

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA ANTIBAKTERI  
DARI ISOLAT FUNGI ENDOFIT *Syzygium polyanthum***

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIBACTERIAL  
COMPOUND FROM ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATE OF  
*Syzygium polyanthum*

MUH. AZWAR AR



SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR

2020



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA ANTIBAKTERI  
DARI ISOLAT FUNGI ENDOFIT *Syzygium polyanthum***

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Magister Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

**MUH. AZWAR AR**

Kepada

**SEKOLAH PASCASARJANA**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2020**



**TESIS**

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA ANTIBAKTERI  
DARI ISOLAT FUNGI ENDOFIT *Syzygium polyanthum***

Disusun dan diajukan oleh

MUH. AZWAR AR

Nomor Pokok N012181022

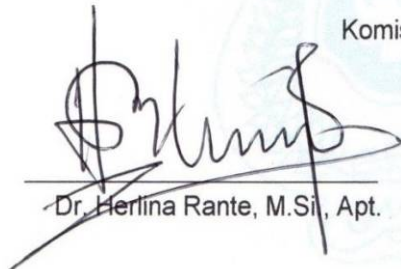
telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

pada tanggal 1 Oktober 2020

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Komisi Penasihat,



Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt.

Ketua



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

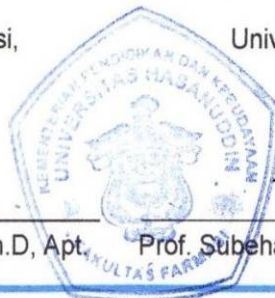
Sekretaris

Ketua Program Studi Magister  
Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi,



Ihammad Aswad, M.Si., Ph.D., Apt.

Dekan Fakultas Farmasi  
Universitas Hasanuddin,



Prof. Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.



## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muh. Azwar AR

Nomor Mahasiswa : N012181022

Program Studi : Farmasi Sains

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

Makassar, Oktober 2020

Yang menyatakan



Muh. Azwar AR



## PRAKATA

*Bismillahirrahmanirrahim, alhamdulillah*, segala puji dan syukur penulis panjatkan atas kepada **Allah SWT** atas segala rahmat, taufik, hidayah, dan kasih sayang hingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis dengan judul “Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri dari Isolat Fungi Endofit *Syzygium polyanthum*” . Tesis ini disusun sebagai syarat untuk mencapai gelar Magister di Program Studi Farmasi Konsentrasi Farmasi Sains di Universitas Hasanuddin, Makassar.

Shalawat dan taslim juga tidak lupa penulis panjatkan kepada baginda **Rasulullah saw.**, yang membawa risalah serta motivasi untuk terus beribadah dan berikhtiar di jalan yang lurus.

Penulis juga ingin berterima kasih sebesar-besarnya kepada orang tua penulis yaitu ayahanda **Muh. Arief M.** dan ibunda **A. Rostina**, yang telah mendidik dan membesarkan penulis dengan penuh cinta dan kasih sayang dan juga saudara kandung penulis atas doa dan semangatnya, dan juga seluruh keluarga besar penulis yang tercinta.

Dengan tersusunnya tesis ini, penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Yth. Ibu Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. sebagai Ketua Tim Komisi Penasihat Tesis dan Yth. Bapak Prof. Dr. H. M. Natsir Djide, MS, Apt., selaku Sekretaris yang telah berkenan memberi bimbingan, arahan, dan masukan bagi tersusunnya tesis yang layak untuk disajikan.

Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada: Yth. Bapak Prof. Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin sekaligus sebagai komisi penguji dan bapak Muhammad Aswad, M.Si., Ph.D.. Apt. selaku Ketua Program Studi Magister Fakultas Farmasi yang tulus memberikan nasehat, bimbingan, semangat, serta petunjuk



dalam menempuh pendidikan di Universitas Hasanuddin sampai pada penyusunan tesis ini.

Penulis juga mengucapkan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Bapak Firzan Nainu, M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt. dan Ibu Dr. Sartini, M.Si., Apt. atas segala masukan dan sarannya selama menjadi anggota dalam Komisi Penguji.

Ucapan terima kasih juga tidak lupa penulis ucapkan kepada:

1. Dinda apt. Karina Nur Rahma Fitria Syahrir, S.Si. yang senantiasa memberi dukungan, doa, dan senantiasa mengingatkan penulis untuk selalu beribadah dikala sibuk menyelesaikan tugas-tugas sejak awal kuliah sampai akhir penyelesaian studi Magister Farmasi di Universitas Hasanuddin bahkan hingga pada penyusunan thesis ini.
2. Rekan-rekan korps. asisten Farmakognosi-Fitokimia, terkhusus kepada kanda Ismail, S.Si., M.Si., Apt., Muh. Raihan S.Si., Apt., Abdillah Mahmud, amd.AK., yang senantiasa memberikan motivasi kepada penulis untuk tetap semangat dalam menjalani proses perkuliahan.
3. Semua pihak yang telah membantu yang tak bisa penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tesis ini masih terdapat kelemahan yang perlu diperkuat dan kekurangan yang perlu dilengkapi. Oleh karena itu, dengan rendah hati penulis mengharapkan masukan, koreksi, dan saran untuk memperkuat kelemahan dan melengkapi kekurangan tersebut.

Makassar, Oktober 2020

Muh. Azwar AR



## ABSTRAK

Fungi endofit adalah jenis mikroorganisme yang terdapat dalam jaringan tumbuhan yang mampu menghasilkan senyawa dengan aktivitas biologis salah satunya sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan karakteristik senyawa hasil isolasi dari fungi endofit XP2 pada daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.). Penelitian ini dimulai dengan mengisolasi fungi endofit dari daun salam kemudian dilakukan fermentasi fungi endofit selama 18 hari dalam kondisi tershaker dalam medium PDB (*Potato Dextrose Broth*). Hasil fermentasi kemudian diekstraksi dengan menggunakan etil asetat (1:1 v/v). Ekstrak yang diperoleh selanjutnya difraksinasi dengan metode kromatografi kolom. Hasil fraksinasi selanjutnya di refraksinasi lagi sehingga diperoleh senyawa tunggal yang kemudian diberi kode senyawa subfraksi 4b. Senyawa subfraksi 4b selanjutnya diuji aktivitas antibakterinya dengan menggunakan metode difusi agar dengan konsentrasi 1% b/v; 0,15 mg/disk. Hasil uji aktivitas antibakteri senyawa subfraksi 4b menunjukkan penghambatan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (17,88 mm) dan *Salmonella thyposa* (15,56 mm). Senyawa subfraksi 4b diskriminasi golongan senyawanya dengan pereaksi semprot dragendorff pada plat TLC dengan hasil spot berwarna jingga yang diduga merupakan senyawa golongan alkaloid. Senyawa subfraksi 4b selanjutnya dianalisis karakteristik senyawanya dengan instrumen GC-MS yang hasilnya diperoleh spektrum massa dari puncak pada Rt 38,075 dengan ion molekul pada m/z=484. Berdasarkan data dari Library NIST dan Wiley 9, senyawa subfraksi 4b diduga sebagai senyawa betulin dengan indeks similarity mencapai 92. Selain itu, dilakukan analisis gugus fungsi senyawa subfraksi 4b menggunakan spektroskopi IR sehingga diperoleh gugus fungsi C-H; C≡N; O=C; -CH<sub>3</sub>; C-N ; dan aromatis yang diduga sebagai komponen penyusun senyawa subfraksi 4b.

Kata Kunci : Fungi Endofit, Tanaman salam, *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp., Antibakteri.



## ABSTRACT

Endophytic fungi are types of microorganisms which found in plant tissues that capable to producing compounds of biological activity, one of which is antibacterial. This study aims to determine the antibacterial activity and characteristics of compounds isolated from the XP2 endophytic fungi on bay leaves (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.). This research was started by isolating the endophytic fungi from bay leaves then fermentation the endophytic fungi for 18 days in the shaking conditions in PDB (Potato Dextrose Broth) medium. The fermentation product was then extracted using ethyl acetate (1: 1 v / v). The extract obtained was then fractionated by column chromatography method. The fractionation refracted again to obtain a single compound which is coded the XP2a compound. The 4b subfraction compound was then tested for its antibacterial activity using the agar diffusion method at a concentration of 1% w/v; 0,15 mg / disk. The results of the antibacterial activity test of 4b subfraction compound showed inhibition of *Staphylococcus aureus* (17.88 mm) and *Salmonella thyposa* (15.56 mm) bacteria. 4b subfraction compound are screened for the compounds by dragendorf reagents on TLC plates with orange spot results which are thought to be alkaloid compounds. Then, The 4b subfraction compound was analyzed for its compound characteristics using the GC-MS instrument, which the results obtained by the mass spectrum of the peak at Rt 38.075 with molecular ions at  $m / z = 484$ . Based on data from the NIST Library and Wiley 9, the 4b subfraction compound was suspected to be a betulin compound by similiarity index of 92. In addition, the functional group analysis of the 4b subfraction compound was carried out using IR spectroscopy to obtain the C-H;  $C\equiv N$ ;  $O=C$ ;  $-CH_3$ ; C-N ; and aromatics functional group which is suspected as component of the 4b subfraction compound.

Keywords: Endophytic fungi, Bay plants, *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp., Antibacterial.





## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>Prakata</b>	iv
<b>Abstrak</b>	vii
<b>Abstract</b>	viii
<b>DAFTAR ISI</b>	ix
<b>DAFTAR TABEL</b>	xii
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	xvii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	6
A. Tinjauan Umum Tanaman	6
B. Uji Aktivitas Antimikroba	7
C. Kromatografi Lapis Tipis	9
D. Spektroskopi Infra Red (IR-Spectroscopy)	11
E. Gas Chromatography-Mass Spectrometry	11
F. Kerangka Teori	13
. Kerangka Konsep	14



<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	16
A. Rancangan dan Lokasi Penelitian	16
B. Alat dan Bahan Tahap Persiapan	16
C. Metode Kerja	17
a. Pengambilan Sampel	17
b. Sterilisasi Alat	17
c. Pembuatan Medium	18
d. Isolasi Fungi Endofit	18
e. Pengujian Mikroskopik	19
f. Penyiapan Bakteri Uji	19
g. Pembuatan Larutan Standar McFarland	20
h. Pengujian Aktivitas Antimikroba Dengan Uji Antagonis	20
i. Fermentasi (Produksi Senyawa Metabolit)	20
j. Ekstraksi Senyawa Metabolit	21
k. Pengujian Aktivitas Antibakteri	21
l. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Skrining Fitokimia	21
m. Isolasi dan Pemurnian Senyawa Aktif	22
n. Identifikasi FTIR	25
o. Identifikasi GC-MS	25
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	27
A. Isolasi Fungi Endofit	27
. Uji Mikroskopik Fungi Endofit XP1 dan XP2	29



C. Uji Antagonis Isolat Fungi Endofit	31
D. Fermentasi Fungi Endofit	33
E. Ekstraksi Senyawa Aktif Fungi Endofit	34
F. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat XP2	35
G. Fraksinasi Ekstrak Isolat Etil Asetat Dari Fungi Endofit XP2	
H. Uji Aktivitas Daya Hambat Hasil Fraksinasi Isolat Etil Asetat Terhadap Bakteri Uji	39
I. Refraksinasi Ekstrak Fraksi 4 Dari Senyawa Isolat Fungi Endofit XP2	40
J. Uji Aktivitas Daya Hambat Hasil Refraksinasi dari Fraksi 4 Terhadap Bakteri Uji	41
K. Analisis Skrining Senyawa Subfraksi 4b	44
L. Analisis Gas Chromatografi – Mass Spectoscopy	45
M. Analisis <i>Infra Red Spectroscopy</i>	47
<b>BAB V PENUTUP</b>	50
A. Kesimpulan	50
B. Saran	50
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	51
<b>LAMPIRAN</b>	55



## DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Uji Antagonis Isolat Fungi Endofit XP1	31
2. Uji Antagonis Isolat Fungi Endofit XP2	32
3. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat (10%) dari fermentasi isolat XP2 terhadap beberapa bakteri uji (diameter penghambatan ditunjukkan dalam mm (milimeter))	35
4. Hasil Pengujian daya hambat dari fraksinasi ekstrak etil asetat terhadap bakteri <i>Salmonella thypi</i> (diameter penghambatan ditunjukkan dalam mm (millimeter))	39
5. Hasil Pengujian daya hambat dari subfraksi 4a, 4b, 4c, dan 4d (0,15 mg/disk) terhadap bakteri <i>Salmonella thypi</i> (diameter penghambatan ditunjukkan dalam mm (millimeter))	41
6. Hasil Pengujian daya hambat dari subfraksi 4a, 4b, 4c, dan 4d (0,15 mg/disk) terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> (diameter penghambatan ditunjukkan dalam mm (millimeter))	42



7. Hasil analisis skrining fitokimia senyawa subfraksi 4b	44
8. Data Spektrum IR senyawa subfraksi 4b	48



## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Isolat fungi endofit XP1 dan XP2 dari daun <i>Syzygium polyanthum</i>	29
2. Isolat Fungi endofit XP1 (umur 4 hari) pada media PDA tampak dari atas (a); tampak dari bawah (b); dan bentuk mikroskopik pembesaran 100x	30
3. Isolat Fungi endofit XP2 (umur 4 hari) pada media PDA tampak dari atas (a); tampak dari bawah (b); dan bentuk mikroskopik pembesaran 100x.	31
4. Hasil Fermentasi Fungi Endofit XP2 dengan menggunakan shaker selama 18 hari (a), biomassa setelah penyaringan (b), dan medium yang telah disaring (c).	34
5. Ekstrak Etil asetat isolat Fungi Endofit XP2	35
6. Hasil kromatografi kolom dengan menggunakan eluen heksan:etil asetat (1:5) dengan penampakan setelah penyemprotan H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (A); Penampakan di bawah lampu UV 366 nm (B); dan penampakan di bawah lampu UV 254 nm (C).	37



7. Ekstrak hasil kromatografi kolom ekstrak isolat etil asetat	38
8. Hasil fraksinasi ekstrak isolat etil asetat	38
9. Pengujian fraksi terhadap bakteri <i>Salmonella thypi</i>	40
10. Hasil refraksinasi kromatografi kolom dengan menggunakan eluen heksan:etil asetat (1:5) dengan penampakan di bawah lampu UV 254 nm(A); penampakan setelah penyemprotan H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (B); dan penampakan di bawah lampu UV 366 nm (C).	41
11. Pengujian daya hambat subfraksi 4a, 4b, 4c, dan 4d terhadap bakteri <i>Salmonella thypi</i> (Kanan) dan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> (kiri).	42
12. Hasil analisis skrining fitokimia menggunakan pereaksi Dragendorf dengan penampakan di bawah sinar tampak (A); di bawah lampu UV 254 nm (B) dan lampu UV 366 nm (C)	45
13. Hasil kromatogram analisis GC-MS dengan spesifikasi kolom yang digunakan adalah kolom SH-Rxi-5Sil MS, panjang kolom 30 m dengan diameter dalam 0,25 mm	45



14. Kromatogram hasil analisis dari senyawa subfraksi 4 (atas) dan pembanding senyawa Betulin (Bawah) berdasarkan pada library NIST dan Wiley 9	46
15. Data Spectrum kromatogram senyawa senyawa subfraksi 4b	47





## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Hasil Pengukuran GC-MS	55
2. Hasil Pengukuran IR Spektroskopi	58
3. Komposisi Medium	57
4. Skema Kerja	58



# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. LATAR BELAKANG

Indonesia yang merupakan negara yang memiliki hutan hujan tropis terbesar di dunia memiliki potensi sebagai penghasil tanaman obat yang sangat besar. Hanya sekitar 7.500 jenis tanaman yang telah diketahui memiliki manfaat sebagai tanaman obat dari sejumlah 30.000 jenis yang telah diidentifikasi. Dari 7.500 spesies ini, baru sekitar 1200 spesies yang telah dimanfaatkan sebagai bahan baku obat-obatan herbal atau jamu. Hasil riset Kesehatan Dasar (Risesdas) yang dilaksanakan oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan pada tahun 2013 menunjukkan sebesar 30,4% rumah tangga di Indonesia memanfaatkan pelayanan kesehatan tradisional. (sidomuncul, 2015).

