotogram. Selanjutnya

diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Uji bioautografi langsung memiliki kemampuan untuk mendeteksi antibakteri pada konsentrasi rendah

2. Bioautografi overlay prinsip kerja dari metode ini yaitu media agar yang telah dicampur dengan mikroorganisme kemudian dituang diatas permukaan lempeng KLT, lalu media ditunggu hingga memadat selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Area hambatan dapat dilihat melalui penyemprotan dengan tetrazolium klorida. Area jernih dengan latar berwarna ungu menandakan terdapat senyawa aktif antimikroba
3. Bioautografi kontak prinsip kerja dari metode ini ialah menyimpan lempeng kromatografi hasil elusi senyawa yang akan diuji diatas permukaan medium padat yang telah diinokulasikan dengan mikroba uji. Area jernih yang tidak ditumbuhi mikroba menunjukkan bahwa terdapat senyawa antimikroba

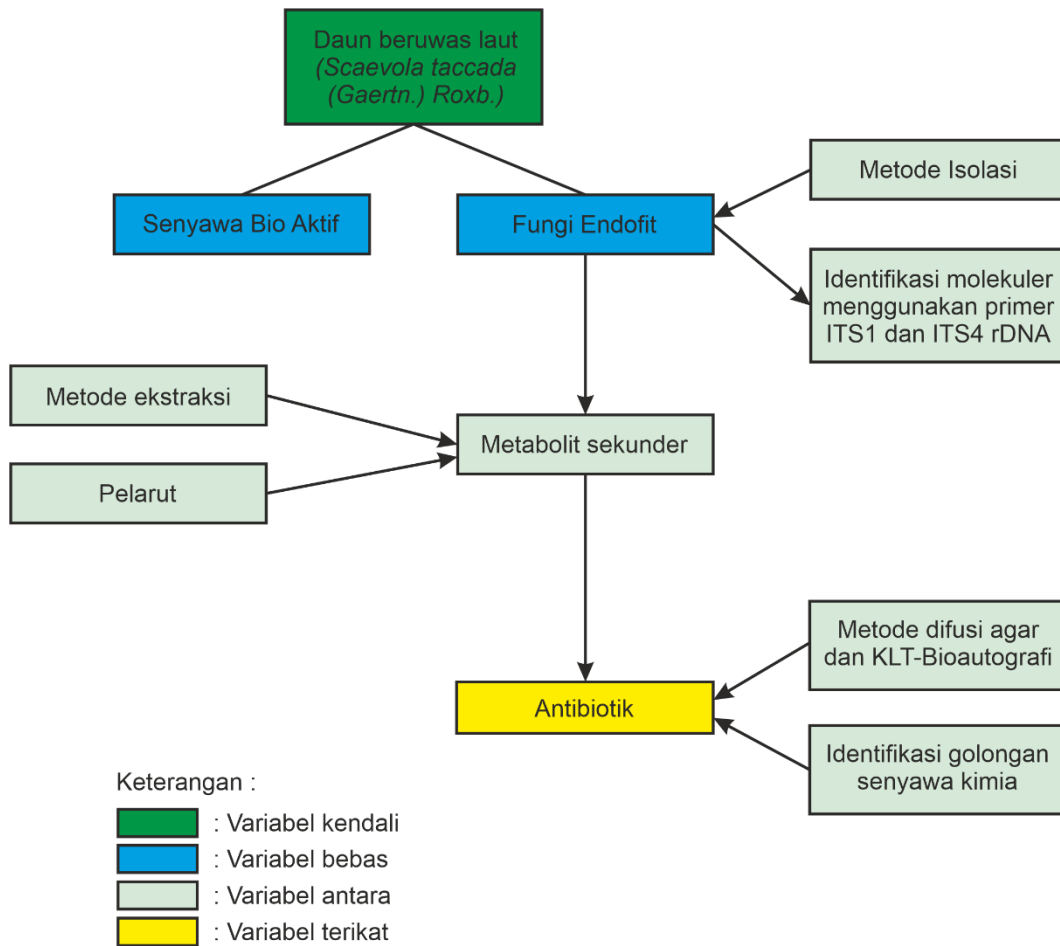
Keuntungan dari bioautografi adalah bahwa itu adalah metode yang mudah digunakan dan dapat diidentifikasi dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi aktivitas biologis dalam matriks yang kompleks secara langsung. utamanya berkaitan dengan kemampuan suatu senyawa untuk menghentikan perkembangan mikroba (Poernomo & Nataly, 2015).

## I. Kerangka Teori



Gambar 10. Kerangka Teori

## J. Kerangka Konsep



Gambar 11. Kerangka Konsep