



**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS  
ANTIBAKTERI EKSTRAK ETIL ASETAT HASIL  
FERMENTASI FUNGI ENDOFIT DAUN KEPUNDUNG  
(*Baccaurea racemosa* (Reinw.) Muell. Arg.)**

**SKRIPSI**

Oleh :

**M. Febrian Bachtiar  
NIM 162210101096**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**



**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS  
ANTIBAKTERI EKSTRAK ETIL ASETAT HASIL  
FERMENTASI FUNGI ENDOFIT DAUN KEPUNDUNG  
(*Baccaurea racemosa* (Reinw.) Muell. Arg.)**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan pendidikan di Fakultas Farmasi dan  
mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh :

**M. Febrion Bachtiar**  
**NIM 162210101096**

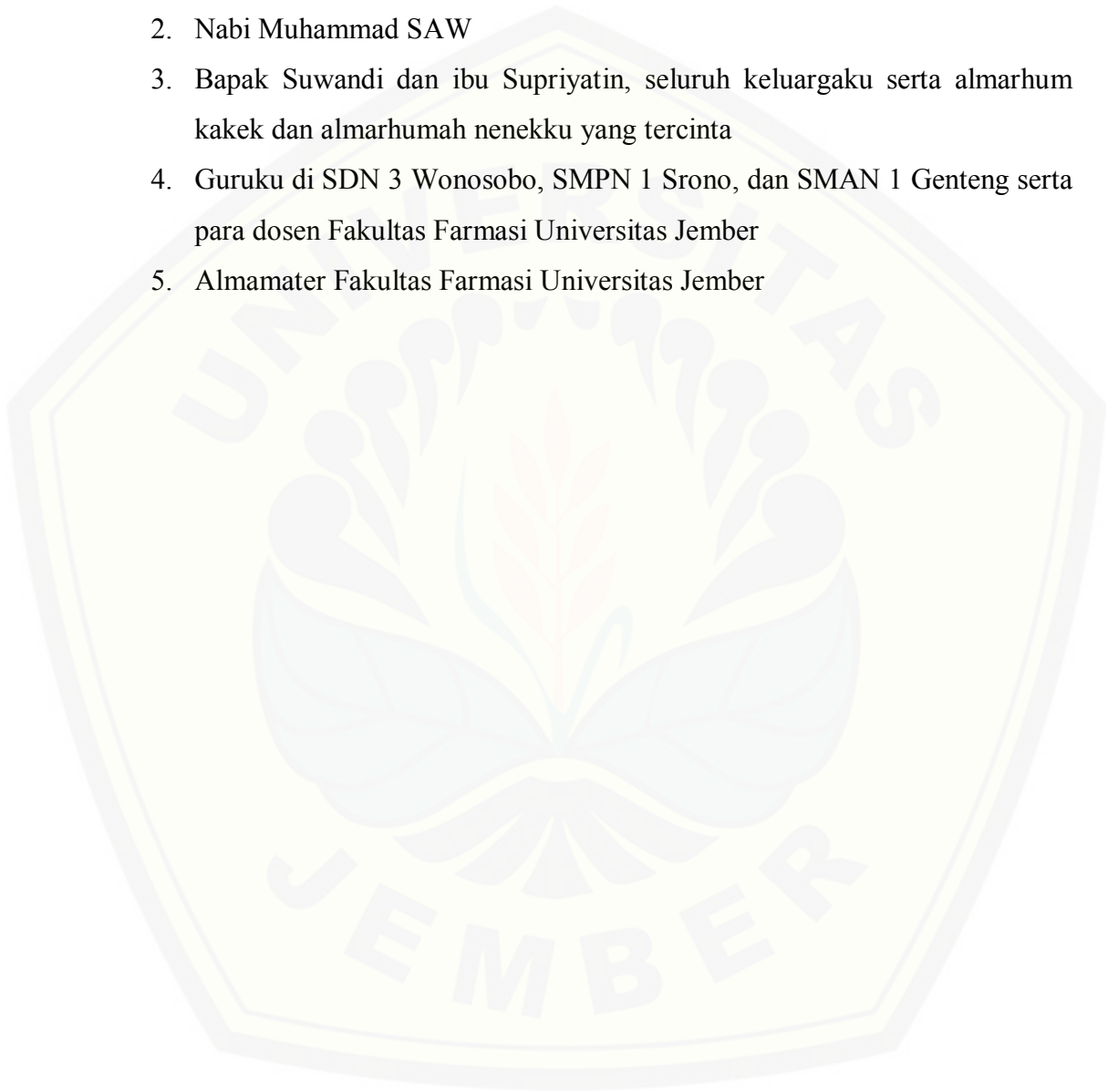
**FAKULTAS FARMASI**  
**UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan kepada

1. Allah SWT
2. Nabi Muhammad SAW
3. Bapak Suwandi dan ibu Supriyatin, seluruh keluargaku serta almarhum kakek dan almarhumah nenekku yang tercinta
4. Guruku di SDN 3 Wonosobo, SMPN 1 Srono, dan SMAN 1 Genteng serta para dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember



**MOTO**

“Yakinlah, ada sesuatu yang menantimu setelah banyak kesabaran yang kau jalani, yang akan membuatmu terpana hingga kau lupa betapa pedihnya rasa sakit”

~Sayyidina Ali bin Abi Tholib~



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : M. Febrian Bachtiar

NIM : 162210101096

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit Daun Kepundung (*Baccaurea racemosa* Reinw. (Muell.) Arg.)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 20 Januari 2020

M. Febrian Bachtiar  
NIM 162210101096

**SKRIPSI**

**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS  
ANTIBAKTERI EKSTRAK ETIL ASETAT HASIL  
FERMENTASI FUNGI ENDOFIT DAUN KEPUNDUNG  
(*Baccaurea racemosa* (Reinw.) Muell. Arg.)**

Oleh :

**M. Febrian Bachtiar**  
**NIM 162210101096**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc., Apt

Dosen Pembimbing Anggota : Ari Satia Nugraha, S.F., GDipSc.,M.Sc-  
Res.,Ph.D.,Apt.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit Daun Kepundung (*Baccaurea racemosa* (Reinw.) Muell. Arg.) telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Senin, 20 Januari 2020

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

**Tim Pembimbing**

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc., Apt  
NIP 198504282009121004

Ari Satia Nugraha, S.F., GDipSc.,M.Sc-Res.,Ph.D.,Apt.  
NIP 197807212003121001

**Tim Penguji**

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,

Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt.  
NIP 198304282008122004

Nia Kristiningrum, S.Farm., M.Farm., Apt.  
NIP 198204062006042001

**Mengesahkan**

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm., Apt.  
NIP 197604142002122001



## RINGKASAN

**Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit Daun Kepundung (*Baccaurea racemosa* (Reinw.).Muell.Arg); M.Febrian Bachtiar,162210101096; 2020; 137 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.**

Penyakit infeksi bakteri merupakan permasalahan kesehatan serius yang melanda masyarakat global. Penyakit ini menjadi salah satu penyebab terbesar kasus kematian masyarakat di seluruh dunia. Kondisi ini diperparah dengan meningkatnya kasus resistensi antibiotik oleh bakteri patogen sehingga pengobatan pasien tidak berjalan optimal dan efektif. Untuk mengatasi hal ini maka diperlukan pencarian senyawa antibiotik baru yang efektif untuk melawan bakteri patogen tersebut. Sumber utama pencarian senyawa antibiotik adalah mikroorganisme baik itu fungi maupun bakteri.

Salah satu mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan senyawa metabolit sekunder dengan aktivitas antibakteri adalah fungi endofit. Mikroorganisme ini hidup di dalam jaringan tumbuhan yang sehat tanpa menyebabkan timbulnya penyakit pada tumbuhan inangnya tersebut. Sebaliknya fungi endofit ini melindungi tumbuhan inangnya dari infeksi fitopatogen. Berdasarkan hal tersebut maka pada penelitian ini dilakukan skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepundung (*Baccaurea racemosa* (Reinw.) Muell.Arg) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Tumbuhan kepundung dipilih sebagai tumbuhan inang sumber isolasi fungi endofit karena berdasarkan penelitian sebelumnya ekstrak metanol daun kepundung ini memiliki aktivitas antibakteri terhadap kedua bakteri uji sehingga diduga fungi endofit yang terkandung di dalamnya juga memiliki aktivitas antibakteri.

Pada penelitian ini ada tiga fungi endofit yang berhasil diisolasi dari daun kepundung dan diberi kode DK1, DK2, dan DK3. Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri, semua ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepundung



pada konsentrasi 100 µg/ml memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan hampir semuanya memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* kecuali ekstrak uji dari fungi endofit DK2. Ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK2 dan DK1 pada konsentrasi 100 µg/ml memiliki aktivitas antibakteri yang paling besar secara berturut-turut terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan persen penghambatan sebesar  $34,55 \pm 1,61$  % dan  $14,81 \pm 2,69$  % ( $p < 0,05$ ). Golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak etil asetat hasil fermentasi ketiga fungi endofit daun kepundung tersebut adalah fenolat, flavonoid, alkaloid, dan terpenoid. Senyawa flavonoid, alkaloid, dan terpenoid tersebut diduga berperan menimbulkan aktivitas antibakteri pada ekstrak uji dari ketiga fungi berdasarkan hasil uji KLT bioautografi. Untuk memastikan potensi aktivitas golongan senyawa tersebut maka ke depan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut berupa isolasi dan uji bioaktivitas senyawa tersebut.