Salah satu penyakit yang menjadi masalah penting dalam dunia kesehatan adalah penyakit infeksi. Penyakit infeksi banyak ditemukan di Negara yang beriklim tropis, seperti Indonesia. Suhu yang hangat dan kelembaban tinggi membuat bakteri dan jamur mudah untuk berkembang dan kemudian menyebabkan berbagai penyakit infeksi (Darmadi, 2008).

Bentuk pengobatan yang dilakukan untuk melawan infeksi adalah penggunaan antibiotika. Namun, dari solusi ini ternyata juga menambah kekeruhan keadaan dengan semakin meningkatnya resistensi antibiotika yang juga seiring dengan munculnya



mikroorganisme patogen yang berpotensi pada tingkat penyebaran secara global dengan cepat. Sehingga penemuan dan pengembangan sumber antibiotika yang baru merupakan usaha dalam mengatasi penyakit infeksi. (Menpara et al., 2013).

Resistensi antibiotika telah menjadi masalah kesehatan utama dan merupakan ancaman bagi kesehatan di dunia. Resistensi mikroorganisme terhadap antibiotika memiliki berbagai mekanisme misalnya mencegah akses ke target obat dan memodifikasi antibiotika (Blair et al., 2015). Langkah penemuan dan pengembangan sumber antibiotika baru adalah dengan mengeksplorasi potensi metabolit sekunder dari bahan alam tanaman. Namun, untuk menemukan senyawa bioaktif diperlukan banyak tanaman atau bagian tanaman yang diekstraksi sehingga perlu usaha untuk menjaga kelestarian tanaman. Selain sintesis senyawa, cara untuk mencegah pengeksploitasian tanaman adalah dengan memanfaatkan mikroba endofit yang terdapat dalam jaringan tanaman (Strobel dan Daisy, 2013).

Mikroba endofit memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa bioaktif yang mirip dengan tanaman inangnya (Radji, 2005). Mikroba endofit dapat berupa bakteri ataupun fungi. Diantara keduanya, fungi endofit lebih banyak dilakukan penelitian karena lebih berpotensi silkan metabolit dan pertumbuhannya yang lebih mudah untuk ikan dibandingkan bakteri (Tan dan Zou, 2011). Hal ini dapat ia bahwa fungi endofit dapat dengan mudah diisolasi dari jaringan



tanaman yang permukaannya telah disterilkan dan dibudidayakan pada *dextrose agar*. Hubungan antara endofit dan tanaman inang adalah *latent phyto-genesis* sampai simbiosis mutualisme (Aly et al. 2010). Endofit yang bersifat latent phyto-genesis ini berkaitan dengan reaksi enzimatik dan terjadi di dalam jaringan tanaman. Hubungan tanaman inang dengan endofit ini memungkinkan terjadi rekombinasi genetik sehingga endofit dapat memproduksi beberapa phytochemical (alkaloid, terpenoid, derivat isokumarin, quinon, flavonoid, fenol, dan lain-lain) yang awalnya merupakan karakteristik dari tanaman inangnya (Huang et al. 2008).

Fungi endofit adalah jenis mikroorganisme yang terdapat dalam jaringan tumbuhan misalnya pada daun, batang, akar, bunga, buah, dan biji. Senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas biologis dapat dihasilkan oleh fungi endofit. Senyawa-senyawa yang dihasilkan dapat memiliki aktivitas seperti anti kanker, antivirus, antibakteri, anti jamur, hormon pertumbuhan tanaman, insektisida, dan lain-lain.

Berbagai jenis tanaman terutama tanaman obat, dapat dimanfaatkan sebagai sumber isolat fungi endofit. Jenis tumbuhan yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat, terkhusus masyarakat etnis di Sulawesi Selatan sebagai bahan baku obat-obat tradisional oleh pengobat tradisional (Batra) antara lain dari suku Myrtaceae. Salah satu jenis yang

digunakan adalah salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.). Salam merupakan pohon yang menghasilkan rempah dengan rasanya paling banyak pada bagian daunnya. Daun salam



mengandung banyak minyak atsiri dan beberapa senyawa yang memiliki aktivitas sebagai anti infeksi seperti quersetin, asam galat, alkaloid, saponin, asam fenol, steroid, flavonoid, dan terpenoid, hidrokvikol, dan derivat floroglusinol seperti anthuminoat dan anthuminon yang terkandung dalam fraksi etil asetat daun salam.

Penelitian yang dilakukan oleh Lau *et al*, 2004, membuktikan ekstrak dalam daun salam memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri *B. cereus* (MIC 0.31 mg/mL) dan *B. subtilis* (MIC 0,63 mg/mL). Penelitian yang dilakukan oleh Burhamzah dan Rante, 2017, menunjukkan bahwa isolat fungi endofit yang telah diisolasi dari daun salam mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

Dari uraian di atas, penelitian tentang fungi endofit dari daun salam (*S. polyanthum* (Wight) Walp.) masih sedikit. Selain itu, senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh fungi endofit tanaman *S. polyanthum* (Wight) Walp. juga masih belum diketahui karakteristik dari senyawa bioaktifnya sehingga perlu penelitian lebih lanjut dalam karakterisasi senyawa yang diproduksi dan kemudian diharapkan dapat menjadi kandidat senyawa antibakteri yang berpotensi dan bermanfaat dalam dunia kesehatan.

## B. Rumusan Masalah



Berdasarkan pada latar belakang yang telah diuraikan di atas, dapat dirumuskan masalah adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana aktivitas antibakteri metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat fungi endofit dalam daun salam (*S. polyanthum* (Wight) Walp.)?
2. Bagaimana karakteristik senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh isolat fungi endofit dalam daun salam (*S. polyanthum* (Wight) Walp.) berdasar pada data spektroskopi?

### **C. Tujuan Penulisan**

1. Mengetahui aktivitas antibakteri metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat fungi endofit dalam daun salam (*S. polyanthum* (Wight) Walp.)
2. Mengetahui karakteristik senyawa yang dihasilkan oleh isolat fungi endofit dalam daun salam (*S. polyanthum* (Wight) Walp.) berdasarkan data spektroskopi.

### **D. MANFAAT PENELITIAN**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pengembangan ilmu pengetahuan dibidang kesehatan, terkhusus dalam bidang mikrobiologi dan infeksi tentang pemanfaatan fungi endofit terkhusus lagi dari daun salam (*S. polyanthum* (Wight) Walp.) sebagai penghasil senyawa bioaktif antibakteri.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Tinjauan Umum Tanaman

##### 1. Deskripsi Tanaman Salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.)

Salam tumbuh liar baik di daerah pegunungan maupun di daerah dataran rendah sampai 1400 m dpl. Salam merupakan pohon dengan tinggi mencapai 25 m, batang bulat, permukaan batang licin, bertajuk rimbun dan berakar tunggang. Daun tunggal, letak berhadapan, panjang tangkai daun 0,5-1 cm. Helaian daun berbentuk lonjong sampai elips atau bundar telur sungsang, ujung meruncing pangkal runcing, tepi rata, pertulangan menyirip, permukaan atas licin berwarna hijau tua, permukaan bawah berwarna hijau muda, panjang 5-15 cm, lebar 3-8 cm, jika diremas berbau harum. Bunga majemuk yang tersusun dalam malai yang keluar dari ujung ranting, berwarna putih, baunya harum. Buahnya buah buni, bulat, diameter 8-9 mm, buah muda berwarna hijau, setelah masak menjadi merah gelap, rasanya agak sepat. Biji bulat, diameter sekitar 1 cm, berwarna coklat.

Adapun klasifikasi dari tanaman daun Salam adalah sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Class	: Dicotyledoneae
rdo	: Myrtales
amilia	: Myrtaceae



Genus : Syzygium

Spesies : *Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.)

Tanaman salam khususnya pada daunnya diketahui memiliki kandungan flavonoid, minyak atsiri (asam sitrat, eugenol, methyl chavicol, cis-4-decenal (27,12%), octanal (11,98%),  $\alpha$ -pinene (9,09%), Farnesol (8,84%),  $\beta$ -ocimene (7,92%), dan nonanal (7,60%)), seskuiterpen, triterpenoid, fenol, steroid, sitral, lakton, saponin, karbohidrat, selenium, tannin, dan niasin (Silalahi, 2017).

## B. Uji Aktivitas Antimikroba

Metode yang paling umum digunakan untuk menganalisis aktivitas antimikroba dibedakan menjadi tiga metode yaitu metode difusi, metode dilusi dan metode bioautografi. Metode dilusi digunakan untuk analisis secara kuantitatif dengan menentukan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) atau MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). Sedangkan metode difusi dan bioautografi merupakan teknik untuk analisis secara kualitatif karena metode ini hanya menunjukkan ada tidaknya senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba (Pratiwi, 2008).

### 1. Metode Difusi

Senyawa antimikroba yang hendak dianalisis aktivitas antimikrobanya akan berdifusi pada medium agar yang telah disiapkan mikroba uji. Dasar pengamatannya adalah dengan analisis ada atau tidaknya zona hambat pertumbuhan mikroba (1980). Metode difusi ini dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu :





a. Metode disc diffusion (tes Kirby & Bauer) / Metode cakram

Pada metode ini, kertas filter cakram (diameter  $\pm$  6 mm), berisi senyawa uji yang ditempatkan pada permukaan yang sebelumnya telah diinokulasi dengan mikroba uji. Kemudian, diinkubasi pada suhu kamar (27-29°C) selama 1 sampai 2 minggu untuk fungi dan pada suhu 37°C selama 18-24 jam untuk bakteri. Agen antimikroba akan berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan mikroba uji. Kemudian ada atau tidaknya zona hambat dapat diamati di sekeliling cakram (Lorian, 1980). Pembacaan hasil percobaan didasarkan atas besarnya zona hambat yang terbentuk dan dinyatakan dalam tiga kategori (Lorian, 1980):

1. Zona hambat total : bila zona hambat yang terbentuk disekitar cakram terlihat jernih.
2. Zona hambat parsial : bila di dalam zona hambat yang terbentuk masih terlihat adanya pertumbuhan beberapa koloni baru.
3. Zona hambat nol : bila tidak ada zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram.

b. Ditch-plate technique/Metode parit

Pada metode ini sampel uji berupa agen antimikroba yang diletakkan pada parit yang dibuat dengan cara memotong media agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur. Mikroba uji (maksimum 6 macam) digoreskan ke arah parit yang berisi agen

uji (Pratiwi, 2008). Lalu, diinkubasi pada suhu kamar (27-29°C) 1 sampai 2 minggu untuk fungi dan pada suhu 37°C selama 18-24



jam untuk bakteri. Kemudian, diamati ada atau tidaknya zona hambat terhadap pertumbuhan mikroba uji disekeliling parit (Lorian, 1980).

c. Cup-plate technique/Metode lubang atau cawan

Metode ini serupa dengan metode disc diffusion, di mana dibuat lubang pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme. Pada lubang tersebut diberi agen antimikroba yang akan diuji (Pratiwi, 2008). Lalu, diinkubasi pada suhu kamar (27-29°C) selama 1 sampai 2 minggu untuk fungi dan pada suhu 37°C selama 18-24 jam untuk bakteri. Kemudian, diamati ada atau tidaknya zona hambat terhadap pertumbuhan mikroba uji disekeliling lubang (Lorian, 1980).

### C. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi merupakan suatu tehnik pemisahan yang menggunakan fase diam (stationary) dan fase gerak (mobile phase). Menurut Gandjar dan Rohman (2007), kromatografi dapat dibedakan atas berbagai macam tergantung pada pengelompokannya. Berdasarkan pada mekanisme pemisahannya, kromatografi dibedakan menjadi, kromatografi adsorpsi, kromatografi partisi, kromatografi pasangan ion, kromatografi eksklusi ukuran dan kromatografi afinitas. Sedangkan berdasarkan pada alat yang digunakan, kromatografi dapat dibagi atas, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), kromatografi gas, kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, yang keduanya sering disebut dengan kromatografi planar.



Kromatografi lapis tipis umumnya banyak digunakan karena operasinya lebih mudah dan murah dibandingkan dengan

kromatografi kolom. Beberapa keuntungan lainnya yaitu kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk tujuan analisis, identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi, atau dengan radiasi menggunakan sinar ultra violet, dapat dilakukan elusi secara mekanik (ascending), menurun (descending), atau dengan cara elusi 2 dimensi, dan ketepatan dalam penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak (Gandjar dan Rohaman, 2007).

Pemisahan kromatografi lapis tipis pada umumnya dihentikan sebelum semua fase gerak melewati seluruh permukaan fase diam. Solut pada kedua kromatografi ini dikarakterisasi dengan jarak migrasi solute terhadap jarak ujung fase geraknya. Faktor retardasi solut ( $R_f$ ) dihitung dengan menggunakan perbandingan berikut :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Nilai maksimum  $R_f$  adalah 1 dan ini dicapai ketika solut mempunyai perbandingan distribusi ( $D$ ) dan faktor retensi ( $k'$ ) sama dengan 0 yang berarti solut bermigrasi dengan kecepatan yang sama dengan fase gerak. Nilai minimum  $R_f$  adalah 0 jika solut bertahan pada posisi titik awal di permukaan fase diam (Gandjar dan Rohman, 2007).

*Retention factor* ( $R_f$ ) merupakan faktor dari sebuah nilai atau ukuran dapat berdasarkan posisi noda setiap zat terlarut pada plat grafi lapis tipis. Nilai  $R_f$  didapatkan dengan cara membagi nilai



antara jarak dari awal penotolan suatu senyawa hingga noda senyawa tersebut berhenti ketika proses eluasi selesai (a) dibagi dengan jarak eluasi (b). Nilai R<sub>f</sub> memiliki rentang nilai dari 0.0 hingga 1.0, nilai ini dapat bervariasi karena disebabkan oleh berbagai faktor, seperti kualitas kelembaban, ketebalan plat, sorben, jarak eluasi, dan suhu lingkungan (Hosstetmann *et al.*,1995).