## PRAKATA

Pertama-tama, ucapan puji syukur “alhamdulillahirabbil‘alamin” selalu penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala nikmat dan kasih sayangNya sehingga penulis bisa menyelesaikan skripsi dengan judul “Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit Daun Kepundung (*Baccaurea racemosa* (Reinw.) Muell. Arg.)” Penulis menyusun skripsi ini untuk mendapatkan gelar Sarjana Farmasi (S.Farm) dari jenjang Pendidikan Strata Satu (S1) di Fakultas Farmasi Universitas Jember. Selanjutnya penulis ingin mengucapkan terimakasih karena dalam proses penyusunan skripsi ini penulis banyak mendapatkan bantuan dari berbagai pihak sebagai berikut:

1. Allah SWT Yang Maha Rahman dan Rahim yang selalu menyertai penulis baik dalam keadaan suka maupun duka (Allahu Akbar);
2. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm.,Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
3. Bapak Dwi Koko Pratoko, S. Farm, M.Sc.,Apt. selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah banyak membantu serta memberikan motivasi, semangat, dan arahan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi;
4. Bapak Ari Satia Nugraha, S.F., GDipSc., M.Sc-Res, Ph.D, Apt. selaku Dosen Pembimbing Anggota dan Dosen Pembimbing Akademik yang telah banyak membantu serta memberikan motivasi, semangat, dan arahan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi dan menempuh S1 di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
5. Ibu Afifah Machlaurin., S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik penulis mulai semester satu hingga tiga yang telah memberikan semangat dan motivasi kepada penulis dalam menempuh S1 di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Ibu Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt. dan Ibu Nia Kristiningrum, S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji I dan Dosen Penguji II yang telah memberikan banyak bantuan kepada penulis berupa saran, kritik, dan masukan sehingga penulis bisa menyelesaikan skripsinya;

7. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah mencurahkan waktu dan tenaga untuk mengajarkan berbagai ilmu kefarmasian kepada penulis;
8. Bu Wayan, Mbak Hany, Bu Itus, Mbak Titin, Mbak Dinik, Mbak Indri, Bu Widi, Mbak Parka yang telah banyak membantu penulis selama melakukan praktikum dan penelitian di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Jember;
9. Seluruh Karyawan Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah membantu penulis untuk mengurus berbagai urusan administrasi selama menempuh S1 dan menyelesaikan skripsi;
10. Bapak dan Ibu, mas Alfin, mas Barkah, mbak Dewi, mbak Sukma serta seluruh keluarga besar yang tercinta dan tersayang yang selalu memberikan doa, semangat dan mencurahkan seluruh kehidupannya untuk penulis agar penulis bisa menyelesaikan pendidikannya dengan baik;
11. Saudara sekontrakan Rofiq, Dana, Didit, Dimas, Dika, Adam, Ayik serta teman-teman seangkatan MORFIN 2016 yang telah memberikan semangat dan keceriaan kepada penulis ;
12. Afrian, Jihan, Zion, Ziyah, Arofa, Ferina, Kibthi, mas Ridho, Lilla, dan Chintya yang telah berjuang bersama penulis di laboratorium DUDRG;
13. Aida, Wilda, Rida, Afifah, Yenika, Mayang, Eka yang telah memberikan semangat dan motivasi kepada penulis untuk menyelesaikan S1 farmasi.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan pada naskah skripsi ini sehingga penulis sangat mengharapkan kritik dan saran agar naskah skripsi ini bisa menjadi lebih baik.

Jember, 20 Januari 2020

M. Febrian Bachtiar

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN .....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN.....	viii
PRAKATA .....	x
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Penyakit Infeksi bakteri .....	5
2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	6
2.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
2.2 Urgensi Penemuan Senyawa Antibiotik Baru yang Efektif.....	8
2.3 Potensi Fungi Endofit sebagai Sumber Pencarian Senyawa Antibiotik .....	9
2.4 Pemilihan Tumbuhan Inang yang Dijadikan sebagai Sumber Isolasi Fungi Endofit .....	18
2.5 Tinjauan Prosedur Penelusuran Metabolit Sekunder Fungi Endofit .....	23
2.5.1 Isolasi Fungi Endofit .....	23
2.5.2 Fermentasi Fungi Endofit .....	24

2.5.3 Ekstraksi Hasil Fermentasi Fungi Endofit .....	26
2.6 Tinjauan Prosedur Uji Aktivitas Antibakteri .....	27
2.7 Tinjauan Analisa Golongan Senyawa Metabolit Sekunder dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	29
<b>BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>32</b>
3.1 Jenis Penelitian.....	32
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	32
3.3 Variabel Penelitian .....	32
3.3.1 Variabel Bebas .....	32
3.3.2 Variabel Terikat .....	32
3.3.3 Variabel Terkendali.....	32
3.4 Definisi Operasional.....	33
3.5 Rancangan Penelitian .....	34
3.6 Alat dan Bahan.....	35
3.6.1 Alat.....	35
3.6.2 Bahan.....	35
3.7 Prosedur Penelitian.....	35
3.7.1 Preparasi Media.....	35
3.7.2 Prosedur Penelusuran Senyawa Metabolit Sekunder dari Fungi Endofit Daun Kepundung.....	37
3.7.3 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit Daun Kepundung dengan Metode Mikrodilusi.....	39
3.7.4 Analisa Data Hasil Penelusuran Aktivitas Antibakteri.....	42
3.7.5 Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit dari Daun Kepundung.....	43
3.7.6 Skrining KLT-Bioautografi Kontak .....	44
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>45</b>
4.1 Isolasi Fungi Endofit dari Daun Kepundung .....	45
4.1.1 Fungi Endofit DK1 .....	47
4.1.2 Fungi Endofit DK2.....	48
4.1.3 Fungi Endofit DK3.....	49
4.2 Fermentasi Fungi Endofit Daun Kepundung .....	51
4.2.1 Fermentasi Fungi Endofit DK1 .....	52

4.2.2 Fermentasi Fungi Endofit DK2 .....	54
4.2.3 Fermentasi Fungi Endofit DK3 .....	55
4.3 Ekstraksi Hasil Fermentasi Fungi Endofit Daun Kepundung .....	57
4.4 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit Daun Kepundung dengan Metode Mikrodilusi .....	58
4.5 Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit Daun Kepundung.....	62
4.5.1 Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit DK1 .....	62
4.5.2 Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit DK2 .....	68
4.5.3 Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit DK3 .....	73
4.6 Uji KLT Bioautografi Kontak Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit Daun Kepundung .....	76
4.6.1 Uji KLT Bioautografi Kontak Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit DK1 .....	76
4.6.2 Uji KLT Bioautografi Kontak Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit DK2.....	79
4.6.3 Uji KLT Bioautografi Kontak Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit DK3.....	82
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>84</b>
5.1 Kesimpulan .....	84
5.2 Saran.....	85
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>86</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>95</b>



**DAFTAR TABEL**

Tabel 2.1	Struktur dasar golongan senyawa metabolit sekunder yang sering ditemui pada fungi endofit.....	13
Tabel 4.4	Kondisi fungi endofit DK1 selama proses fermentasi .....	53
Tabel 4.5	Kondisi fungi endofit DK2 selama proses fermentasi .....	54
Tabel 4.6	Kondisi fungi endofit DK3 selama proses fermentasi .....	56
Tabel 4.7	Jumlah rendemen ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepondung.....	57
Tabel 4.8	Data hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi.....	59
Tabel 4.9	Hasil skrining fitokimia ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK1 .....	62
Tabel 4.10	Hasil skrining fitokimia ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK2 .....	68
Tabel 4.11	Hasil skrining fitokimia ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK3 .....	73
Tabel 4.12	Data hasil uji KLT bioautografi ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK1 .....	76
Tabel 4.13	Data hasil uji KLT bioautografi ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK2 .....	79
Tabel 4.14	Data hasil uji KLT bioautografi ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK3 .....	82