#### **D. Spektroskopi Infra-Red (IR-Spectroscopy)**

*Spektroskopi infra merah merupakan suatu metode yang mengamati interaksi molekul dengan radiasi elektromagnetik yang berada pada daerah panjang gelombang 0.75 – 1.000  $\mu\text{m}$  atau pada bilangan gelombang 13.000 – 10  $\text{cm}^{-1}$  (Giwangkara, 2006).*

*Dari pembagian daerah spektrum elektromagnetik tersebut di atas, daerah panjang gelombang yang digunakan pada alat spektroskopi inframerah adalah pada daerah inframerah pertengahan, yaitu pada panjang gelombang 2,5 – 50  $\mu\text{m}$  atau pada bilangan gelombang 4.000 – 200  $\text{cm}^{-1}$ . Daerah tersebut adalah cocok untuk perubahan energi vibrasi dalam molekul. Daerah inframerah yang jauh (400-10 $\text{cm}^{-1}$ , berguna untuk molekul yang mengandung atom berat, seperti senyawa anorganik tetapi lebih memerlukan teknik khusus percobaan (Silverstein *et al.*, 2005).*

#### **E. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)**

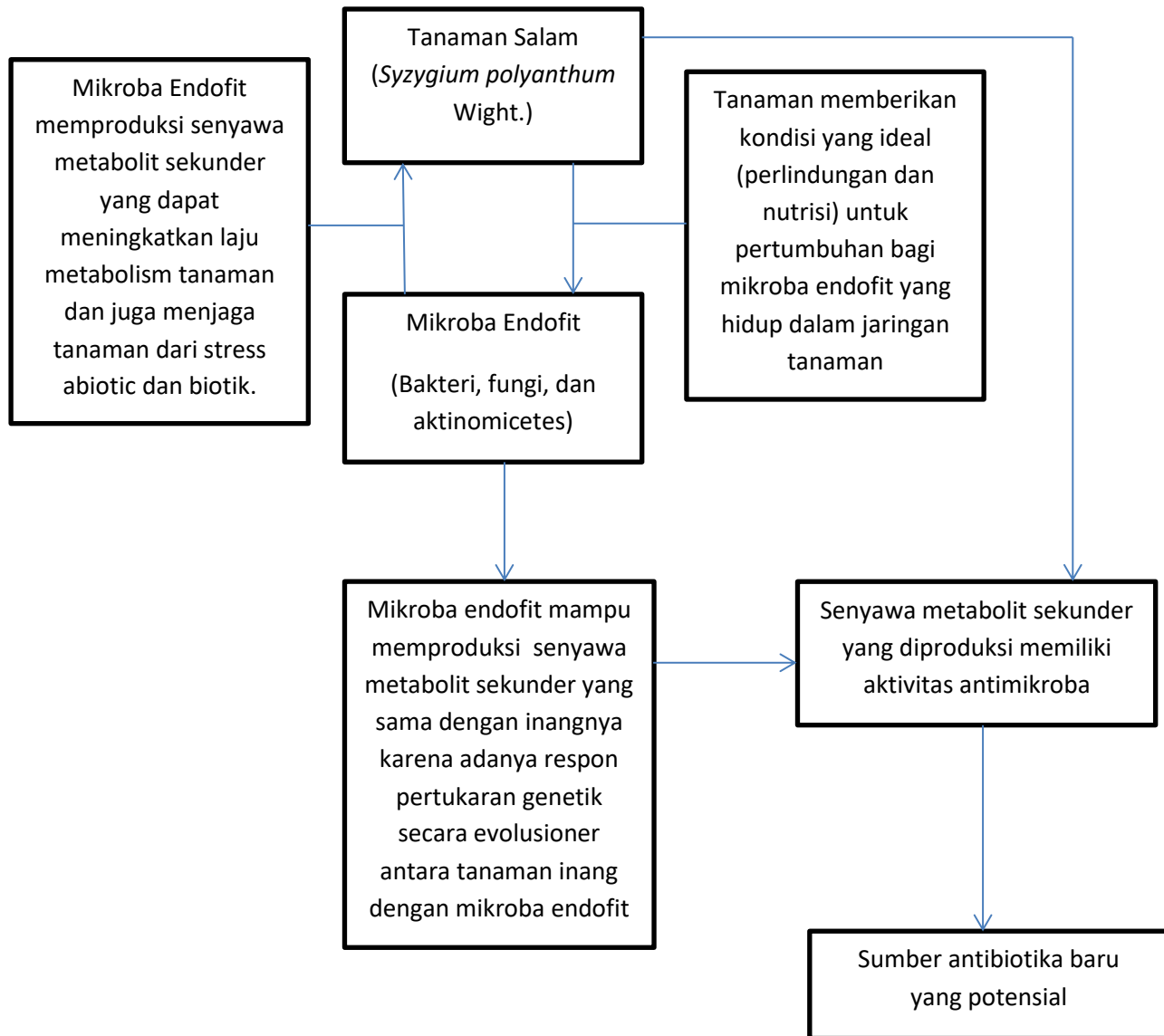


omponen utama GC-MS terdiri dari kromatografi gas dan grafi massa. Kromatografi gas memiliki kolom kapiler yang

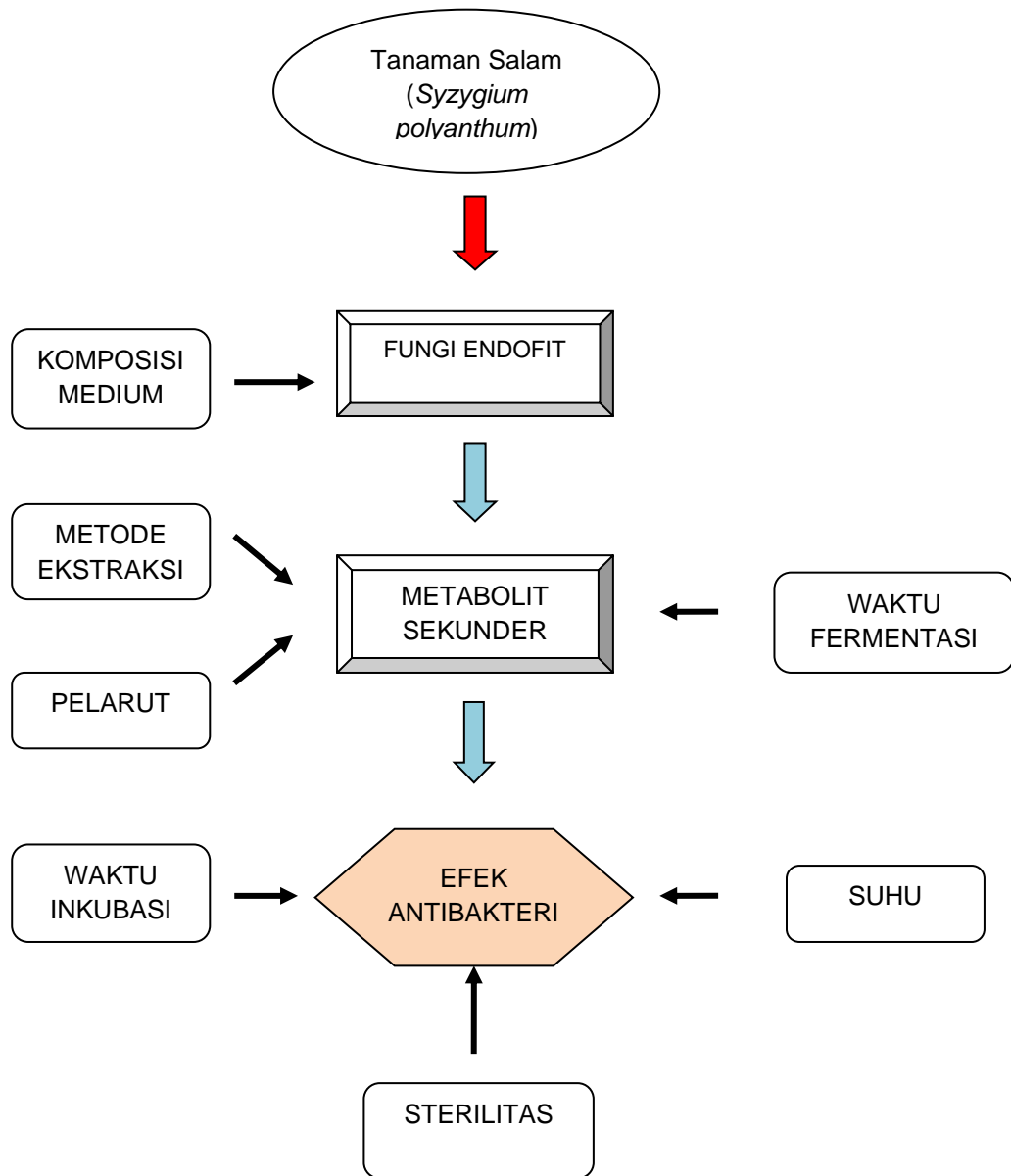
bergantung pada dimensi kolom yakni panjang, diameter, ketebalan film, serta sifat fase (sebagai contoh: 5% fenil polisiloksan). Perbedaan sifat kimia antara molekul-molekul yang berbeda dalam campuran dipartisi antar molekulnya dengan mengalirkan sampel disepanjang kolom. Molekul-molekul senyawa ini membutuhkan waktu yang berbeda-beda (yang disebut waktu retensi) untuk keluar dari kromatografi gas, dan ini yang memungkinkan spektrometri massa untuk menangkap, mengionisasi, mempercepat, membelokkan dan mendeteksi molekul terionisasi secara terpisah. Spektroskopi massa mendeteksi fragmen masing-masing molekul dalam model ion (Hanny setyowati, 2013).

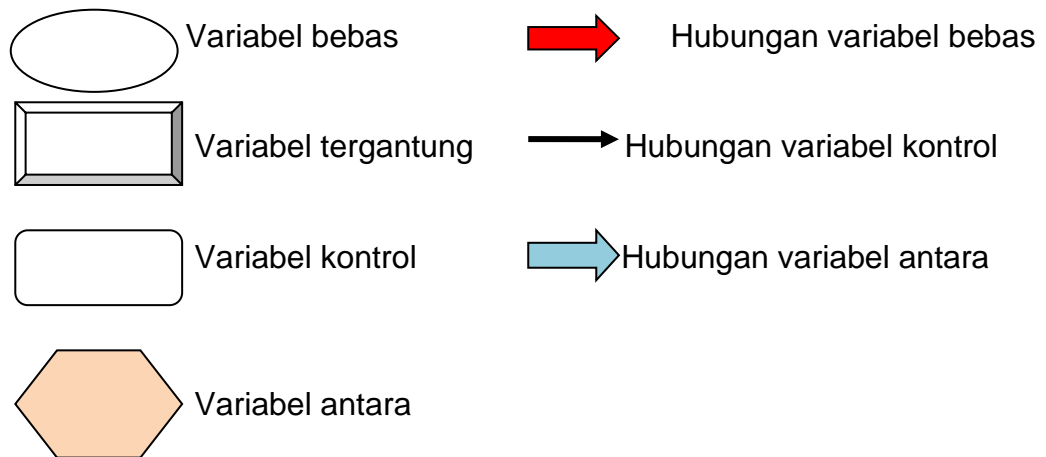


## F. KERANGKA TEORI



### G. Kerangka Konsep







## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Rancangan dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk mengisolasi dan elusidasi struktur senyawa yang diperoleh dari isolat fungi endofit dari daun salam (*S. polyanthum*) dengan aktivitas senyawa sebagai antimikroba. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Farmasi, dan laboratorium Fitokimia Farmasi, Universitas Hasanuddin Makassar.

#### B. Alat dan Bahan Tahap Persiapan

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, inkubator, laminar air flow, lemari pendingin, autoklaf, oven, timbangan analitik, shaker, mikropipet, sentrifuge, tabung appendorf, botol pengencer, ose bulat, pipa kapiler, pembakar Bunsen, alat penangas, seperangkat alat rotavapor, kromatografi kolom, seperangkat alat spektroskopi IR, seperangkat alat GC-MS, dan cawan petri.

Bahan-bahan yang digunakan adalah daun dan batang tanaman Salam (*Syzigium polyanthum*), air suling, alkohol 70%, etil asetat, lempeng klt, paper disk, biakan murni *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyposa*, *Bacillus subtilis*, dan *Pseudomonas aeroginosa*



laboratorium mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas (Idin), Medium PDA (*Potato Dextrose Agar*), PDB (*Potato Dextrose*

*Broth*), NA (*Nutrient Agar*), NaOCl 5%, aluminium foil, kapas, masker, silica gel 60, plat TLC, pereaksi dragendorf, pereaksi liebermann burchard, n-heksan, kloroform, dan metanol.

### C. Metode Kerja

#### a. Pengambilan Sampel

Sampel daun dan batang *S. polyanthum* diambil dari lokasi Kecamatan Tamalanrea, Kota Makassar, Provinsi Sulawesi selatan. Sampel daun dan ranting diambil dengan menggunakan pisau stainless still lalu dicuci dengan aquades steril. Sampel selanjutnya disimpan dalam wadah tertutup rapat yang telah diaseptiskan dengan alkohol 70%, selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk digunakan dalam penelitian.

#### b. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dicuci bersih dengan detergen lalu dibilas dengan air mengalir dan dibilas dengan air suling. Selanjutnya dikeringkan, dibungkus dan disterilkan. Tabung reaksi dan labu erlenmeyer yang terlebih dahulu disumbat dengan kapas bersih. Alat yang terbuat dari gelas disterilkan dalam oven pada suhu 180°C selama 2 jam sedangkan alat-alat yang tidak tahan pemanasan tinggi dan berskala disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit. Jarum ose disterilkan dengan cara pemanasan langsung dengan nakan api bunsen hingga memijar.



### **c. Pembuatan Medium**

#### **1. Medium PDA (Potato Dextrose Agar)**

Medium Potato Dextrose Agar ditimbang sebanyak 8 g, kemudian didispersikan dengan air suling hingga 1000 mL. Medium dipanaskan di atas penangas air dan disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm, pH 6,8.

#### **2. Medium NA (Nutrient Agar)**

Medium Nutrient Agar ditimbang sebanyak 23 g, kemudian didispersikan dengan air suling hingga 1000 mL. Medium dipanaskan di atas penangas air dan disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 atm, pH 6,8.

#### **3. Medium PDB (Potato Dextrose Broth)**

Medium Potato Dextrose Broth (PDB) ditimbang sebanyak 24 g, kemudian larutkan dengan air suling hingga 1000 mL. Medium dipanaskan di atas penangas air dan disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 atm.

### **d. Isolasi Fungi Endofit**

Sampel daun dan ranting *S. polyanthum* dicuci dengan air keran mengalir dan dikeringanginkan. Selanjutnya, sampel daun but dipotong kecil dengan ukuran 2x2 cm untuk daun. Fragmen



sampel daun tersebut disterilisasi masing-masing dengan proses perendaman berturut-turut dalam etanol 70% selama 2 menit, larutan sodium hipoklorit 5% selama 2 menit, dan dicuci dengan air steril sebanyak 3 (tiga) kali, masing-masing selama 1 menit. Sampel daun yang telah disterilisasi kemudian diiris setiap bagian tepinya lalu ditransfer ke plat medium padat PDA (*Potato Dextrose Agar*). Plat kultur tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 3x24 jam. Proses pemurnian strain mikroba endofit pada plat medium PDA dilakukan secara berulang hingga didapatkan strain murni.

#### e. Pengujian Mikroskopik

Objek dan deck glass didesinfeksi dengan alkohol. Disiapkan Lactophenol Cotton Blue (LCB) untuk pewarnaan. Dipipet 1-2 tetes larutan LCB ke dalam objek glass. Diambil koloni isolat fungi pada biakan/kultur jamur dari sampel swab di media PDA dengan ose dan diaduk perlahan pada objek glass. Difiksasi di atas api bunsen kemudian tutup dengan cover glass. Diamati di bawah mikroskop pada pembesaran 100 kali.

#### f. Penyiapan Bakteri Uji

Bakteri uji *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella thyposa*, dan *Pseudomonas aeroginosa* masing-masing



masing-masing satu ose lalu diinokulasi dengan cara digoreskan pada permukaan

NA miring lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

#### **g. Pembuatan Larutan Standar McFarland**

Larutan McFarland 0,5 digunakan sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair dengan kepadatan antara  $1 \times 10^7$  sel/mL –  $1 \times 10^8$  sel/mL (Quelab,2005). Pembuatan larutan McFarland 0,5 menurut Nurhayati (2007) adalah sebanyak 0,05 mL Barium Chlorida ( $\text{BaCl}_2$ ) 1% dalam aquadest ditambahkan 9,95 mL Asam Sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1%. Kemudian dikocok dalam tabung reaksi yang tertutup rapat.