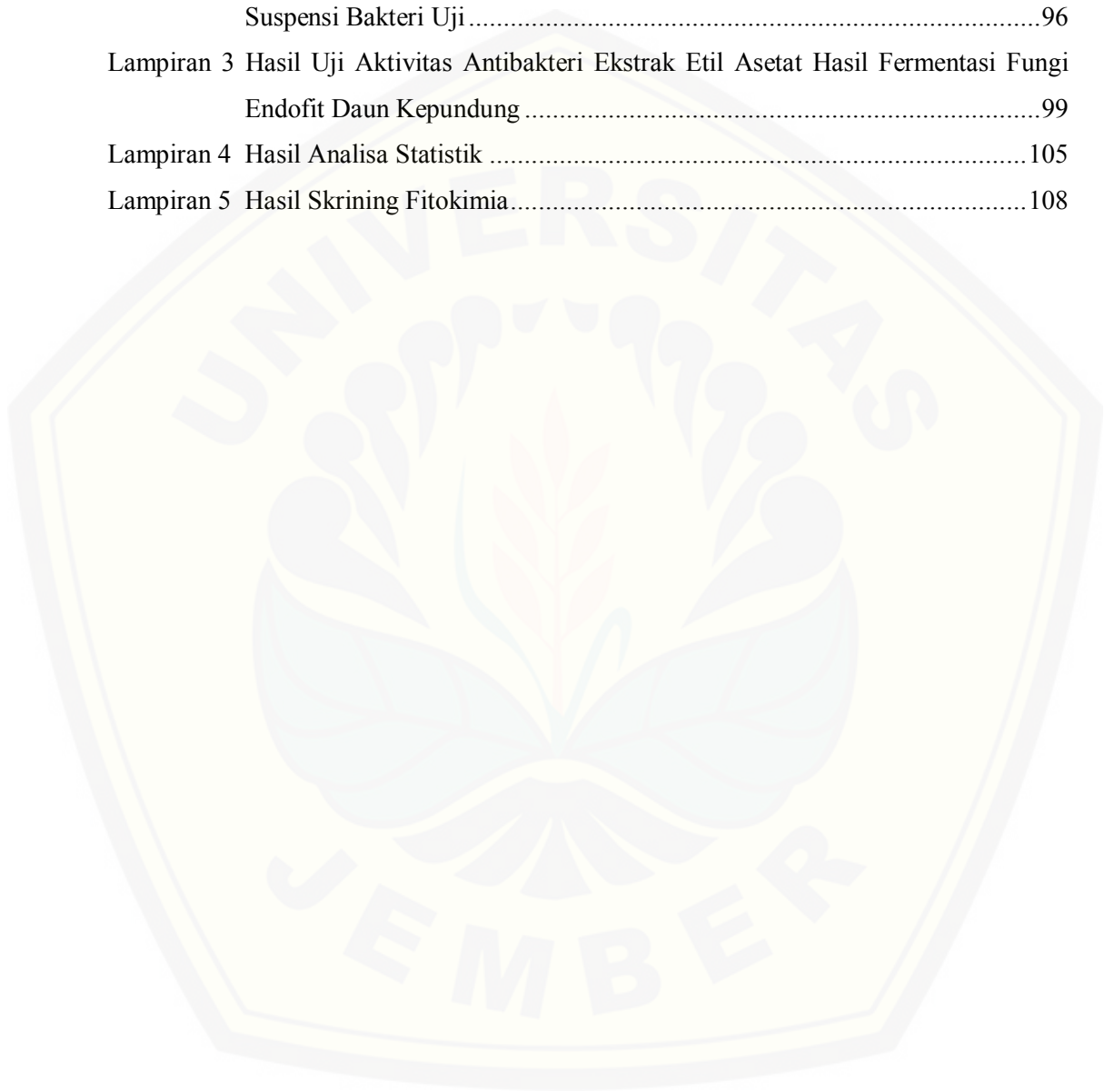
**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1	Koloni <i>Staphylococcus aureus</i> pada pengamatan mikroskopis perbesaran 1000X.....	6
Gambar 2.2	Koloni <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada pengamatan mikroskopis perbesaran 100X.....	7
Gambar 2.3	Skema interaksi antara fungi endofit dengan tumbuhan inang dan organisme fitopatogen.....	10
Gambar 2.4	Struktur badan buah pada fungi Ascomycota .....	11
Gambar 2.5	Struktur konidia pada Ascomycota .....	12
Gambar 2.6	Contoh sporangiofor (A) dan sporangium (B) pada fungi Zygomycota ....	12
Gambar 2.7	a) Struktur <i>phomopsichalasin</i> b) struktur <i>periconicin</i> A (1) dan B (2) ....	16
Gambar 2.8	A) Struktur fusartricin B) struktur fusarielin C) struktur enniatin .....	17
Gambar 2.9	Struktur oocydin A.....	19
Gambar 2.10	a) Pohon kepundung b) daun kepundung .....	21
Gambar 2.11	Kurva pertumbuhan mikroorganisme pada sistem <i>batch culture fermentation</i> .....	25
Gambar 2.12	Skema uji KLT bioautografi metode kontak ( <i>contact bioautography</i> ).....	30
Gambar 2.13	Skema uji KLT bioautografi metode langsung ( <i>direct bioautography</i> ) ....	31
Gambar 2.14	Skema uji KLT bioautografi <i>agar overlay</i> .....	31
Gambar 3.1	Alur Penelitian .....	34
Gambar 3.2	Desain microplate untuk uji antibakteri dengan metode mikrodilusi.....	41
Gambar 4.1	Fungi endofit hasil isolasi pada media <i>Rose Bengal Chloramphenicol Agar</i> , A) fungi endofit DK1, B) fungi endofit DK2, C) fungi endofit DK3 .....	46
Gambar 4.2	Dokumentasi fungi endofit DK1 pada media PDA A) umur 32 hari tampak dari atas dan B) tampak dari bawah.....	47
Gambar 4.3	Dokumentasi fungi endofit DK1 di bawah mikroskop cahaya perbesaran 100 x A) hifa tidak bersepta, B) sporangiofor, C) sporangium. ....	48
Gambar 4.4	Dokumentasi fungi endofit DK2 pada media PDA A) umur 32 hari tampak dari atas dan B) tampak dari bawah.....	48
Gambar 4.5	Dokumentasi fungi endofit DK2 di bawah mikroskop cahaya perbesaran 100 x, A) hifa bersepta, B) konidiofor, C) konidia .....	49
Gambar 4.6	Dokumentasi fungi endofit DK3 pada media PDA A) umur 32 hari tampak dari atas B) tampak dari bawah C) umur 45 hari tampak dari atas .....	49

Gambar 4.7 Dokumentasi mikroskopis fungi endofit DK3 di bawah mikroskop cahaya perbesaran 100 x A) hifa bersepta B) konidia .....	50
Gambar 4.8 Bentuk miselium fungi endofit DK1 pada media fermentasi .....	53
Gambar 4.9 Bentuk miselium fungi endofit DK2 pada media fermentasi .....	55
Gambar 4.10 Bentuk miselium fungi endofit DK3 pada media fermentasi .....	56
Gambar 4.11 Contoh struktur senyawa flavoalkaloid A) vochysine B) davallioside.....	67
Gambar 4.12 Struktur trisin (flavone dari fungi endofit) .....	78
Gambar 4.13 Contoh struktur alkaloid dari fungi endofit A) Altersetin B) <i>tenuizonic acid</i> .....	78
Gambar 4.14 Hasil uji KLT bioautografi ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi DK1 terhadap A) <i>Staphylococcus aureus</i> dan B) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	78
Gambar 4.15 Hasil uji KLT bioautografi ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi DK2 terhadap A) <i>Staphylococcus aureus</i> dan B) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	80
Gambar 4.16 Struktur A) 8 $\alpha$ -acetoxyphomadecalin C (seskuiterpen), B) diaporthen (diterpen),C) 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -dihydroxy-6 $\beta$ -acetoxy-ergosta-7,22-diene (triterpenoid) .....	82
Gambar 4.17 Hasil uji KLT bioautografi ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi DK3 terhadap A) <i>Staphylococcus aureus</i> dan B) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	83

**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1 Hasil Determinasi Daun Kepundung.....	95
Lampiran 2 Perhitungan Preparasi Media CAMHB, Ekstrak Uji, Kontrol Positif, dan Suspensi Bakteri Uji.....	96
Lampiran 3 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit Daun Kepundung.....	99
Lampiran 4 Hasil Analisa Statistik.....	105
Lampiran 5 Hasil Skrining Fitokimia.....	108



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi bakteri masih menjadi permasalahan serius yang melanda masyarakat global. Menurut WHO, penyakit infeksi bakteri terutama penyakit infeksi saluran pernapasan bagian bawah termasuk dalam sepuluh besar penyakit yang paling banyak menyebabkan kematian masyarakat di seluruh dunia. Kasus kematian akibat penyakit tersebut mencapai tiga juta jiwa pada tahun 2016 (WHO, 2018). Berdasarkan hasil riskesdas tahun 2018, tingkat prevalensi penyakit infeksi saluran pernapasan bagian bawah seperti pneumonia di Indonesia mengalami peningkatan dari 1,6 % pada tahun 2013 menjadi 2% pada tahun 2018 (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018). Beberapa mikroorganisme patogen penyebab infeksi saluran pernapasan bagian bawah antara lain *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Dipiro dkk., 2017). Strain bakteri tersebut telah banyak dilaporkan resisten terhadap antibiotik yang umum diresepkan dalam terapi penyakit infeksi. Strain bakteri yang resisten tersebut menggunakan berbagai faktor resistensi yang dimilikinya untuk menghambat mekanisme kerja suatu antibiotik sehingga antibiotik tersebut tidak lagi efektif untuk membunuh atau menghambat pertumbuhannya (Poole dkk., 2011; Stefani dkk., 2012). Antibiotik tersebut harus diganti dengan antibiotik lain yang masih efektif untuk melawan bakteri itu agar tujuan terapi pada pasien tercapai, tetapi pilihan jenis antibiotik yang masih efektif tersebut semakin sedikit. Kondisi ini tentu sangat mengkhawatirkan karena kasus resistensi antibiotik oleh bakteri terus meningkat begitu juga jumlah dan strain bakteri yang resisten tersebut (Walsh, 2003). Di lain sisi, senyawa antibiotik baru yang poten dan memenuhi berbagai kriteria klinis terutama efikasi dan keamanan di abad ke-21 ini sangat sulit ditemukan (Brown dan Wright, 2016). Berdasarkan hal tersebut, upaya pencarian antibiotik baru yang efektif dan aman harus menjadi fokus utama para peneliti di seluruh dunia saat ini.