#### **h. Pengujian Aktivitas Antimikroba dengan Uji Antagonis**

Penentuan aktivitas antimikroba dilakukan dengan cara semua isolat fungi ditumbuhkan ke dalam media PDA, kemudian fungi yang telah tumbuh berumur 7 hari ditempelkan di permukaan media NA (*Nutrient Agar*) yang telah diinokulasi bakteri uji pada cawan terpisah untuk masing-masing bakteri uji, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Isolat selanjutnya diamati kemampuannya menghambat bakteri uji yang ditandai dengan terbentuknya zona jernih di sekitar isolat. Isolat yang stabil membentuk zona jernih dipilih sebagai isolat untuk pengujian selanjutnya (Rante *et al.*, 2012).

#### **i. Fermentasi (Produksi Senyawa Metabolit)**

Isolat yang aktif pada uji antagonis difermentasikan dalam 1000 mL cair PDB (*Potato Dextrose Broth*). Fermentasi dilakukan selama pada kondisi tershaker dengan kecepatan 110 rpm.



## **j. Ekstraksi Senyawa Metabolit**

Media fermentasi disonikasi terlebih dahulu, kemudian disaring untuk memisahkan biomassa dan cairan fermentasi. Cairan fermentasi diekstraksi berulang dengan pelarut etil asetat (1:1 v/v) dalam corong pisah. Ekstrak yang diperoleh diuapkan lalu disimpan dalam desikator untuk digunakan pada uji aktivitas antibakteri (Rante dkk., 2012).

## **k. Pengujian Aktivitas Antibakteri**

Uji aktivitas senyawa antibakteri isolat fungi dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar. Ekstrak etil asetat yang telah diperoleh dibuat variasi konsentrasi uji 10% dengan menggunakan pelarut etil asetat. Ekstrak ditimbang 620 mg lalu dilarutkan hingga 6,2 mL (konsentrasi 10% b/v). Kontrol negatif berupa paper disk yang berisi etil asetat sedangkan kontrol positif berupa paper disk yang telah mengandung Amoxicillin 25 µg. Masing-masing larutan konsentrasi uji dan etil asetat dipipet 20 µL lalu diteteskan pada paper disk. Setelah pelarut menguap, paper disk diletakkan secara aseptis dipermukaan medium NA yang telah diinokulasi bakteri uji pada cawan petri, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Zona daya hambat yang terbentuk diamati lalu diukur dengan menggunakan jangka sorong (Rante dkk., 2012).

## **l. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Skrining Fitokimia**



Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan cara hasil ekstraksi (aktif) ditotolkan pada plat KLT dengan bantuan pipa kapiler, yang dilusi dengan campuran fase gerak n-heksan : etil asetat

(1:5) di dalam wadah chamber. Setelah dielusi, plat kromatogram dikeringkan. Untuk melihat pola pemisahannya, kromatogram tersebut dideteksi dengan melihat langsung pola kromatogram (dibantu dengan penyemprotan pereaksi  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%), lampu UV 254 dan 366 nm, kemudian hitung nilai Rf nya. Untuk mengetahui kandungan senyawa yang ada pada ekstrak tersebut, dilakukan identifikasi senyawa dengan menggunakan pereaksi golongan yaitu dengan cara menyemprotkan pereaksi dragendorf dan Liebermann-Burchard ke plat KLT. Perubahan warna diamati di bawah lampu UV 366 nm, 254 nm, dan sinar tampak.

### **m. Isolasi dan Pemurnian Senyawa Aktif**

#### **1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Ekstrak diambil secukupnya kemudian dilarutkan dalam 2 ml etil asetat. Kemudian ditotolkan pada plat KLT dengan pipa kapiler. Plat KLT kemudian dielusi dengan n-heksan : etil asetat (1:5) dalam chamber KLT sehingga eluen mencapai batas atas dari plat KLT. Noda yang dihasilkan dilihat dengan lampu UV 254 nm, 366 nm, dan di bawah sinar tampak setelah penyemprotan  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

#### **2. Fraksinasi Ekstrak Isolat Etil Asetat Fungi Endofit**

Ekstrak etil asetat yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan menimbang sebanyak 600 mg kemudian difraksinasi dengan menggunakan metode kromatografi kolom. Proses fraksinasi

an menggunakan fase diam silica gel 60 dan fase gerak yaitu  
n-heksan : etil asetat yang ditingkatkan kepolarannya secara



bergradien mulai dari n-heksan 100% sampai etil asetat 100% lalu berakhir dielusi dengan menggunakan methanol:kloroform (1:1) dan metanol 100%. Selanjutnya masing-masing ekstrak ditotolkan pada plat KLT berukuran 10x10 cm dengan pipa kapiler. Plat KLT kemudian dielusi dengan n-heksan : etil asetat (1:5) dalam chamber KLT sehingga eluen mencapai batas atas dari plat KLT. Noda yang dihasilkan dilihat dengan lampu UV 254 nm, 366 nm, dan di bawah sinar tampak setelah penyemprotan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Spot yang Nampak memiliki kemiripan nilai Rf digabung menjadi fraksi. Selanjutnya fraksi ini diuji aktivitas antibakteri dan diamati zona hambat yang terbentuk.

### **3. Uji Aktivitas Daya Hambat Hasil Fraksinasi Isolat Etil Asetat Terhadap Bakteri Uji**

Uji aktivitas daya hambat dilakukan dengan membuat larutan konsentrasi dengan membuat konsentrasi larutan uji 5%. Ekstrak fraksi 1, 2, 3, 4, dan 5 masing-masing ditimbang 168 mg, 56 mg, 59 mg, 48 mg dan 122 mg lalu dilarutkan masing-masing berturut-turut hingga 3,4 mL; 1,1 mL; 1,2 mL; 1 mL; dan 2,5 mL (konsentrasi 20% b/v). Kontrol negatif berupa paper disk yang berisi etil asetat sedangkan kontrol positif berupa paper disk yang telah mengandung Ampicillin 25 µg. Masing-masing larutan konsentrasi uji dan etil asetat dipipet 20 µL lalu diteteskan pada paper disk. Setelah pelarut menguap, paper disk



ikkan secara aseptis dipermukaan medium NA yang telah kulasi bakteri uji pada cawan petri, kemudian diinkubasi selama



24 jam. Zona daya hambat yang terbentuk diamati lalu diukur dengan menggunakan jangka sorong.

#### **4. Refraksinasi Ekstrak Fraksi aktif**

Ekstrak fraksi yang aktif memiliki aktivitas daya hambat terhadap bakteri uji, selanjutnya dilakukan fraksinasi ulang. Refraksinasi dilakukan dengan menimbang ekstrak fraksi 4 sebanyak 48 mg lalu difraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom. Proses refraksinasi dilakukan dengan menggunakan fase diam silica gel 60 dan fase gerak yaitu eluen n-heksan : etil asetat yang ditingkatkan kepolarannya secara bergradien mulai dari n-heksan 100% sampai etil asetat 100% lalu berakhir di elusi dengan menggunakan metanol:kloroform (1:1) dan metanol 100%. Selanjutnya masing-masing ekstrak ditotolkan pada plat KLT berukuran 10x10 cm dengan pipa kapiler. Plat KLT kemudian dielusi dengan n-heksan : etil asetat (1:5) dalam chamber KLT sehingga eluen mencapai batas atas dari plat KLT. Spot yang dihasilkan dilihat dengan lampu UV 254 nm, 366 nm, dan di bawah sinar tampak setelah penyemprotan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Spot yang nampak memiliki kemiripan nilai R<sub>f</sub> digabung lagi menjadi fraksi.

#### **5. Uji Aktivitas Daya Hambat Hasil Refraksinasi Isolat Etil Asetat Terhadap Bakteri Uji**

Uji aktivitas daya hambat dilakukan dengan membuat larutan entrasi dengan membuat konsentrasi larutan uji 1%. Ekstrak fraksi 3, dan 4, masing-masing ditimbang 7 mg, 13 mg, 9 mg, dan 8 mg



lalu dilarutkan masing-masing berturut-turut hingga 0,7 mL; 1,3 mL; 0,9 mL; dan 0,8 mL (konsentrasi 1% b/v). Kontrol negatif berupa paper disk yang berisi metanol sedangkan kontrol positif berupa paper disk yang telah mengandung Ampicillin 25 µg. Masing-masing larutan konsentrasi uji dan metanol dipipet 15 µL lalu diteteskan pada paper disk. Setelah pelarut menguap, paper disk diletakkan secara aseptis dipermukaan medium NA yang telah diinokulasi bakteri uji pada cawan petri, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Zona daya hambat yang terbentuk diamati lalu diukur dengan menggunakan jangka sorong.

#### **n. Identifikasi FTIR**

Dipipet setetes isolate ke dalam cell plate KBr dan dimasukkan ke dalam chamber instrument FT-IR. Panjang gelombang transmisi diatur antara  $4000\text{ cm}^{-1}$  hingga  $500\text{ cm}^{-1}$ . Data spektrum yang diperoleh selanjutnya diinterpretasikan.

#### **o. Identifikasi GC-MS**

Dipipet senyawa hasil isolasi sebanyak 0,5 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 50 mL dan diencerkan dengan aseton lalu dicukupkan hingga tanda batas. Pipet sebanyak 3 mL dan masukkan ke dalam vial. Diatur kondisi instrument GC-MS dengan suhu injector  $250^{\circ}\text{C}$  dengan mode spitless, tekanan 76,9 kPa dan laju alir 14mL/menit dan

10. Suhu sumber ion dan interface  $200^{\circ}\text{C}$  dan  $280^{\circ}\text{C}$ , waktu cut 3 menit, 400-700m/z. Jenis kolom yang digunakan SH-Rxi-5Sil yang kolom 30 m dengan diameter dalam 0,25 mm. Suhu awal



kolom 70°C dengan waktu tahan 2 menit dan suhu dinaikkan hingga 200°C dengan laju 10°C/menit dan suhu akhir 280°C dengan waktu tahan 9 menit dengan laju 5°C/menit. Sehingga total waktu analisa adalah 36 menit. Data kromatogram yang diperoleh dibaca dengan menggunakan library NIST dan Wiley 9.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Isolasi Fungi Endofit

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa aktif penghambat beberapa bakteri yang bersifat pathogen pada manusia. Tahap awal penelitian ini dilakukan dengan mengisolasi mikroba endofit dari daun *Syzigium polyanthum* (Wight) Walp. dengan metode tanam langsung. Metode ini dilakukan dengan menempelkan fragmen daun salam segar yang telah disterilisasi permukaannya di medium *Potato Dextrose Agar* untuk mendapatkan isolat jenis fungi. Tujuan dari sterilisasi permukaan untuk menghilangkan mikroba yang terdapat pada permukaan daun salam, sehingga saat proses isolasi, diharapkan mikroba jenis fungi yang tumbuh merupakan fungi yang berasal dari daun salam. Penggunaan Etanol 70% dimaksudkan untuk membunuh mikroba pada permukaan sampel melalui proses denaturasi protein mikroba. Proses ini memerlukan keberadaan air, sehingga demikian tidak digunakan Etanol murni. Adapun kadar Etanol sebesar 70% merupakan kadar optimum untuk sterilisasi. Proses sterilisasi juga semakin didukung dengan penggunaan sodium hipoklorit yang mampu melepas radikal klor sehingga merusak membran dan protein mikroba (Pratiwi, 2008). Selanjutnya n pembilasan dengan air steril sebanyak tiga kali untuk sihkan sisa kedua bahan tersebut. Air bilasan terakhir dijadikan



sebagai kontrol, apakah proses sterilisasi permukaan yang dilakukan telah berhasil atau tidak. Dikatakan berhasil apabila tidak terdapat pertumbuhan mikroorganisme pada hasil inokulasi air bilasan terakhir tersebut.

Senyawa aktif disolasi dari hasil metabolit sekunder dari fungi endofit daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.). Aktivitas terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri patogen seperti *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyposa*, *Bacillus subtilis*, dan *Pseudomonas aeroginosa* digunakan sebagai bioassay guided isolation untuk memperoleh senyawa antibakteri. Setiap tahap pemisahan senyawa dimonitor dengan pengujian daya hambat metode difusi agar terhadap beberapa bakteri uji hingga diperoleh senyawa aktif.

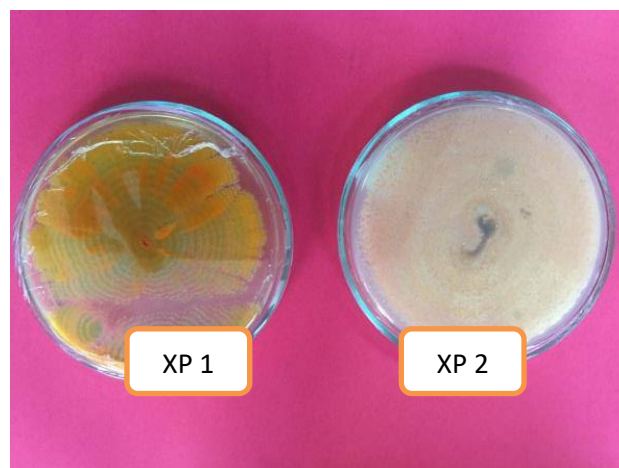
Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian yang dilakukan Asti,dkk. yang telah menemukan bahwa fungi endofit dalam daun salam memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyposa*, dan *Bacillus subtilis*,. Isolat fungi endofit ini kemudian dinamakan dengan nama XP1 dan XP2 (Asti, 2019).

Dari hasil pengujian, diperoleh 2 isolat fungi endofit yang berhasil diisolasi dari daun *S. polyanthum* (Wight) Walp.. Kedua isolat ini dapat dibuktikan merupakan jenis fungi karena dari penelitian sebelumnya yang dilakukan uji filogenetik pada Fragmen 18S rRNA , menyimpulkan



bahwa XP1 dan XP2 berasal dari jenis fungi *Penicilium sp.* dan *Colletotrichum gloeosporioides* (Asti, 2019).

Kedua fungi ini, XP1 dan XP2 dapat dibuktikan dengan tidak adanya pertumbuhan mikroorganisme pada air bilasan terakhir dalam medium pertumbuhan. Selain itu, pertumbuhan fungi endofit tersebut tumbuh tepat di sekeliling fragmen daun sehingga mikroba yang tumbuh dapat dipastikan berasal dari jaringan tanaman *S. polyanthum* (Wight) Walp.



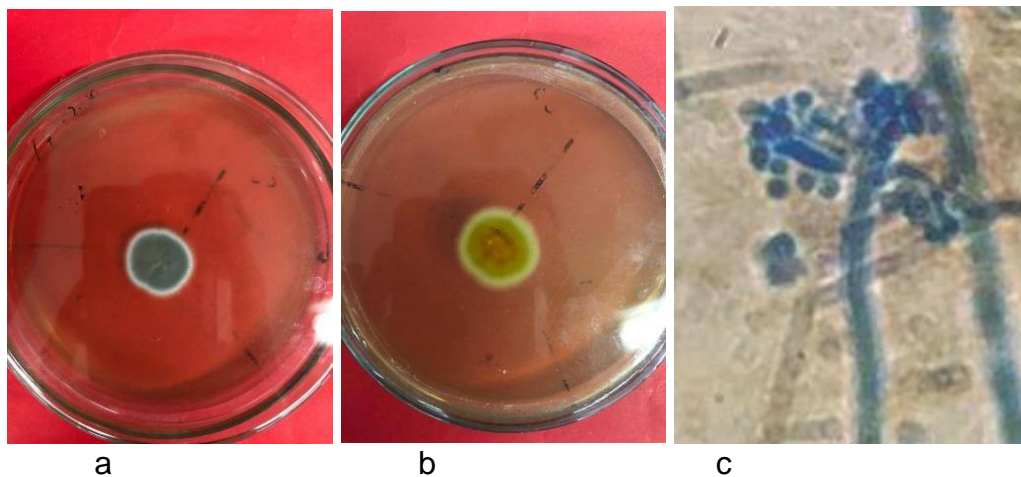
Gambar 1. Isolat fungi endofit XP1 dan XP2 dari daun *Syzygium polyanthum*.

### B. Uji Mikroskopik Fungi Endofit XP1 dan XP2

Pengujian mikroskopik selain bertujuan untuk membuktikan isolat XP1 dan XP2 adalah mikroorganisme jenis fungi, juga untuk mengetahui bentuk morfologi dari fungi endofit hasil isolasi dari tanaman *S. polyanthum*. Dari hasil pengujian secara makroskopik, pada isolat fungi memiliki ciri mula berwarna putih, lama kelamaan berwarna abu-abu



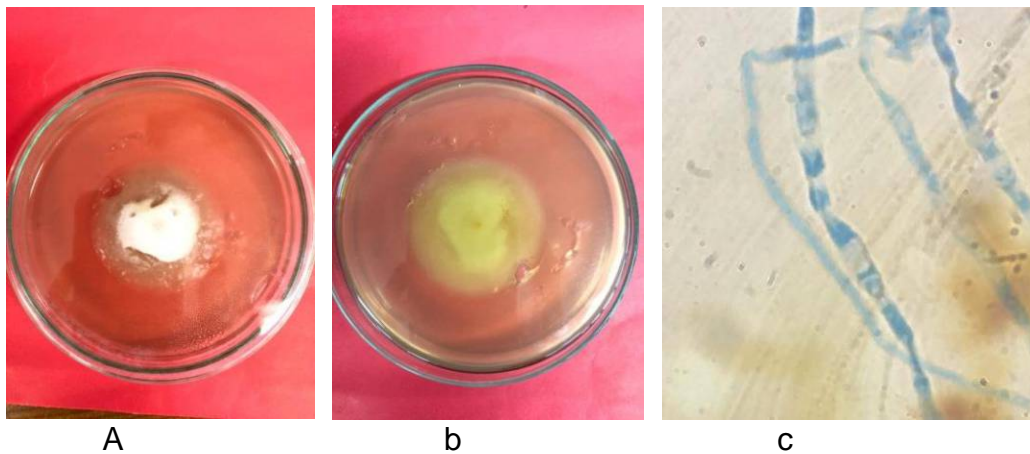
dengan pinggiran berwarna putih. Miselia udara terlihat berwarna putih sampai abu-abu dan miselia media berwarna kuning kehijauan. Secara mikroskopik dengan pembesaran 100x tampak konidia berwarna biru, konidiofor tidak bercabang dan hifa tampak tidak memiliki sekat (Hifa aseptat) (Watanebe, 2002; Leboof, 2010).



Gambar 2. Isolat Fungi endofit XP1 (umur 4 hari) pada media PDA tampak dari atas (a); tampak dari bawah (b); dan bentuk mikroskopik pembesaran 100x.

Dari hasil pengujian secara makroskopik pada isolat fungi XP2, memiliki ciri berwarna putih. Miselia udara terlihat berwarna putih dan miselia media berwarna kuning dan lama kelamaan berwarna jingga. Secara mikroskopik dengan pembesaran 100x, hifa tampak memiliki sekat (Hifa septat) (Watanebe, 2002; Leboof, 2010).





Gambar 3. Isolat Fungi endofit XP2 (umur 4 hari) pada media PDA tampak dari atas (a); tampak dari bawah (b); dan bentuk mikroskopik pembesaran 100x.

### C. Uji Antagonis Isolat Fungi Endofit

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas fungi endofit dalam menghambat pertumbuhan beberapa bakteri uji sehingga dapat dilakukan penyeleksian isolat yang memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri uji. Pengujian ini dilakukan bersama dengan peneliti sebelumnya (Asti, 2019) dengan menggunakan metode *agar block* dengan isolat fungi endofit yang telah diisolasi.

Tabel 1. Uji Antagonis Isolat Fungi Endofit XP1

Bakteri Uji	Penghambatan Oleh Isolat XP1
<i>E. coli</i>	+
<i>P. aeruginosa</i>	-
<i>S. aureus</i>	-
<i>B. subtilis</i>	+
<i>S. typosa</i>	+





Keterangan : (-) : tidak tampak adanya penghambatan pertumbuhan bakteri uji  
 (+) : Tampak adanya penghambatan pertumbuhan bakteri uji

Tabel 2. Uji Antagonis Isolat Fungi Endofit XP2

Bakteri Uji	Penghambatan Oleh Isolat XP2
<i>E. coli</i>	-
<i>P. aeruginosa</i>	-
<i>S. aureus</i>	+
<i>B. subtilis</i>	+
<i>S. thyposa</i>	++

Keterangan : (-) : tidak tampak adanya penghambatan pertumbuhan bakteri uji  
 (+) : Tampak adanya penghambatan pertumbuhan bakteri uji

Berdasarkan hasil pengujian yang dilakukan, isolat yang diperoleh memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Salmonella thyposa* dan *Bacillus subtilis*. Pada hasil pengujian aktivitas penghambatan dari isolat fungi XP2 terhadap bakteri *Salmonella thyposa*, menunjukkan daya hambat yang jauh lebih besar dibandingkan penghambatan bakteri uji yang lain. Diantara kedua isolat ini, dipilih isolat XP2 untuk dilanjutkan proses isolasi senyawa bioaktifnya karena dalam hasil yang diperoleh isolat XP2 memiliki daya penghambatan lebih besar terhadap bakteri uji

gkan isolat XP1.



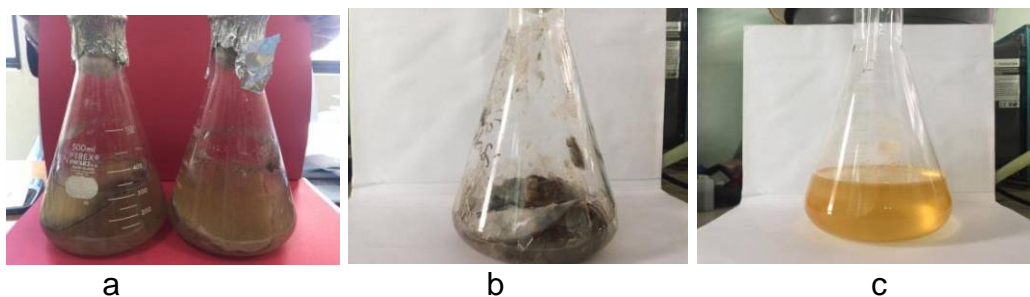
#### D. Fermentasi Fungi Endofit

Hasil isolat XP2 yang diperoleh difermentasi selama  $\pm 18$  hari untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder. Fermentasi dilakukan dengan shaking selama proses fermentasinya untuk memberikan pertumbuhan mikroba yang lebih homogen dalam medium (Sarkono, 2011). Adapun sistem fermentasi yang digunakan adalah sistem batch tertutup, dimana semua nutrisi yang dibutuhkan mikroba selama pertumbuhan dan pembentukan produk berada di dalam satu fermentor. Sehingga tidak ada penambahan bahan atau pengambilan hasil selama fermentasi berlangsung. Selanjutnya dilakukan ekstraksi terhadap cairan fermentasi pada hari ke-18. Dipilih hari ke 18 karena berada antara range yang dilakukan penelitian oleh Asti, dkk dan Burhamzah, R. yakni antara hari ke-15 dan ke-20 dengan hasil sama yang dalam waktu fermentasi tersebut, isolat fungi endofit dari daun salam telah memproduksi senyawa metabolit sekunder dan menunjukkan aktivitas menghambat pertumbuhan beberapa bakteri uji (Asti, 2019; Burhamzah, 2019), Penentuan lama fermentasi juga berdasarkan pada kurva pertumbuhan fungi endofit daun salam, dimana pada hari ke 15-20 merupakan waktu yang dibutuhkan fungi endofit daun salam agar dapat mencapai fase stasioner (Burhamzah R, 2018). Sebelum diekstraksi, medium fermentasi yang berisi cairan fermentasi dan biomassa isolat disonikasi terlebih dahulu



kecepatan gelombang 20 kHz selama 30 menit. Tujuan sonikasi untuk memecah sel dengan kekuatan gelombang ultrasonik

sehingga material sel akan masuk ke dalam medium bersama dengan cairan fermentasi. Selain itu, sonikasi juga mampu mempercepat perpindahan senyawa bioaktif dari dalam sel hasil fermentasi ke medium oleh proses yang disebut kavitasi. Proses kavitasi merupakan proses pembentukan gelembung-gelembung kecil oleh adanya transmisi gelombang ultrasonik untuk membantu difusi pelarut ke dalam sel (Afrianti, 2018). Hasil fermentasi selanjutnya disaring dengan menggunakan kertas whatman No. 41, diameter 9 cm yang di atasnya diberi kapas dengan modifikasi tambahan vakum untuk mempercepat proses penyaringan.



Gambar 4. Hasil Fermentasi Fungi Endofit XP2 dengan menggunakan shaker selama 18 hari (a), biomassa setelah penyaringan (b), dan medium yang telah disaring (c).

### E. Ekstraksi Senyawa Aktif Fungi Endofit

Dalam proses ekstraksi, cairan fermentasi yang diperoleh diekstraksi secara berulang dengan pelarut etil asetat:medium (1:1 v/v). Ekstrak yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan rotavapor. Penggunaan alat ini untuk mempersingkat proses pemisahan dari



dengan senyawa aktif. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya disimpan dalam desikator untuk digunakan pada uji aktivitas antibakteri.



Gambar 5. Ekstrak Etil asetat isolat Fungi Endofit XP2

#### F. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat XP2

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar. Ekstrak etil asetat yang telah diperoleh dibuat variasi konsentrasi uji 10% (2 mg/disk) dengan menggunakan pelarut etil asetat. Dari hasil pengujian diperoleh adanya penghambatan pertumbuhan terhadap beberapa bakteri uji.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat (10% (2 mg/disk) dari fermentasi isolat XP2 terhadap beberapa bakteri uji (diameter penghambatan ditunjukkan dalam mm (milimeter))

Bakteri	Rata-rata Diameter Hambatan (mm)
<i>taphylococcus aureus</i>	20,52



<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19,17
<i>Escherichia coli</i>	21,69
<i>Salmonella thypi</i>	22,30
<i>Bacillus subtilis</i>	20,79

Hasil yang diperoleh di atas berdasarkan data yang diperoleh dari penelitian yang dilakukan bersama dengan peneliti sebelumnya, dimana yang ditampilkan dalam pembahasan ini hanya berfokus pada isolat fungi endofit XP2. Dari Hasil pengujian di atas, diperoleh hasil bahwa ekstrak Etil asetat dari isolat XP2 memiliki diameter penghambatan yang lebih tinggi terhadap *Salmonella thypi* yang dapat mencapai 22,30 cm. Pengujian ini dapat terlihat bahwa senyawa antibakteri ekstrak etil asetat lebih berpotensi menghambat jenis bakteri gram negatif (*Salmonella thypii* dan *Escherichia coli*) dibandingkan bakteri gram positif. Hal ini diduga disebabkan oleh senyawa dari isolat fungi XP2 memiliki kemampuan sebagai antibakteri yang diduga mekanisme kerjanya mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk utuh kemudian menyebabkan kematian sel (Rabekka, 2015). Sintesis dinding sel yang terhambat akan menyebabkan lisis pada sel sehingga sel akan mati (Egra, 2019). Pada jenis bakteri gram positif, lapisan peptidoglikan lebih tebal sehingga menyebabkan senyawa sukar menembus dinding sel (Sari, 2016).



### G. Fraksinasi Ekstrak Isolat Etil Asetat Dari Fungi Endofit XP2

Ekstrak etil asetat yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan fraksinasi menggunakan fase diam silica gel 60 dan fase gerak yaitu eluen n-heksan : etil asetat yang ditingkatkan kepolarannya secara bergradien mulai dari n-heksan 100% sampai etil asetat 100% lalu berakhir dielusi dengan menggunakan methanol:kloroform (1:1) dan metanol 100%. TLC Dari hasil KK diperoleh sebanyak 13 fraksi. Dari 13 fraksi ini terdapat perbedaan spot di sepanjang lintasan plat TLC. Hal ini disebabkan adanya perbedaan kepolaran eluen yang digunakan dalam proses pengeluisan kolom. Eluen pada fraksi awal cenderung non polar kemudian meningkat kepolarannya ketika menuju ke fraksi akhir, sehingga menyebabkan adanya perbedaan kemampuan eluen untuk menarik komponen kandungan kimia dalam ekstrak (Azizah, 2014). Senyawa-senyawa yang terdapat di dalam ekstrak akan terpisah berdasarkan tingkat kepolarannya. Senyawa yang bersifat non polar akan terpartisi terlebih dahulu menyusul senyawa yang bersifat lebih polar (Setiawan, 2016).



Gambar 6. Hasil kromatografi kolom dengan menggunakan eluen heksan:etil asetat (1:5) dengan penampakan setelah penyemprotan  $H_2SO_4$  (A); Penampakan di bawah lampu UV 366 nm (B); dan penampakan di bawah lampu UV 254 nm (C).



Selanjutnya fraksi yang memiliki profil spot yang memiliki kemiripan digabung sehingga diperoleh 5 fraksi gabungan. Tujuan penggabungan ini untuk menyederhanakan fraksi yang diperoleh. Setelah diperoleh fraksi gabungan, selanjutnya dilakukan uji aktivitasnya terhadap bakteri uji.



Gambar 7. Ekstrak hasil kromatografi kolom ekstrak isolat etil asetat



Gambar 8. Hasil fraksinasi ekstrak isolat etil asetat



## H. Uji Aktivitas Daya Hambat Hasil Fraksinasi Isolat Etil Asetat Terhadap Bakteri Uji

Uji aktivitas daya hambat dilakukan dengan membuat larutan konsentrasi dengan membuat konsentrasi larutan uji 5% kemudian dilakukan pengujian terhadap bakteri *Salmonella thypi*.

Tabel 4. Hasil Pengujian daya hambat dari fraksinasi ekstrak etil asetat terhadap bakteri *Salmonella thypi* (diameter penghambatan ditunjukkan dalam mm (millimeter))

Sampel	Rata-rata Diameter Penghambatan (mm)
Fraksi 1 (0,988 mg/disk)	-
Fraksi 2 (1,018 mg/disk)	12,28
Fraksi 3 (0,983 mg/disk)	14,14
Fraksi 4 (0,966 mg/disk)	14,303
Fraksi 5 (0,976 mg/disk)	12,75
Kontrol Positif (Ampicillin)	15,806
Kontrol Negatif (Etil asetat)	-

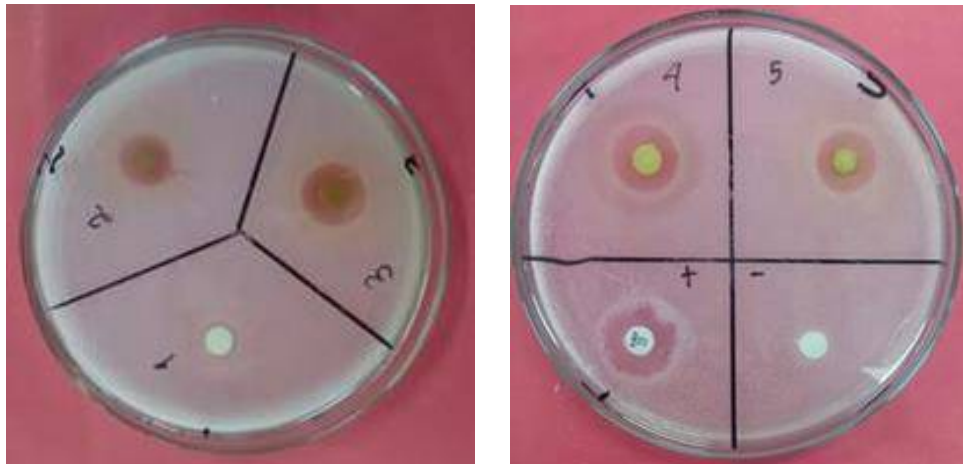
Berdasarkan hasil yang diperoleh, fraksi 4 memiliki aktivitas tertinggi dengan rata-rata diameter penghambatan 14,303 mm. Hasil ini menunjukkan fraksi 4 memiliki potensi untuk dipartisi ulang karena komponen senyawa yang dikandung di dalamnya masih banyak mengandung senyawa lain. Pemilihan ampicillin sebagai kontrol positif

ampicillin merupakan jenis antibiotic yang memiliki spektrum luas mampu menghambat pertumbuhan gram negatif dan positif





(wahyono, 2001). Dari hasil ini fraksi 4 kemudian difraksinasi kembali untuk mendapatkan partisi senyawa yang lebih sederhana.