Sebagian besar antibiotik yang digunakan di dunia klinis pada saat ini berasal dari bahan alam maupun turunannya (semisintesis) seperti ceftazidim, meropenem, eritromisin, rifabutin, daptomisin, netilmisin sulfat, dan mupirosin.

Menurut data yang dirilis oleh Newman dkk pada tahun 2007, dari total 109 jenis antibiotik yang ada, sebanyak 10 antibiotik merupakan produk metabolit mikroorganisme, 63 antibiotik merupakan turunan senyawa metabolit sekunder mikroorganisme yang disintesis secara parsial (semisintesis) dan sisanya berasal dari proses sintesis total (Newman dan Cragg, 2007). Sebagian besar antibiotik tersebut dihasilkan oleh mikroorganisme baik fungi maupun bakteri. Sekitar 75% antibiotik berasal dari senyawa metabolit sekunder bakteri *filamentous* (Actinomycetes) dan sisanya berasal dari senyawa metabolit bakteri *non filamentous* serta fungi (Cragg dan Newman, 2014; Demain, 2014). Selain Actinomycetes, spesies fungi merupakan salah satu jenis mikroorganisme yang cukup berperan penting dalam sejarah penemuan senyawa antibiotik baru (Demain, 2014). Beberapa spesies fungi merupakan penghasil antibiotik yang terkenal dan banyak sekali digunakan pada saat ini seperti *Penicillium notatum* yang menghasilkan antibiotik penisilin (ACS, 2019) dan *Cephalosporium acremonium* yang menghasilkan antibiotik sefalosporin (Abraham, 1987). Dengan demikian, mikroorganisme golongan fungi merupakan salah satu sumber potensial yang bisa diteliti untuk mencari kandidat antibiotik yang baru.

Salah satu jenis fungi yang berpotensi menghasilkan senyawa metabolit sekunder dengan aktivitas antibakteri adalah fungi endofit. Fungi endofit merupakan jenis fungi yang hidup di dalam jaringan tumbuhan tanpa menyebabkan penyakit pada tumbuhan inangnya tersebut. Ini terjadi karena fungi endofit melakukan simbiosis mutualisme dengan tumbuhan inangnya. Tumbuhan inang menyediakan sumber nutrisi bagi kelangsungan hidup fungi endofit sedangkan fungi endofit menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang melindungi tumbuhan inang dari infeksi fitopatogen (Nisa dkk., 2015). Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh fungi endofit ini bervariasi dan seringkali memiliki struktur kimia yang unik. Senyawa metabolit sekunder fungi endofit ini berasal dari berbagai jalur biosintesis serta terdiri dari kelompok senyawa yang beragam seperti terpenoid, steroid, alkaloid, fenilpropanoid, poliketida, dan peptida (Schulz dkk., 2002; Mousa dan Raizada, 2013). Dengan tingkat variasi metabolit sekunder yang



tinggi ini, kemungkinan ditemukan senyawa metabolit aktif yang baru dari fungi endofit cukup besar.

Karakteristik morfologi serta jenis senyawa metabolit yang dihasilkan oleh fungi endofit sangat dipengaruhi oleh kondisi fisiologis dan lingkungan tempat hidup tumbuhan inang sehingga tumbuhan inang yang akan dipilih sebagai sumber fungi endofit harus dipertimbangkan terlebih dahulu. Hal ini bertujuan agar kemungkinan ditemukannya fungi endofit yang memiliki aktivitas antibakteri dari tumbuhan tersebut semakin besar. Tumbuhan yang akan dijadikan sebagai sumber fungi endofit bisa dipilih dari tumbuhan yang dijadikan sebagai obat tradisional secara turun-temurun atau yang hidup di ekosistem dengan tingkat keberagaman spesies yang tinggi (Strobel dan Daisy, 2003). Kriteria tumbuhan inang dengan aktivitas biologis yang potensial tersebut bisa ditemukan di negara Indonesia yang memiliki tingkat keanekaragaman hayati yang tinggi serta tradisi pengobatan tradisional yang masih arif (Nugraha dan Keller, 2011).

Tumbuhan kepundung (*Baccaurea racemosa* (Reinw.) Muell. Arg.) merupakan salah satu tumbuhan khas Melayu yang banyak ditemukan di wilayah Indonesia (Lim, 2012). *Baccaurea racemosa* merupakan salah satu anggota genus *Baccaurea* yang berpotensi memiliki aktivitas antibakteri. Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak metanol daun kepundung mulai menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 2,5 mg/ml dengan nilai zona hambat berturut-turut sebesar  $6,39 \pm 0,25$  mm dan  $7,36 \pm 0,10$  mm (Jumahwi, 2019). Dengan data ini, apabila dihubungkan dengan karakteristik simbiosis mutualisme antara fungi endofit dengan tumbuhan inangnya maka dapat ditarik sebuah hipotesis bahwa fungi endofit yang tinggal di dalam daun kepundung mungkin juga memiliki aktivitas antibakteri. Sejauh ini berdasarkan hasil penelusuran pustaka masih belum ditemukan penelitian tentang uji aktivitas antibakteri fungi endofit daun kepundung sehingga pada penelitian ini dilakukan isolasi fungi endofit dari daun kepundung dan uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit tersebut terhadap *Staphylococcus aureus* serta *Pseudomonas aeruginosa*. Potensi aktivitas antibakteri dari ekstrak tersebut diukur berdasarkan nilai % penghambatan terhadap masing-masing bakteri

uji. Diharapkan dari penelitian ini dapat ditemukan fungi endofit dengan aktivitas antibakteri yang potensial dari daun kepundung.

### **1.2 Rumusan Masalah**

1. Berapa nilai % penghambatan ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepundung terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* ?
2. Golongan senyawa metabolit sekunder apa saja yang terkandung dalam ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepundung?
3. Golongan senyawa metabolit sekunder apakah yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri fungi endofit daun kepundung?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

1. Untuk mengetahui potensi aktivitas antibakteri dari ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepundung berdasarkan nilai % penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*
2. Untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepundung
3. Untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepundung yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri

### **1.4 Manfaat Penelitian**

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang aktivitas antibakteri fungi endofit daun kepundung
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar pencarian senyawa kandidat antibiotik baru yang efektif untuk mengobati penyakit infeksi



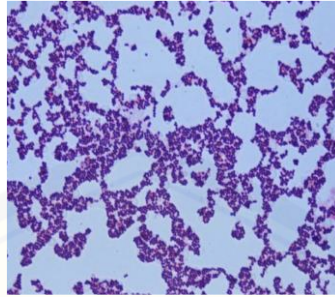
## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Penyakit Infeksi bakteri

Penyakit infeksi bakteri masih menjadi permasalahan kesehatan serius yang melanda masyarakat global. Di Indonesia, menurut hasil Riskesdas tahun 2018, tingkat prevalensi sejumlah penyakit infeksi bakteri seperti infeksi saluran pernapasan bagian atas, pneumonia, dan diare terus mengalami peningkatan. Tingkat prevalensi infeksi saluran pernapasan bagian atas meningkat 9,4% dari tahun 2013. Tingkat prevalensi pneumonia naik 0,4% dari tahun 2013. Tingkat prevalensi diare meningkat 1% dari tahun 2013 (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018). Sejalan dengan hal itu, menurut laporan WHO pada tahun 2018, penyakit infeksi bakteri terutama penyakit infeksi saluran pernapasan bagian bawah termasuk dalam sepuluh besar penyakit yang paling banyak menyebabkan kematian masyarakat di seluruh dunia (WHO, 2018).

Beberapa bakteri patogen penyebab infeksi saluran pernapasan bagian bawah antara lain *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Kedua bakteri tersebut termasuk dalam 12 bakteri patogen di WHO *priority pathogen list* yang menjadi target utama pencarian antibiotik baru. WHO membagi daftar patogen tersebut menjadi tiga kategori berdasarkan tingkat urgensi pencarian antibiotik baru terkait dengan tingginya kasus infeksi dan resistensi oleh bakteri tersebut. Ketiga kategori tersebut yaitu kategori kritis, tinggi, dan sedang. *Pseudomonas aeruginosa* termasuk ke dalam bakteri kategori kritis karena berdasarkan banyak laporan klinis, bakteri ini bersifat *multidrug resistant* bahkan terhadap antibiotik golongan karbapenem yang sejauh ini diketahui efektif untuk mengatasi infeksi bakteri tersebut. Berdasarkan hal itu, antibiotik baru yang efektif untuk menangani infeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* sangat dibutuhkan saat ini. Di lain pihak, *Staphylococcus aureus* termasuk dalam kategori prioritas tinggi karena kasus infeksi dan resistensi oleh MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) terhadap antibiotik yang biasa diresepkan pada pengobatan penyakit infeksi cukup tinggi (WHO, 2017).