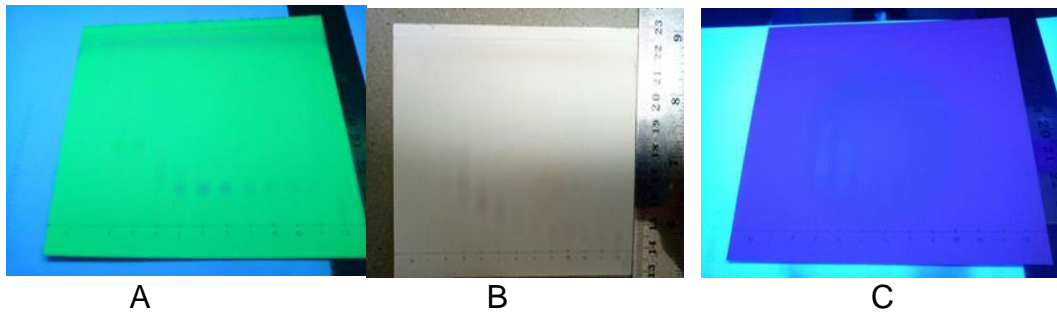


Gambar 9. Pengujian fraksi terhadap bakteri *Salmonella thypi*

### **I. Refraksinasi Ekstrak Fraksi 4 Dari Senyawa Isolat dari Fungi Endofit XP2**

Ekstrak fraksi 4 yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan fraksinasi ulang. Fraksinasi ulang dilakukan karena masih terdapat banyak komponen senyawa yang terkandung dalam fraksi. Fraksi yang dilakukan mirip dengan proses fraksinasi sebelumnya. Dari hasil KK diperoleh sebanyak 13 fraksi.





Gambar 10. Hasil refraksinasi kromatografi kolom dengan menggunakan eluen heksan:etil asetat (1:5) dengan penampakan di bawah lampu UV 254 nm(A); penampakan setelah penyemprotan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (B); dan penampakan di bawah lampu UV 366 nm (C).

Dari hasil penampakan spot pada plat TLC, terlihat kemiripan spot pada fraksi heksan-spot 4 (subfraksi 4a), disusul spot yang tampak tunggal pada fraksi 5-8 (subfraksi 4b), fraksi 9-11 (subfraksi 4c), dan fraksi 12 (subfraksi 4d). Penggabungan fraksi ini pada akhirnya diperoleh 4 subfraksi.

#### J. Uji Aktivitas Daya Hambat Hasil Refraksinasi dari Fraksi 4 Terhadap Bakteri Uji

Setelah diperoleh 4 subfraksi gabungan, selanjutnya diuji aktivitas penghambatan pertumbuhan bakterinya dengan metode difusi agar. Uji aktivitas daya hambat dilakukan dengan membuat larutan konsentrasi dengan membuat konsentrasi larutan uji 1% (0,15 mg/disk).

Tabel 5. Hasil Pengujian daya hambat dari subfraksi 4a, 4b, 4c, dan 4d (0,15mg/disk) terhadap bakteri *Salmonella thypi* (diameter penghambatan ditunjukkan dalam mm (millimeter))

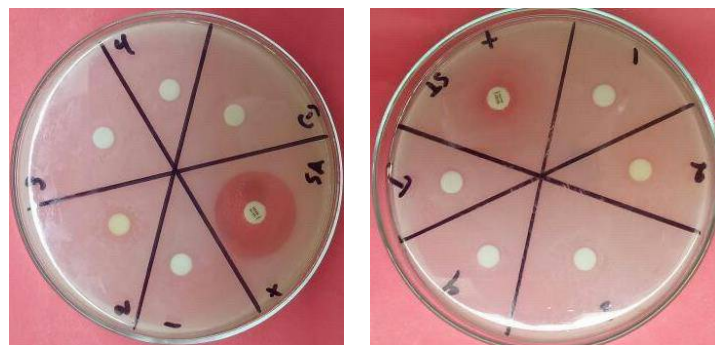
Sampel	Rata-rata Diameter Penghambatan
Subfraksi 4a	-
Subfraksi 4b	15,56
Subfraksi 4c	13,86



Subfraksi 4d	-
Kontrol Positif (Ampicillin)	24,78
Kontrol Negatif (Metanol)	0

Tabel 6. Hasil Pengujian daya hambat dari subfraksi 4a, 4b, 4c, dan 4d (0,15 mg/disk) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (diameter penghambatan ditunjukkan dalam mm (millimeter))

Sampel	Rata-rata Diameter Penghambatan
Subfraksi 4a	-
Subfraksi 4b	17,88
Subfraksi 4c	12,43
Subfraksi 4d	-
Kontrol Positif (Ampicillin)	26,79
Kontrol Negatif (Metanol)	-



Gambar 11. Pengujian daya hambat subfraksi 4a, 4b, 4c, dan 4d terhadap bakteri *Salmonella thypi* (Kanan) dan bakteri *Staphylococcus aureus* (kiri).



erdasarkan hasil yang diperoleh, subfraksi 4b yang memiliki penghambatan tertinggi dengan rata-rata diameter

penghambatan 15,56 mm pada bakteri *S. thypii* dan 17,88 mm pada bakteri *S. aureus*. Dari hasil penghambatan ini, dapat diketahui bahwa subfraksi 4b ini memiliki penghambatan terhadap bakteri *S. thypi* dimana bakteri ini merupakan representative dari jenis bakteri gram negatif sedangkan *S. aureus* merupakan representatif dari jenis bakteri gram positif. Meskipun mampu menghambat kedua jenis bakteri ini, subfraksi 4b ini masih perlu dilakukan pengujian lagi terhadap bakteri lain untuk dapat mengetahui kemampuan isolat ini dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif.

Dari hasil ini, menunjukkan pula penghambatan yang lebih besar setelah refraksinasi (penghambatan subfraksi 4b (konsentrasi 1%) terhadap *Salmonella thypi* mencapai 15,56 mm) dibandingkan sebelum refraksinasi (penghambatan fraksi 4 (konsentrasi 5%) terhadap *Salmonella thypi* hanya 14,303 mm). Hal ini disebabkan karena komponen senyawa pada subfraksi 4b jauh lebih murni dibandingkan fraksi 4. Selain itu, perbedaan komposisi senyawa dari sampel uji juga mempengaruhi besarnya penghambatan pertumbuhan pada bakteri uji (Salni, 2011).

Selanjutnya, subfraksi 4b ini menunjukkan spot tunggal di awal penggabungan fraksinya sehingga dalam penelitian ini tidak dilakukan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif untuk proses isolasi senyawa dan an dengan metode KLT 2 dimensi.



## K. Analisis Skrining Senyawa Subfraksi 4b

Penentuan golongan senyawa pada subfraksi 4b dilakukan dengan metode semprot. Metode ini dilakukan dengan mengembangkan senyawa di atas plat TLC kemudian dilakukan penyemprotan pereaksi golongan senyawa. Skrining fitokimia dilakukan terhadap ekstrak dengan tujuan mengidentifikasi golongan senyawa yang diisolasi. Analisis TLC pada subfraksi 4b dilakukan dengan menotolkan isolat pada lempeng TLC yang dikembangkan dengan fase gerak n-Heksan : etil asetat dengan perbandingan 1:5. Selanjutnya dilakukan penyemprotan pereaksi golongan dragendorf dan Lieberman-Burchard. Hasil yang diperoleh dilihat di bawah sinar tampak, UV 366 nm, dan UV 254 nm.

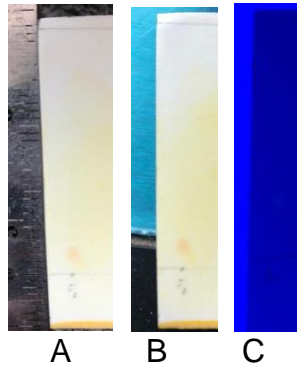
Tabel 7. Hasil analisis skrining fitokimia subfraksi 4b

kandungan kimia	Rf	Sinar Tampak		UV 366 nm		UV 254 nm		ket.
		tanpa Pereaksi	setelah disemprot	tanpa Pereaksi	setelah disemprot	tanpa Pereaksi	setelah disemprot	
Alkaloid (Pereaksi Dragendorf)	0,11	Putih	Jingga	Putih	coklat	Putih	Jingga	+
Terpenoid (Pereaksi Lieberman-Burchard)	0,11	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	Putih	-

Dari hasil analisis, menunjukkan bahwa subfraksi 4b diduga merupakan senyawa alkaloid. Hal ini dapat dilihat setelah dilakukan orotan pereaksi dragendorf, senyawa golongan alkaloid akan a coklat atau oranye (Wagner, 1996). Selain itu senyawa yang in oleh isolat fungi endofit yang diduga alkaloid ini juga memiliki



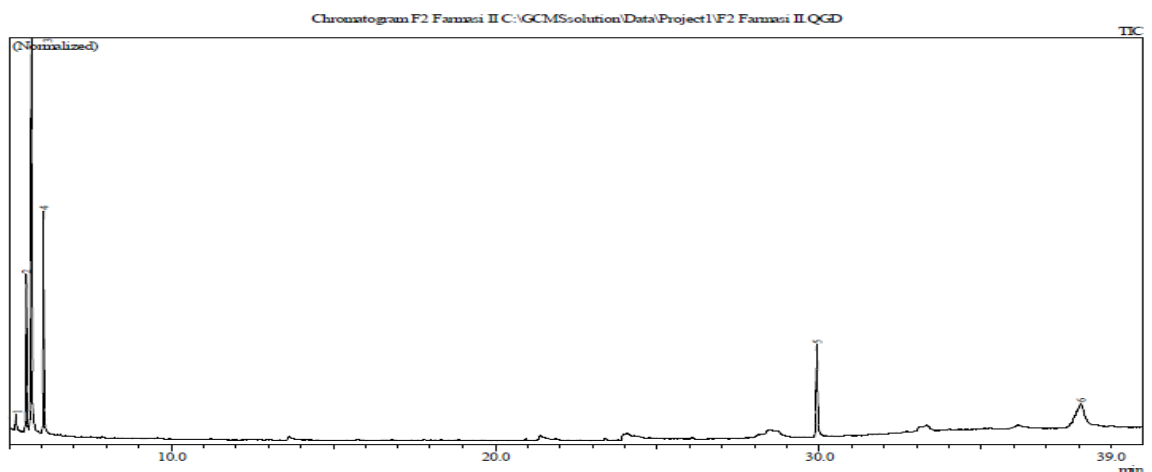
aktivitas antibakteri yang sama dengan aktivitas antibakteri dari ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) (Evendi A., 2017).



Gambar 12. Hasil analisis skrining fitokimia menggunakan pereaksi Dragendorff dengan penampakan di bawah sinar tampak (A); di bawah lampu UV 254 nm (B) dan lampu UV 366 nm (C)

### L. Analisis Gas Chromatografi – Mass Spectroscopy

Dari hasil analisis GC-MS, diperoleh setidaknya 6 jenis senyawa yang berhasil diidentifikasi dengan mengacu pada library NIST dan Wiley 9 yang dapat dilihat dari gambar 13 di bawah.



Peak#	R. Time	Area	Area%	A/H	Name
1	5.207	685801	1.35	2.18	2-PENTANONE, 4-HYDROXY-4-METHYL-
2	5.530	6627662	13.09	2.07	Ethylbenzene
	5.685	22657390	44.76	2.84	o-Xylene
	6.064	9005382	17.79	2.00	BENZENE, 1,2-DIMETHYL-
	29.924	6420081	12.68	3.44	BIS(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE
	38.077	5222402	10.32	13.97	Betulin
		50618718	100.00		

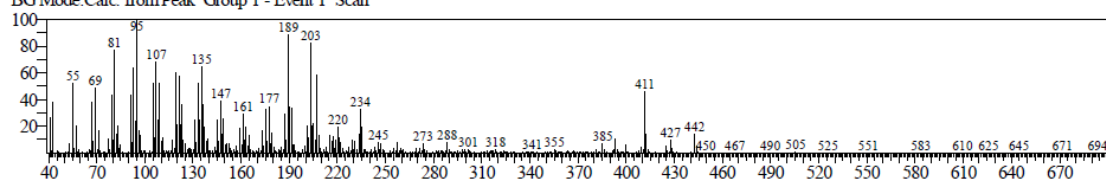


Gambar 13. Hasil kromatogram analisis GC-MS dengan spesifikasi kolom yang digunakan adalah kolom SH-Rxi-5Sil MS, panjang kolom 30 m dengan diameter dalam 0,25 mm.