### 2.1.1 *Staphylococcus aureus*



Gambar 2.1 Koloni *Staphylococcus aureus* pada pengamatan mikroskopis perbesaran 1000X (Singh dkk., 2018)

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang berbentuk kokus, tidak menghasilkan spora (*non-spore forming*), serta tidak memiliki alat gerak (*non-motile*). Koloni bakteri ini umumnya berbentuk seperti buah anggur seperti yang terlihat pada Gambar 2.1 dan berwarna keemasan atau kuning serta dapat membentuk biofilm pada media pertumbuhan. *Staphylococcus aureus* bersifat fakultatif anaerob artinya oksigen bukanlah faktor penentu kehidupan bakteri ini karena bakteri ini dapat melakukan respirasi aerob maupun anaerob. Jika ada suplai oksigen maka bakteri ini dapat bertahan hidup dan menggunakan oksigen tersebut untuk bernapas (respirasi aerob), tetapi jika tidak ada oksigen maka bakteri ini juga tetap dapat bertahan hidup dengan melakukan respirasi anaerob. *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh optimum pada suhu 37°C dengan pH 6-7 (Foster dan Geoghegan, 2015).

*Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri patogen yang sering menjadi agen kausatif berbagai kasus infeksi. Kasus infeksi yang sering ditimbulkan oleh *Staphylococcus aureus* antara lain bakteremia, infeksi osteoartikular (*osteomyelitis*, *native joint septic arthritis*, dan *prosthetic joint infection*), infeksi kulit (*impetigo*, *cellulitis*, *surgical site infection*, *cutaneous abscesses*, dan *purulent cellulitis*), infeksi endokarditis, infeksi pada penggunaan kateter (Tong dkk., 2015), serta infeksi saluran pernapasan (*hospital acquired bacterial pneumonia* (HABP) dan *ventilator associated bacterial pneumonia*

(VABP)) (Vincent dkk., 2009; Jones, 2010). Penanganan kasus infeksi *Staphylococcus aureus* menjadi semakin sulit karena bakteri tersebut banyak dilaporkan bersifat resisten terhadap antibiotik yang biasa diresepkan pada pengobatan penyakit infeksi yaitu antibiotik golongan beta laktam, tetrasiklin, aminoglikosida, dan fluorokuinolon (Foster, 2017). *Staphylococcus aureus* menghindari efek antibiotik tersebut dengan cara menginaktivasi antibiotik secara enzimatis (Foster, 2017), memodifikasi target aksi antibiotik (Peacock dan Paterson, 2015), menggunakan pompa efluks antibiotik (Costa dkk., 2013), dan melakukan mutasi genetik (Sanchini, 2007).

### 2.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*



Gambar 2.2 Koloni *Pseudomonas aeruginosa* pada pengamatan mikroskopis perbesaran 100X  
(Bishwabidyalay dan Nahar, 2016)

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk batang. Bakteri ini memiliki alat gerak berupa flagella yang berjumlah satu (*monoflagellated bacterium*). Bakteri ini dapat tumbuh dengan baik pada rentang suhu 25°C – 37°C (Wu dkk., 2015). Bentuk koloni *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilihat pada Gambar 2.2

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri patogen gram negatif yang menjadi penyebab infeksi komunitas maupun nosokomial. Infeksi komunitas yang sering diakibatkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* antara lain infeksi okular (keratitis), otitis externa (*chronic suppurative otitis media*), endokarditis, infeksi tulang dan jaringan lunak (*osteomyelitis*), dan *folicullitis*. Infeksi nosokomial yang

biasa disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* antara lain infeksi saluran kemih terutama pada pasien pengguna kateter, infeksi saluran pernapasan (*hospital acquired pneumonia* (HAP), *ventilator associated pneumonia*, dan *healthcare associated pneumonia* (HCAP)) serta infeksi setelah operasi (Driscoll dkk., 2007; Planet, 2018). Penanganan kasus infeksi *Pseudomonas aeruginosa* menjadi semakin komplikatif karena bakteri tersebut telah banyak dilaporkan resisten terhadap antibiotik yang biasa digunakan untuk pengobatan penyakit infeksi seperti antibiotik golongan beta laktam, karbapenem, fluorokuinolon, dan aminoglikosida. *Pseudomonas aeruginosa* menghindari efek antibiotik tersebut dengan menurunkan permeabilitas membran selnya, menggunakan pompa efluks antibiotik, menginaktivasi antibiotik tersebut secara enzimatik dengan cara memproduksi *extended spectrum beta lactamase* (ESBL), serta memodifikasi target aksi antibiotik melalui mutasi genetik (Poole dkk., 2011).

## 2.2 Urgensi Penemuan Senyawa Antibiotik Baru yang Efektif

Krisis pengobatan penyakit infeksi akibat maraknya kasus resistensi menjadi alasan utama perlunya pencarian senyawa antibiotik baru yang efektif. Permasalahan ini menjadi semakin kompleks karena pencarian antibiotik baru yang memenuhi berbagai kriteria klinis baik dari segi keamanan maupun efikasi tidaklah mudah. Kondisi ini terlihat dari penurunan jumlah antibiotik baru yang mendapat persetujuan FDA untuk dirilis di pasaran dalam dua dekade terakhir dibandingkan pada saat “*Golden Age*” ketika penemuan antibiotik baru di dunia klinis begitu masif. Laju penemuan antibiotik baru masih tetap lambat meskipun metode *combinatorial chemistry* yang menjanjikan *large screening library* telah diterapkan (Newman dan Cragg, 2007). Pencarian senyawa aktif baru yang langsung dari bahan alam masih menjadi pilihan utama. Hal ini mengingat sebagian besar senyawa antibiotik di pasaran klinis merupakan produk metabolit mikroorganisme (Butler dan Buss, 2006; Singh dan Barrett, 2006). Menurut data yang dirilis oleh Newman dkk pada tahun 2007, dari total 109 antibiotik sebanyak 10 antibiotik merupakan produk metabolit mikroorganisme, 63 antibiotik merupakan turunan



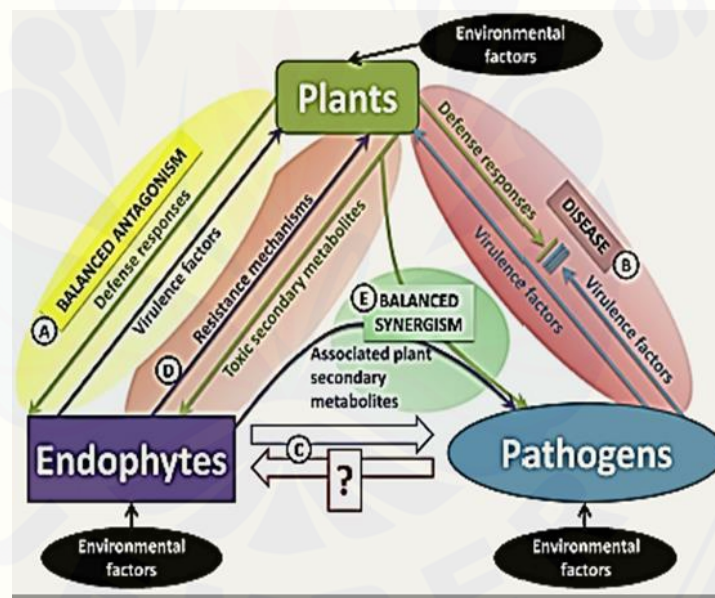
senyawa metabolit sekunder mikroorganisme yang disintesis secara parsial dan sisanya berasal dari proses sintesis total (Newman dan Cragg, 2007).

Sekitar 75% antibiotik berasal dari senyawa metabolit sekunder bakteri *filamentous* (Actinomycetes) dan sisanya berasal dari senyawa metabolit bakteri non *filamentous* serta fungi (Demain, 2014). Fakta itu menegaskan bahwa Actinomycetes masih menjadi tumpuan utama dalam pencarian senyawa antibiotik baru, tetapi pencarian antibiotik baru dari Actinomycetes menjadi tantangan yang cukup berarti bagi para peneliti. Hal ini mengingat hanya 1% strain bakteri ini yang bisa ditumbuhkan pada kondisi *in vitro* di laboratorium sedangkan 99% sisanya hanya bisa hidup di alam liar. Melihat kondisi tersebut, eksplorasi mikroorganisme dari habitat baru yang tidak biasa seperti *marine* dan *endosymbiotic environment* berpotensi untuk dijadikan sebagai upaya alternatif pencarian senyawa antibiotik baru (Wohlleben dkk., 2016).