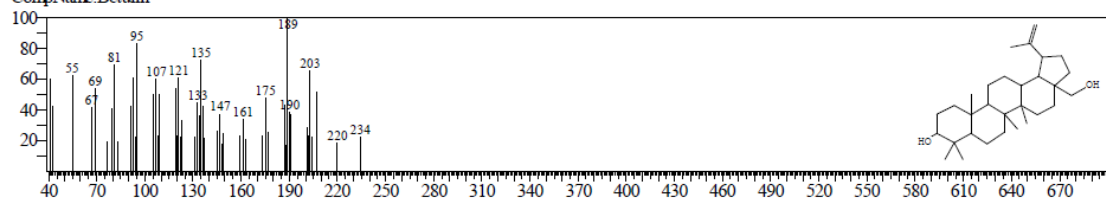
Dari keenam senyawa yang teranalisa, senyawa yang tampak intensitas yang kuat dengan luas area tertinggi adalah senyawa o-Xylene yang mencapai 44,76% pada Rt 5,685. Senyawa ini dianggap senyawa yang paling sering muncul dalam pengukuran GC-MS karena pelarut yang digunakan merupakan pelarut organik yang bersifat nonpolar sehingga senyawa xylene dapat terlarut di dalamnya. Selain itu dalam kromatogram juga menampakkan senyawa bis-phtalate yang tidak lain adalah senyawa yang tersusun dari senyawa o-xylene (Fabri, 2000). Yang menarik perhatian adalah peak 6 dimana dari kromatogram, peak ini terbaca sebagai senyawa betulin. Senyawa ini muncul pada Rt 38,075 dengan ion molekul pada  $m/z=484$ . Meskipun senyawa ini teridentifikasi berdasarkan library NIST dan Wiley 9, namun hal ini masih perlu dibuktikan kembali kebenaran senyawanya karena dari kromatogram hasil analisis dan kromatogram acuan, terdapat perbedaan fragmen massa. Selain itu, Hasil analisis skrining fitokimia juga menunjukkan senyawa alkaloid, yang berbeda dengan senyawa betulin yang merupakan senyawa terpenoid. Selain itu juga, *indeks similarity* hanya 92 yang masih belum cukup untuk diyakini kemiripan senyawanya sehingga senyawa ini masih perlu dilakukan analisis lebih lanjut menggunakan instrument  $C^{13}$ NMR dan



Line#: 6 R.Time: 38.075 (Scan#: 3970) MassPeaks: 484  
RawMode: Averaged 38.067-38.083 (3969-3971) BasePeak: 95.15 (13001)  
BGMode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#: 1 Entry: 27087 Library: NIST27.LIB  
SI: 92 Formula: C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub> CAS: 473-98-3 MolWeight: 442 RetIndex: 0  
CompName: Betulin



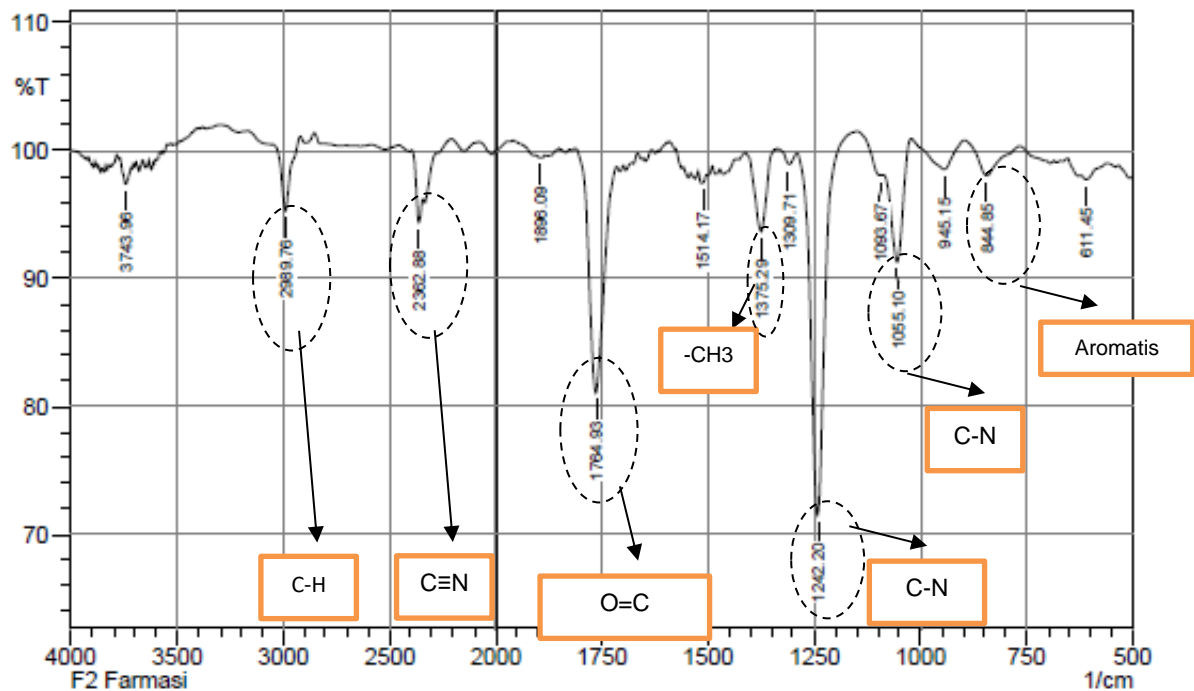
Gambar 14. Kromatogram hasil analisis dari senyawa subfraksi 4b (atas) dan pembandingan senyawa Betulin (Bawah) berdasarkan pada library NIST dan Wiley 9.

### M. Analisis *Infra Red Spectroscopy*

Dari hasil analisis menggunakan instrument IR-Spectroscopy dengan pengukuran panjang gelombang transmisi diatur antara 4000  $\text{cm}^{-1}$  hingga 500  $\text{cm}^{-1}$ , selanjutnya diperoleh data spectrum kemudian diinterpretasikan sebagai gugus fungsi yang terdapat dalam subfraksi 4b.







	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	611.45	97.746	0.493	623.03	559.38	0.457	0.049
2	844.85	98.049	2.578	896.93	765.77	0.298	0.627
3	945.15	98.537	2.322	1022.31	896.93	0.165	0.638
4	1055.1	91.286	8.226	1087.89	1022.31	1.217	1.075
5	1093.67	98.071	0.342	1149.61	1087.89	0.052	-0.005
6	1242.2	71.482	28.896	1290.42	1149.61	4.61	5.003
7	1309.71	98.943	0.996	1336.71	1290.42	0.092	0.086
8	1375.29	93.678	6.325	1411.94	1336.71	0.831	0.833
9	1514.17	97.45	0.8	1523.82	1504.53	0.193	0.045
10	1764.93	81.029	18.431	1813.15	1716.7	3.487	3.259
11	1896.09	99.437	0.214	1905.73	1884.52	0.045	0.013
12	2362.88	94.365	3.346	2395.67	2341.66	0.76	0.311
13	2989.76	95.305	5.474	3049.56	2920.32	0.7	1.148
14	3743.96	97.412	0.169	3767.1	3742.03	0.191	0.015

Gambar 15. Data Spectrum kromatogram senyawa subfraksi 4b

Tabel 8. Data Spektrum IR senyawa subfraksi 4b

No	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )		Intensitas	Kemungkinan Gugus Fungsi
	Data Spektra	Data Pustaka		
1	2989,76	3000-2850	Lemah	C-H
2	2362,88	2300-2200	Lemah	C≡N
3	1764,93	1810-1764	Kuat	O=C
4	1375,29	1375	Lemah	-CH3
5	1242,20	1350-1000	Kuat	C-N
6	1055,10	1350-1000	Sedang	C-N
7	844,85	900-690	Lemah	Aromatis



Daerah 4000-2500  $\text{cm}^{-1}$  pada umumnya disebabkan oleh peregangan oleh atom O-H, C-H, N-H. Spektrum memiliki puncak di kisaran 2500-2000, puncak biasanya disebabkan oleh ikatan rangkap tiga. Pada wilayah ketiga, yakni 2000-1500 puncak disesuaikan dengan penyerapan yang disebabkan oleh ikatan rangkap seperti C=O, C=N, dan C=C. kemudian wilayah keempat, yang disebut sebagai daerah finger print memiliki sejumlah besar puncak serapan untuk berbagai ikatan tunggal. Dari hasil analisis gugus fungsi subfraksi 4b menggunakan spektroskopi IR, diperoleh gugus fungsi C-H;  $\text{C}\equiv\text{N}$ ; O=C; -CH<sub>3</sub>; C-N ; dan Aromatis, yang diduga sebagai komponen penyusun senyawa subfraksi 4b (Dachriyanus, 2004; Skoog et.al., 2018; Rohman, 2014).



## BAB V

### PENUTUP

#### A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Senyawa subfraksi 4b yang diproduksi oleh fungi endofit daun *S. polyanthum* memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* (diameter zona hambat 17,88 mm) dan *S. thypi* (diameter zona hambat 15,56 mm) dengan menggunakan metode difusi agar pada konsentrasi 1% b/v, 0,15 mg/disk.
2. Berdasarkan data IR, Senyawa subfraksi 4b yang diproduksi oleh fungi endofit daun *S. polyanthum* mengandung gugus fungsi berupa C-H; C≡N; O=C; -CH<sub>3</sub>; C-N ; dan Aromatis.
3. Berdasarkan data GC-MS, hasil analisis senyawa subfraksi 4b diperoleh spektrum massa dari puncak pada Rt 38,075 dengan ion molekul pada m/z=484. Berdasarkan data dari Library NIST dan Wiley 9, senyawa subfraksi 4b diduga sebagai senyawa betulin dengan indeks similiarity mencapai 92.

#### B. Saran

Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap karakterisasi subfraksi 4b dari ekstrak fungi endofit daun *S. polyanthum* menggunakan data spektrofotometer <sup>1</sup>H-NMR dan <sup>13</sup>C-NMR untuk atkan struktur senyawa yang lebih akurat.



## DAFTAR PUSTAKA

- Afrianti, Lis. 2018. Karakteristik Kimia Ekstrak Laminaran Alga Coklat *Sargassum Crassifolium* secara sonikator. Brawijaya Knowledge Garden.
- Aly., A.H., Debbab, A., Kjer, J., and Proksch, P.. 2010. *Fungal Endophytes From Higher Plants: A Prolific Source of Phytochemicals And Other Bioactive Natural Products*. *Fungal Diversity* (41) Page. 1-16.
- Azizah, N. 2014. Isolasi Senyawa Terpenoid Dari Fraksi n-Heksana Daun *Marsilea crenata* Presl. (Rf 0,12 dengan Fase Gerak n-Heksana:Etil Asetat = 4:1). Skripsi Thesis, Universitas Airlangga
- Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. 2015. *Molecular mechanisms of antibiotic resistance*. *Nat Rev Microbiol.*(13). Hal. 42-51.
- Burhamzah Rahmita, Herlina Rante. 2017. *Karakterisasi Dan Analisis Filogenetik Mikroba Endofit *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp. Penghasil Senyawa Antimikroba*. Universitas Hasanuddin.
- Dachriyanus. 2004. Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi. Padang: Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi (LPTIK) Universitas Andalas.
- Darmadi, 2008. Infeksi nosocomial: problematika dan pengendaliannya. Salemba Medika:Jakarta. Hal. 5
- Djide, M. N. dan Sartini. 2008. Analisis Mikrobiologi Farmasi. Laboratorium Mikrobiologi farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Makassar
- Egra, Saat, dkk. 2019. Aktivitas Antimikroba Tanaman Paku (*Stenochlaena palustris* dan *Pteridium caudatum*) Terhadap Bakteri (*Ralstonia solanacearum* dan *Streptococcus sobrinus*). *Jurnal Jamu Indonesia* 4 (1): hal. 28-36
- Evendi, A. 2017. Uji Fitokimia dan Anti Bakteri Ekstrak Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) Terhadap Bakteri *Salmonella thypi* dan *Escherichia coli* Secara In Vitro. *Mahakam Medical Laboratory chnology Journal*. Vol 2 (1). Hal. 1-9.
- I., Graeser, U., and Simo,T. A. 2000. Xylenes. *Ullmann's cyclopedia of Industrial Chemistry*. Vol 39. Page. 645-663



- Giwangkara, S.E.G., 2006. Aplikasi Logika Syaraf Fuzzy pada Analisis Sidik Jari Minyak Bumi Menggunakan Spektrofotometer Infra Merah – Transformasi Fourier (FT-IR). Sekolah Tinggi Energi dan Mineral. Cepu-Jawa Tengah.
- Hostettmann, K., Marston, A., and Hostettmann, M. 1998. Preparative Chromatography Techniques. Verlag Berlin Heidelberg: Springer.
- Huang, W.,Y., Cai, Y., Z., Hyde, K., D., Corke, H., Sun M., 2008. *Biodiversity of Endophytic Fungi Associated With 29 Tradisional Chinese Medicinal Plants. Fungal Diversity. (36) Page. 61-75.*
- Khopkar, S. M. 2010. Konsep Dasar Kimia Analitik. UI-Press. Jakarta.
- Leboff, M. J. and Pierce, B. E. 2010. Microbiology: Laboratory Theory and Application, Third Edition. United State of America: Morton Publishing Company
- Menpara, D. dan Chanda, S. 2013. Endophytic bacteria-unexplored reservoir of antimicrobials for combating microbial pathogens. Microbial pathogens and strategies for combating them: science technology and education (A. Mendez Villaz Ed.)
- Pratiwi, S.T., 2008, Mikrobiologi Farmasi, Erlangga, Jakarta
- PT. Sidomuncul. 2015. Laporan tahunan. Hal. 75-77
- Rabekka, A, dkk. 2015. Uji Antibakteri Ekstrak Batang Kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. JOM faperta. 3(1).
- Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. Majalah Ilmu Kefarmasian. Vol. 2 (3). Hal: 113-126.
- Rohman, Abdul. 2014. Spektroskopi Inframerah dan Kemometrika untuk Analisis Farmasi. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Salni, dkk. 2011. Isolasi Senyawa Antibakteri dari Daun Jengkol (*Pithecolobium lobatum* Benth) dan Penentuan Nilai KHM-nya. Jurnal Penelitian Sains. Vol. 14 (1). Hal. 38-41.



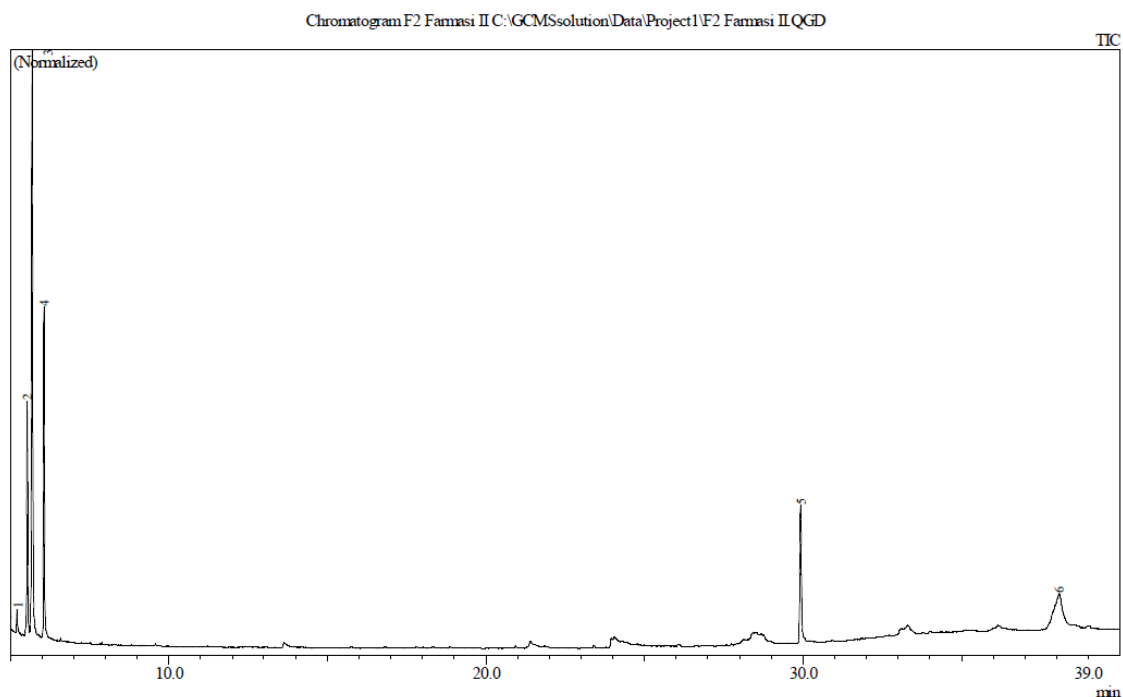
i Novita dan Mursiti, Sri. 2016. Isolasi Flavonoid dari biji mahoni (*Ictinia macrophylla*, King) dan Uji Aktivitasnya sebagai bakteri. *Indo. J. Chem. Sci.* 5(3).