### **2.3 Potensi Fungi Endofit sebagai Sumber Pencarian Senyawa Antibiotik**

Fungi endofit merupakan mikroorganisme yang hidup di dalam jaringan tubuh tumbuhan yang sehat tanpa menyebabkan efek negatif terhadap tumbuhan inangnya tersebut. Fungi endofit ini bisa ditemukan hampir di semua tumbuhan mulai dari tumbuhan tingkat rendah seperti paku dan lumut hingga tumbuhan tingkat tinggi dari kawasan tundra arktik hingga kawasan tropis (Nisa dkk., 2015). Fungi endofit ini dapat tumbuh subur di semua jaringan tumbuhan karena fungi endofit tersebut mampu melindungi dirinya dari mekanisme pertahanan tubuh tumbuhan inang melalui faktor-faktor virulensinya sehingga terjadi “*balanced antagonism*” atau keseimbangan interaksi antagonis antara keduanya seperti yang terlihat pada Gambar 2.3. Keseimbangan interaksi tersebut merupakan hal yang vital dalam hubungan simbiosis antara fungi endofit dengan inangnya, apabila tidak terjadi keseimbangan interaksi antara keduanya maka akan ada salah satu pihak yang dirugikan. Fungi endofit yang tidak mampu mengatasi mekanisme pertahanan tubuh tumbuhan inang maka fungi endofit tersebut akan mati. Di lain pihak, jika faktor virulensi fungi endofit tersebut lebih dominan dibandingkan mekanisme pertahanan tubuh tumbuhan inang maka fungi tersebut akan lebih leluasa

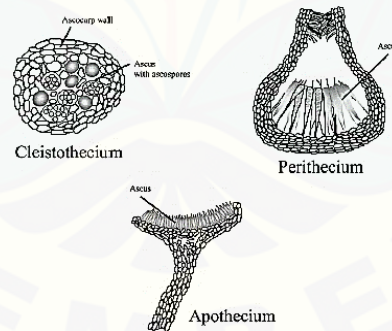
menimbulkan penyakit pada tumbuhan inang. Keseimbangan interaksi ini terjadi pada fungi endofit di dalam tumbuhan *Camptotheca acuminata*. Tumbuhan tersebut diketahui menghasilkan senyawa sitotoksik yaitu camptothecin yang menghambat kerja topoisomerasi 1 pada DNA untuk membunuh mikroorganisme fitopatogen. Fungi endofit yang terdapat di dalam tumbuhan tersebut melindungi dirinya dari efek sitotoksik camptothecin dengan cara memodifikasi residu asam amino pada sisi pengikatan camptothecin di topoisomerase 1-DNA yang dimilikinya (Kusari dkk., 2011). Selain “*balanced antagonism*”, ketika ada infeksi fitopatogen maka terjadi “*balanced synergism*” atau hubungan yang sinergis antara fungi endofit dengan tumbuhan inangnya dalam menghasilkan metabolit sekunder untuk melawan fitopatogen tersebut (Kusari dkk., 2012)



Gambar 2.3 Skema interaksi antara fungi endofit dengan tumbuhan inang dan organisme fitopatogen (Kusari dkk., 2012)

Fungi endofit yang mendiami jaringan tubuh tumbuhan sering ditemukan dalam bentuk kapang. Fungi endofit tersebut ada yang termasuk dalam divisi Zygomycota, Ascomycota, dan Basidiomycota (Sun dan Guo, 2012). Umumnya sebagian besar fungi endofit yang telah ditemukan termasuk dalam divisi Ascomycota (Arnold dan Lutzoni, 2007). Beberapa contoh genus fungi endofit yang termasuk dalam divisi ini antara lain *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Phoma*

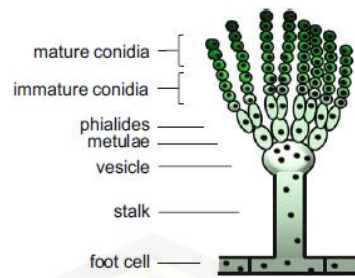
sp.(González-Teuber dkk., 2017), *Chaetomium* sp. (Wu dkk., 2019) dan *Colletotrichum* sp. (Gonzaga dkk., 2015). Struktur tubuh fungi Ascomycota ini bisa dalam bentuk uniseluler atau multiseluler. Tubuh fungi multiseluler berupa miselium yang umumnya terlihat secara kasat mata. Miselium ini tersusun dari hifa. Fungi Ascomycota multiseluler memiliki badan buah yang disebut askokarp seperti yang terlihat pada Gambar 2.4. Secara umum struktur askokarp ada tiga macam yaitu cleistothecium, perithecium, dan apothecium. Badan buah ini digunakan sebagai wadah untuk menampung askospora yaitu spora yang digunakan oleh fungi Ascomycota untuk melakukan reproduksi seksual. Askospora terkandung dalam askus yang terdapat pada badan buah. Jumlah askospora pada askus bermacam-macam tergantung masing-masing spesies fungi. Pada badan buah yang berbentuk cleistothecium, askus berada dalam keadaan tertutup di dalam badan buah. Pada badan buah yang berbentuk perithecium, askus dilingkupi oleh badan buah, tetapi masih tersedia jalan keluar berupa pori atau ostiole untuk askospora ketika sudah waktunya terlepas. Pada badan buah apothecium, askus berada diluar atau tidak dilingkupi oleh badan buah, tetapi hanya menempel pada permukaan badan buah (Osiewacz, 2002).



Gambar 2.4 Struktur badan buah pada fungi Ascomycota  
(Osiewacz, 2002)

Selain melakukan reproduksi seksual, fungi divisi Ascomycota juga bisa melakukan reproduksi aseksual dengan konidia. Struktur konidia yang dimiliki fungi Ascomycota dapat dilihat pada Gambar 2.5 di bawah ini.

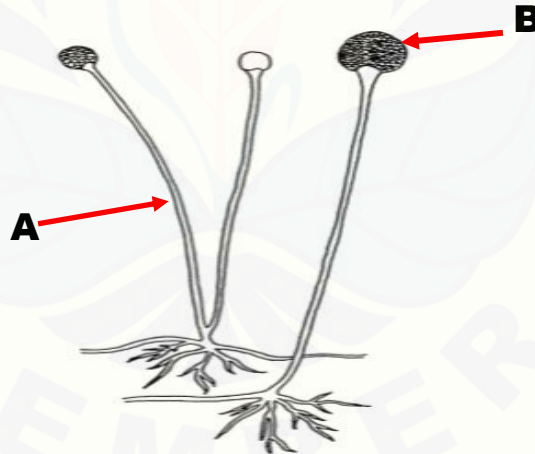




Gambar 2.5 Struktur konidia pada Ascomycota

(Hee-Soo Park dan Yu, 2016)

Selain divisi Ascomycota, fungi endofit juga ada yang termasuk dalam divisi Zygomycota. Fungi yang termasuk dalam divisi ini memiliki hifa yang tidak bersekat. Fungi Zygomycota bereproduksi secara aseksual dengan sporangiospora yang terletak di dalam sporangium seperti yang terlihat pada Gambar 2.6 (Deacon, 2006). Salah satu fungi endofit yang diketahui termasuk dalam divisi Zygomycota antara lain *Umbelopsis sp.* dari tumbuhan *Kadsura angustifolia* (Huang dkk., 2015).



Gambar 2.6 Contoh sporangiofor (A) dan sporangium (B) pada fungi Zygomycota

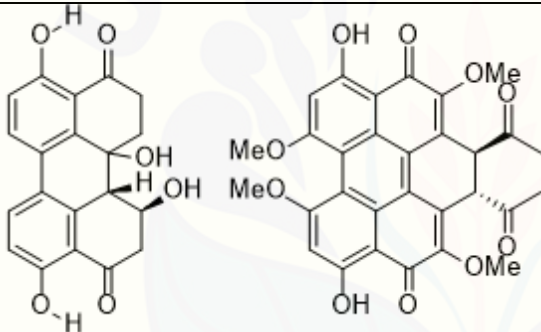
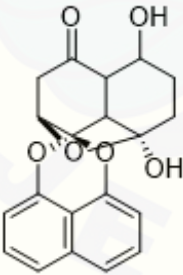
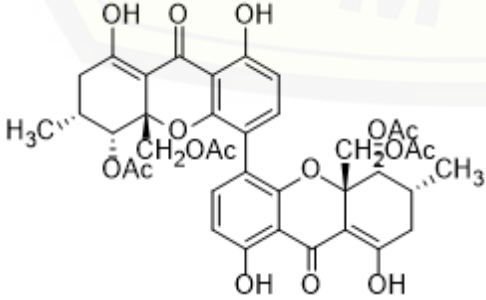
(Bullerman, 2003)

Fungi endofit menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang unik dan bervariasi. Dengan potensi keunikan struktur produk metabolit ini, probabilitas ditemukannya senyawa aktif baru dari fungi endofit cukup besar dibandingkan jenis fungi lainnya (Schulz dkk., 2002). Golongan senyawa metabolit sekunder yang

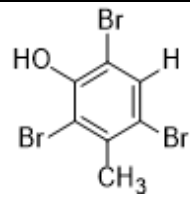
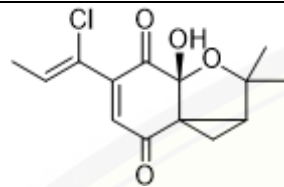
diproduksi fungi endofit antara lain terpenoid, steroid, *quinon*, *cumarin*, *xanthone*, *mycorrhizin*, fenol, peptida, enniatin, palmarumisin, *dimeric anthrone*, *furandione*, *perylene derivative*, *preussomarine*, *cythochalasin*, *benzopyranone* serta beberapa senyawa siklik dengan gugus fungsi yang aktif dengan struktur kimia seperti yang terlihat pada Tabel 2.1 (Schulz dkk., 2002; Strobel dkk., 2004; Verma dkk., 2009; Patil dkk., 2016; Vasundhara dkk., 2019).