- Sarkono, dkk. 2011. Optimasi Kondisi Fermentasi Untuk Produksi Selulosa Bakteri Oleh Strain SLK-1 Dalam Media Dasar Air Kelapa. Seminar Nasional IX Pendidikan Biologi FKIP UNS. Semarang, 11 April 2011. Hal. 490-495.
- Setiawan, Arum. Dkk. 2016. Sitotoksisits Fraksi Nonpolar Brucea javanica (L.) Merr. Terhadap Sel Kanker Payudara T47D. Jurnal Penelitian Sains Vol. 18 (3). Hal. 111-118.
- Setyowati, Hanny, dkk. 2013. Isolasi dan Standarisasi Bahan Alam Gas Chromatography-Mass Spectrometry GC-MS. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Yayasan Farmasi semarang. Diakses tanggal 17 Juli 2020.
- Silalahi, M. 2017. *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp. (Botani, Metabolit Sekunder dan Pemanfaatan). J D P Vol. 10 (1). Hal. 1-6.
- Skoog, D.A., Holler, F. J., Crouch, S. R. 2018. Principles of Instrumental Analysis, Seventh Edition. USA: Cengage Learning.
- Strobel G., Daisy B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. Microbiology and molecular Biology reviews. 67 (4): hal. 491-493.
- Tan, R.X., Zou, W. X. 2011. Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites, Nat. Prod. Rep. 18: Hal: 448-459
- Wagner, H. and Blatt, S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Germany: Springer.
- Wahyono, D. dan Nurlaila. 2001. Studi Bioekivalensi Kapsul Ampisilina (Generik) Pada Kelinci. Majalah Farmasi Indonesia. 12 (4). Hal. 198-204.
- Watanabe, T. 2002. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, Second Edition*. Boca Raton: CRC Press



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Hasil Pengukuran GC-MS



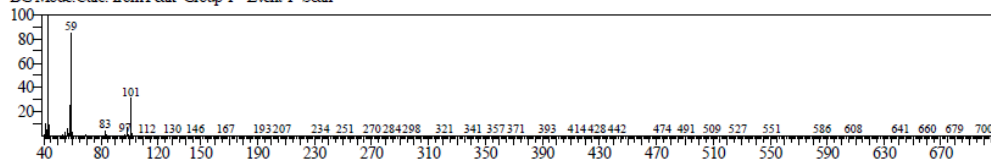
Peak#	R.Time	Area	Area%	A/H	Name
1	5.207	685801	1.35	2.18	2-PENTANONE, 4-HYDROXY-4-METHYL-
2	5.530	6627662	13.09	2.07	Ethylbenzene
3	5.685	22657390	44.76	2.84	o-Xylene
4	6.064	9005382	17.79	2.00	BENZENE, 1,2-DIMETHYL-
5	29.924	6420081	12.68	3.44	BIS(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE
6	38.077	5222402	10.32	13.97	Betulin
		50618718	100.00		



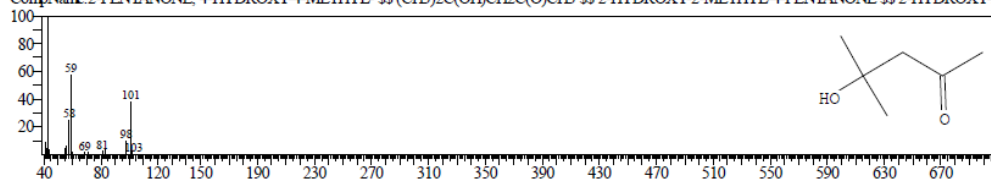
Library

<< Target >>

Line# 1 R Time: 5.208(Scan# 26) MassPeaks: 331  
RawMode: Averaged 5.200-5.217(25-27) BasePeak: 43.05(93157)  
BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan

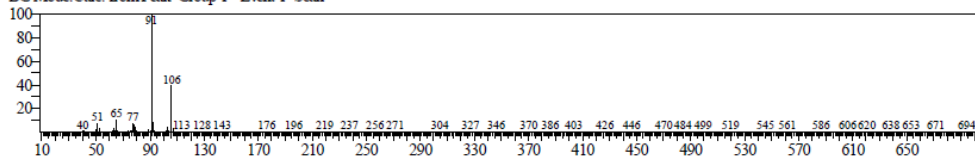


Hit# 1 Entry: 14649 Library: WILEY8.LIB  
SI: 94 Formula: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub> CAS: 123-42-2 MolWeight: 116 RefIndex: 0  
CompName: 2-PENTANONE, 4-HYDROXY-4-METHYL- (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C(OH)CH<sub>2</sub>C(O)CH<sub>3</sub> 2-HYDROXY-2-METHYL-4-PENTANONE 2-HYDROXY-2

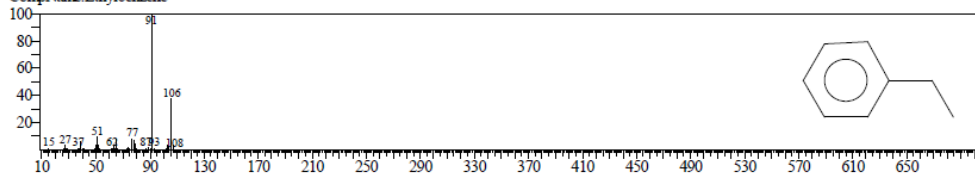


<< Target >>

Line# 2 R Time: 5.533(Scan# 65) MassPeaks: 279  
RawMode: Averaged 5.525-5.542(64-66) BasePeak: 91.15(1275378)  
BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan

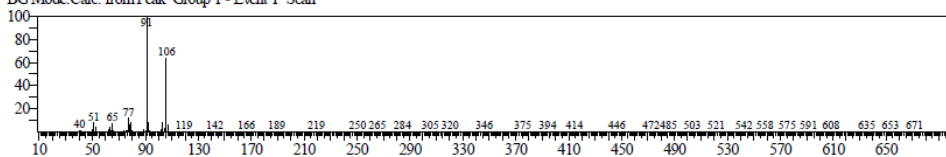


Hit# 1 Entry: 2340 Library: NIST7.LIB  
SI: 98 Formula: C<sub>8</sub>H<sub>10</sub> CAS: 100-41-4 MolWeight: 106 RefIndex: 0  
CompName: Ethylbenzene

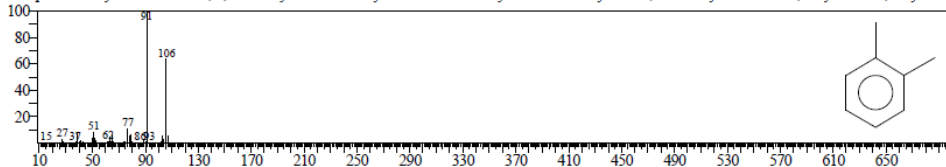


<< Target >>

Line# 3 R Time: 5.683(Scan# 83) MassPeaks: 360  
RawMode: Averaged 5.675-5.692(82-84) BasePeak: 91.15(2624694)  
BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



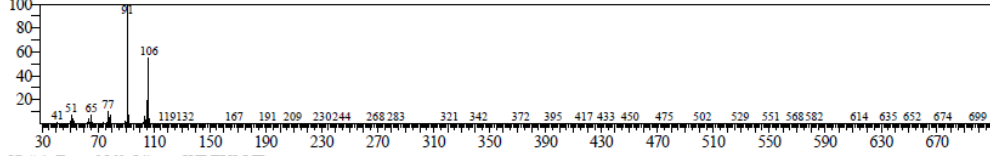
Hit# 1 Entry: 2636 Library: NIST147.LIB  
SI: 98 Formula: C<sub>8</sub>H<sub>10</sub> CAS: 95-47-6 MolWeight: 106 RefIndex: 0  
CompName: o-Xylene 1,2-dimethyl- Benzene, 1,2-dimethyl- o-Dimethylbenzene o-Methyltoluene o-Xylo 1,2-Dimethylbenzene 1,2-Xylene 3,4-Xylene



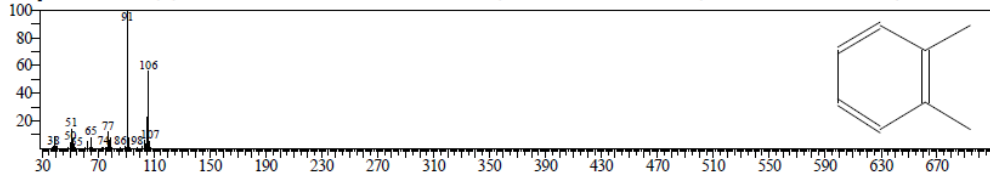
Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)



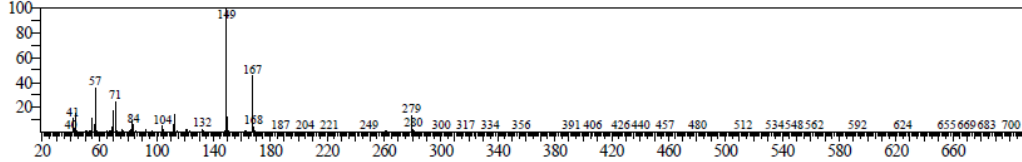
<<Target>>  
 Line#:4 R Time:6.067(Scan#:129) MassPeaks:323  
 RawMode:Averaged 6.058-6.075(128-130) BasePeak:91.15(1503894)  
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



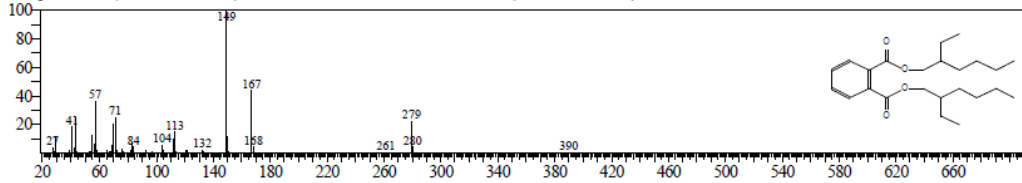
Hit#:1 Entry:9562 Library:WILEY8.LIB  
 SE:98 Formula:C8H10 CAS:95-47-6 MolWeight:106 RetIndex:0  
 CompName:BENZENE, 1,2-DIMETHYL- \$\$ O-XYLENE \$\$ O-XYLENE \$\$ 1,2-DIMETHYL-BENZENE \$\$ 1,2-DIMETHYL



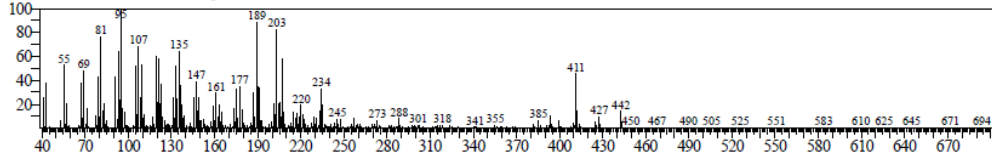
<<Target>>  
 Line#:5 R Time:29.925(Scan#:2992) MassPeaks:445  
 RawMode:Averaged 29.917-29.933(2991-2993) BasePeak:149.15(466149)  
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



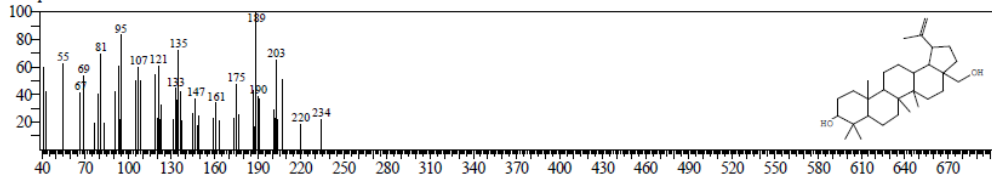
Hit#:1 Entry:328422 Library:WILEY8.LIB  
 SE:97 Formula:C24H38O4 CAS:0-00-0 MolWeight:390 RetIndex:0  
 CompName:BIS(2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE \$\$ PHTHALSAEURE, BIS(2-ETHYLHEXYL)ESTER



<<Target>>  
 Line#:6 R Time:38.075(Scan#:3970) MassPeaks:484  
 RawMode:Averaged 38.067-38.083(3969-3971) BasePeak:95.15(13001)  
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan

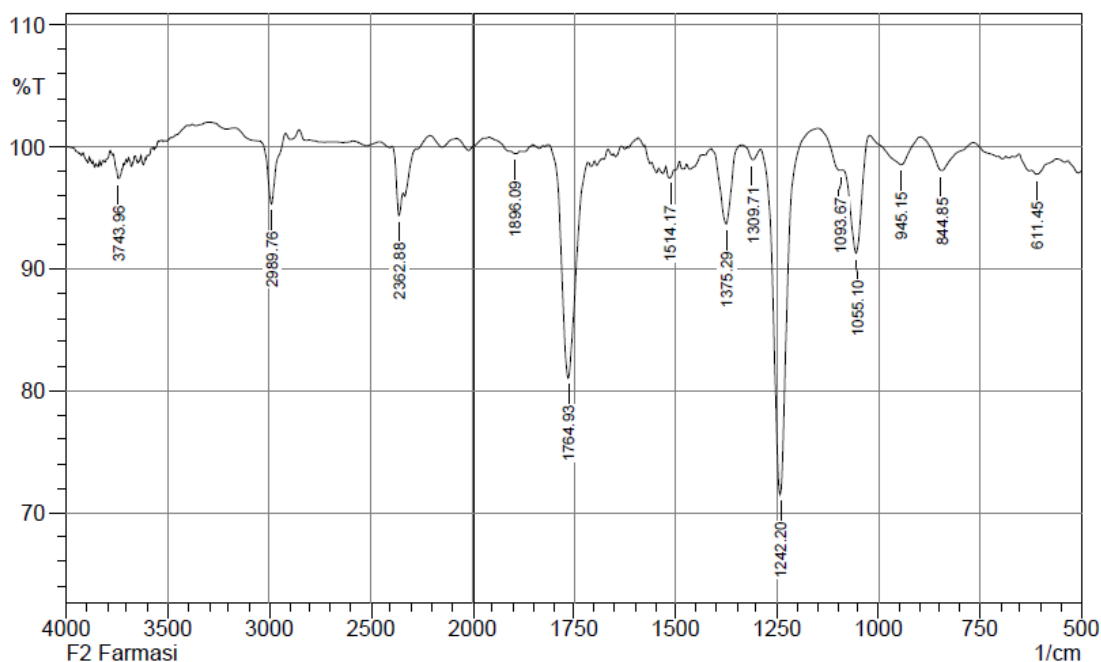


Hit#:1 Entry:27087 Library:NIST27.LIB  
 SE:92 Formula:C30H50O2 CAS:473-98-3 MolWeight:442 RetIndex:0  
 CompName:Betulin



## Lampiran 2. Hasil Pengukuran IR Spektroskopi

SHIMADZU



	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	611.45	97.746	0.493	623.03	559.38	0.457	0.049
2	844.85	98.049	2.578	896.93	765.77	0.298	0.627
3	945.15	98.537	2.322	1022.31	896.93	0.165	0.638
4	1055.1	91.286	8.226	1087.89	1022.31	1.217	1.075
5	1093.67	98.071	0.342	1149.61	1087.89	0.052	-0.005
6	1242.2	71.482	28.896	1290.42	1149.61	4.61	5.003
7	1309.71	98.943	0.996	1336.71	1290.42	0.092	0.086
8	1375.29	93.678	6.325	1411.94	1336.71	0.831	0.833
9	1514.17	97.45	0.8	1523.82	1504.53	0.193	0.045
10	1764.93	81.029	18.431	1813.15	1716.7	3.487	3.259
11	1896.09	99.437	0.214	1905.73	1884.52	0.045	0.013
12	2362.88	94.365	3.346	2395.67	2341.66	0.76	0.311
13	2989.76	95.305	5.474	3049.56	2920.32	0.7	1.148
14	3743.96	97.412	0.169	3767.1	3742.03	0.191	0.015



Optimized using  
trial version  
[www.balesio.com](http://www.balesio.com)

### Lampiran 3. Komposisi Medium

No	Medium	Komposisi
1	<i>Nutrien Agar (NA)</i>	Pepton 5 g
		Ekstrak daging 15 g
		Agar 15 g
		Air suling ad 1000 ml
		pH 7.0 ± 0.2
2	<i>Potato Dextrose Agar (PDA)</i>	Kentang 200 g
		Dextrose 20 g
		Agar 15 g
		Air suling ad 1000 ml
		pH 5.6 ± 0.1
3	<i>Potato Dextrose Broth (PDB)</i>	Kentang 200-250 g
		Destrose 20 g
		Air suling ad 1000 ml



#### Lampiran 4. Skema Kerja