Tabel 2.1 Struktur dasar golongan senyawa metabolit sekunder yang sering ditemui pada fungi endofit

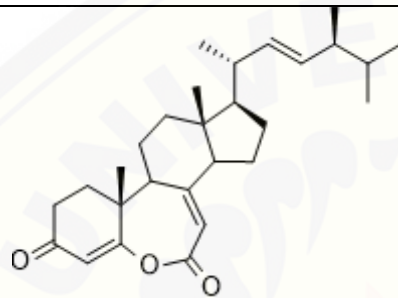
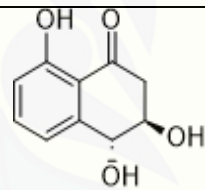
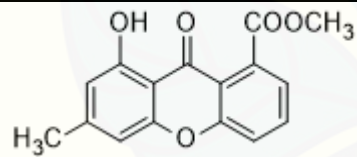
(Schulz dkk., 2002)

Struktur Dasar	Nama Golongan
	<i>Perylene derivative</i>
	Palmarumisin
	<i>Dimeric anthrone</i>

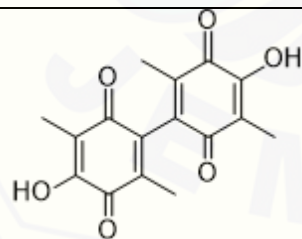
Fenol

*Mycorrhizin*

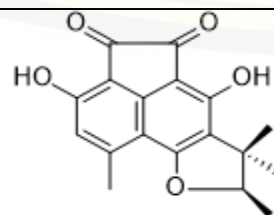
Steroid

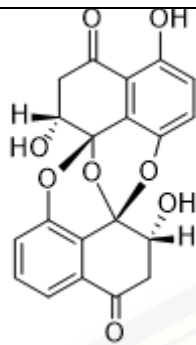
*Isocumarin**Xanthone*

Quinone

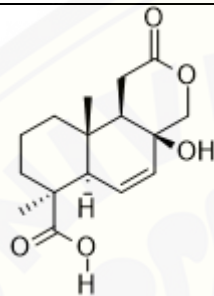


Furandione

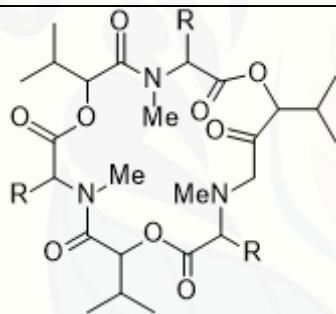




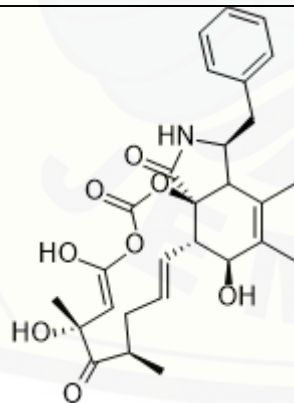
Preussomarin



Terpenoid



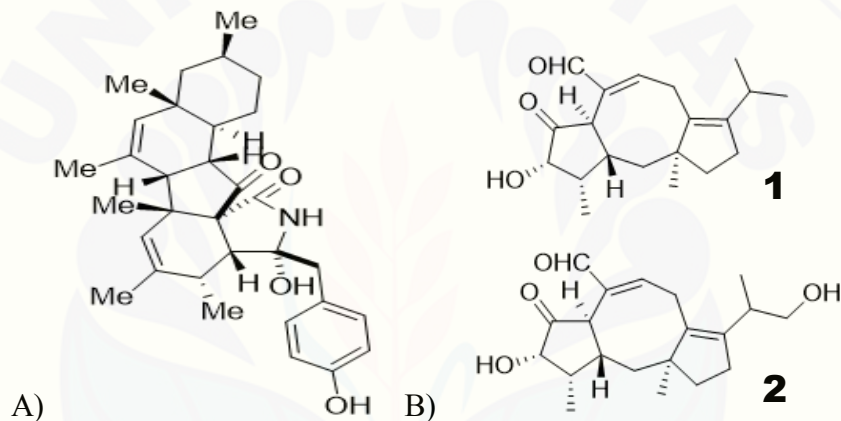
Enniatine

*Cytochalasin*

---

Beberapa fungi endofit menghasilkan senyawa metabolit sekunder dengan struktur kimia yang unik dan memiliki aktivitas antibakteri yang poten seperti senyawa *phomopsichalasin* dari fungi endofit *Phomopsis* sp. yang memiliki

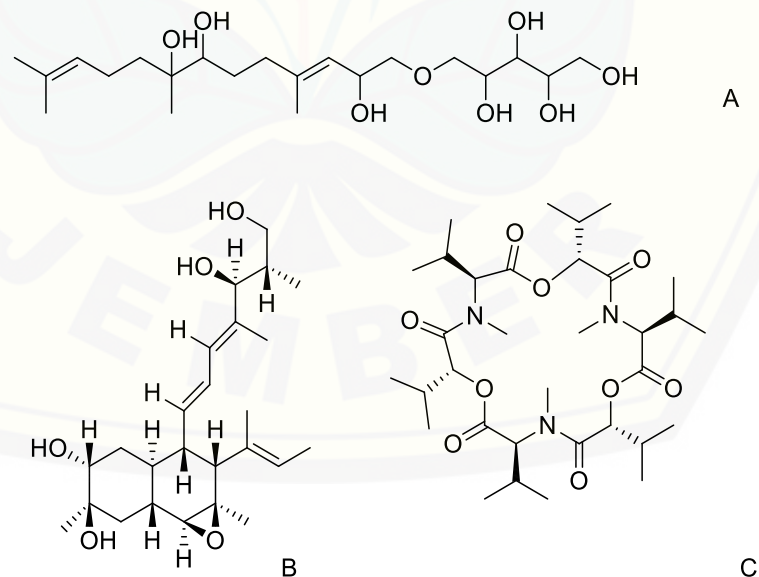
aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 4 µg dengan zona hambat sebesar 8 mm. Senyawa *phomopsichalasin* ini memiliki struktur tiga cincin *cytochalasin* makrolida yang unik (Horn dkk., 1995). Selain itu, senyawa *periconicin* yang diisolasi dari fungi endofit *Periconia* sp dalam tumbuhan *Taxus cuspidata* juga memiliki struktur fusicoccane diterpene yang unik. Senyawa tersebut memiliki aktivitas yang poten terhadap *Staphylococcus aureus* serta *Klebsiella pneumoniae* dengan nilai MIC secara berturut-turut sebesar 12,5 µg/ml dan 3,12 µg/ml (Kim dkk., 2004). Struktur *phomopsichalasin* dan *periconicin* tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.7. Berdasarkan hal tersebut, maka fungi endofit dapat menjadi salah satu sumber pencarian senyawa antibiotik baru yang potensial.



Gambar 2.7 a) Struktur *phomopsichalasin* b) struktur *periconicin* A (1) dan B (2)  
(Horn dkk., 1995) (Kim dkk., 2004)

Karakteristik morfologi, spesies, dan produk metabolit sekunder yang dihasilkan fungi endofit bersifat spesifik sesuai dengan tumbuhan inangnya masing-masing. Fungi endofit yang diperoleh dari organ tumbuhan yang berbeda dapat menunjukkan karakteristik morfologi maupun metabolit sekunder yang berbeda (Arnold, 2007). Spesies fungi endofit yang sama tetapi diisolasi dari spesies tumbuhan yang berbeda dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berbeda atau sama, begitu juga dengan bioaktivitasnya. Salah satu contohnya adalah fungi endofit *Fusarium tricinctum* yang diisolasi dari tumbuhan *Salicornia bigelovii* menghasilkan senyawa metabolit sekunder berupa Enniatin B, Fusarielin

B, dan *Fusartricin* yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phlei* and *Escherichia coli* dengan nilai MIC secara berturut-turut sebesar 19, 19, 10 and 10  $\mu\text{M}$ . Struktur Enniatin B, Fusarielin B, dan *Fusartricin* dapat dilihat pada Gambar 2.8 (Zhang dkk., 2014). Di lain sisi, fungi endofit *Fusarium tricinctum* yang diisolasi dari *Rhododendron tomentosum* menghasilkan senyawa Trtesin berupa suatu *antimicrobial peptide* yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus carnosus* dengan nilai MIC sebesar 64  $\mu\text{g/mL}$  (Tejesvi dkk., 2013). Fungi endofit terkadang juga memiliki bioaktivitas yang mirip dengan bioaktivitas tumbuhan inangnya. Salah satu contohnya adalah fungi endofit *Taxus andreanae* yang hidup di dalam jaringan kulit kayu bagian dalam *Taxomyces brevifolia* ternyata menghasilkan senyawa antikanker paclitaxel yang sama dengan tumbuhan inangnya tersebut (Strobel dan Daisy, 2003). Berdasarkan hal tersebut, tumbuhan inang yang akan dipilih sebagai sumber isolasi fungi endofit perlu dipertimbangkan terlebih dahulu untuk meningkatkan kemungkinan ditemukannya fungi endofit yang memiliki bioaktivitas seperti yang diharapkan.



Gambar 2.8 A) Struktur *fusartricin* B) struktur *fusarielin* C) struktur *enniatin*

(Zhang dkk., 2014)



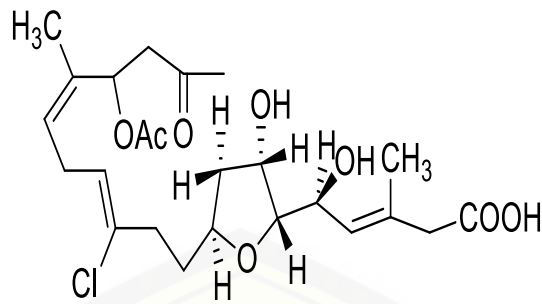
## 2.4 Pemilihan Tumbuhan Inang yang Dijadikan sebagai Sumber Isolasi Fungi Endofit

Tumbuhan inang yang akan dijadikan sebagai sumber fungi endofit perlu dipertimbangkan terlebih dahulu. Pemilihan tumbuhan inang yang tepat akan meningkatkan kemungkinan ditemukannya fungi endofit dengan bioaktivitas yang potensial. Kriteria tumbuhan inang yang berpotensi mengandung fungi endofit dengan bioaktivitas yang potensial menurut (Strobel dan Daisy, 2003) antara lain :

1. Tumbuhan yang hidup di lingkungan dengan stress abiotik maupun biotik yang tinggi

Tumbuhan yang mampu bertahan hidup di lingkungan dengan stress abiotik maupun stress biotik yang tinggi sangat berpotensi mengandung fungi endofit dengan bioaktivitas yang potensial. Salah satu contohnya yaitu tumbuhan aquatik *Ryncholacis penicillata* yang habitatnya adalah kawasan sungai Carrao di Venezuela bagian selatan. Tumbuhan ini ternyata mengandung fungi endofit *Serratia marcescens* dengan aktivitas antifungi yang poten. Senyawa metabolit sekunder yang diketahui aktif terhadap fungi patogen oomycetes adalah senyawa oocydin A seperti yang terlihat pada Gambar 2.9 dengan nilai MIC = 0,03 µg/ml. Bioaktivitas *Serratia marcescence* ini diduga digunakan untuk melindungi *Ryncholacis penicillata* dari infeksi fitopatogen oomycetes yang biasanya sangat rawan dialami oleh tumbuhan aquatik sepertinya. Hal ini mengingat, tumbuhan aquatik tersebut dipapar dengan stress abiotik secara terus menerus oleh aliran air sungai yang deras dan terkadang membawa puing-puing kotoran, sampah, debu, atau batu kerikil. Tumbuhan aquatik yang tetap sehat atau terbebas dari infeksi fitopatogen berarti mengandung fungi endofit di dalam jaringan tubuhnya yang mampu melawan fitopatogen (Strobel dkk., 1999; Strobel dan Daisy, 2003).





Gambar 2.9 Struktur oocydin A

(Strobel dkk., 1999; Strobel dan Daisy, 2003)

2. Tumbuhan yang dijadikan sebagai obat tradisional secara turun-temurun oleh etnis atau suku tertentu di suatu daerah

Tumbuhan obat tradisional berpotensi mengandung fungi endofit dengan bioaktivitas yang potensial. Hal ini mengingat karakteristik morfologi dan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroorganisme endofit bersifat spesifik pada masing-masing tumbuhan inang (Nisa dkk., 2015). Mikroorganisme endofit dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder yang serupa dengan produk metabolit tumbuhan inang seperti fungi endofit *Taxus andreanae* yang hidup di dalam jaringan kulit kayu tumbuhan *Taxomyces brevifolia* ternyata menghasilkan senyawa antikanker paclitaxel yang sama dengan tumbuhan tersebut (Strobel dkk., 1993). Berdasarkan hal tersebut maka bioaktivitas tumbuhan obat yang sudah diketahui secara turun temurun oleh masyarakat tradisional kemungkinan besar juga dimiliki oleh fungi endofit yang hidup di dalam jaringan tumbuhan tersebut. Salah satu contoh tumbuhan obat tradisional yang diketahui mengandung fungi endofit dengan bioaktivitas yang potensial adalah tumbuhan *Kennedia nigricans* yang terletak di Australia bagian utara. Getah tumbuhan tersebut telah lama digunakan oleh masyarakat suku Aborigin untuk mengobati luka, infeksi atau penyakit menular lainnya. Tumbuhan tersebut ternyata mengandung mikroba endofit yaitu *Streptomyces* sp. strain NRRL 30562 yang memproduksi senyawa munumbicin berupa *antimicrobial peptide* dengan aktivitas antibakteri yang poten. Senyawa munumbicin ini ada empat macam yaitu munumbicin A, B, C, D. Munumbicin

B memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis multidrug resistant* dan methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) dengan nilai IC<sub>50</sub> berturut-turut sebesar 10 µg/ml dan 2,5 µg/ml (Castillo dkk., 2002).

3. Tumbuhan endemik yang usianya sudah sangat tua

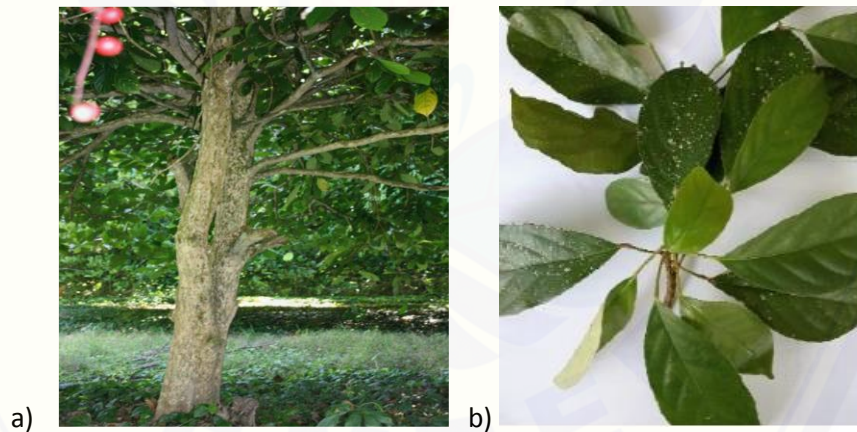
Fungi endofit yang hidup di dalam jaringan tubuh tumbuhan endemik yang usianya sudah tua atau tumbuhan yang telah mengalami evolusi dan seleksi alam dari waktu ke waktu kemungkinan besar juga mengalami evolusi dan seleksi alam seperti tumbuhan inangnya tersebut. Fungi endofit yang mampu bertahan hidup di dalam jaringan tumbuhan endemik yang sudah tua tersebut adalah fungi yang berhasil mengatasi berbagai stres abiotik dan biotik sehingga kemungkinan besar memiliki aktivitas biologis yang potensial (Strobel dan Daisy, 2003).

4. Tumbuhan yang hidup di ekosistem dengan tingkat keberagaman spesies hayati yang tinggi

Tumbuhan yang hidup di ekosistem dengan tingkat keberagaman spesies hayati yang tinggi berpotensi mengandung fungi endofit dengan tingkat keberagaman spesies yang tinggi pula (Strobel dan Daisy, 2003). Keberagaman spesies fungi endofit ini akan lebih banyak ditemui pada ekosistem yang beriklim tropis (Nisa dkk., 2015). Indonesia merupakan salah satu negara tropis dengan tingkat keberagaman hayati yang tinggi dan menempati posisi nomor dua di dunia. Dengan kekayaan sumber daya hayati tersebut, banyak sekali ditemukan tumbuhan obat di Indonesia. Tumbuhan obat tersebut sudah digunakan oleh masyarakat tradisional secara turun temurun untuk mengobati berbagai penyakit terutama penyakit infeksi. Hal ini dibuktikan melalui beberapa penelitian yang menunjukkan bahwa tumbuh-tumbuhan tersebut ternyata memiliki aktivitas biologis yang potensial sebagai obat antiinfeksi. Faktanya, masih banyak sekali spesies tumbuh-tumbuhan tersebut yang belum terjamah dan mungkin berpotensi menyimpan aktivitas biologis yang potensial (Nugraha dan Keller, 2011).

Salah satu tumbuhan endemik yang khas di kawasan Melayu dan terdapat di Indonesia adalah tumbuhan kepundung. Berdasarkan data konsensus tumbuhan yang dirilis oleh ITIS *Organization and Partner* (ITIS Organization, 2019) dan berdasarkan hasil determinasi, klasifikasi tumbuhan kepundung dengan nomor serial taksonomi 506427 adalah:

Kingdom	= Plantae
Divisi	= Spermatophyta
Subdivisi	= Magnoliophyta
Kelas	= Magnoliopsida
Orde	= Euphorbiales
Famili	= Euphorbiaceae
Genus	= <i>Baccaurea</i>
Spesies	= <i>Baccaurea racemosa</i> (Reinw.) Muell. Arg



Gambar 2.10 a) Pohon kepundung b) daun kepundung  
(Jumahwi, 2019) (Lim, 2012)

Tumbuhan kepundung seperti yang terlihat pada Gambar 2.10 merupakan tumbuhan perenial dengan tinggi 15-20 cm dengan batang berwarna pucat hingga abu-abu coklat. Susunan daun kepundung berselang-seling dengan tangkai daun (*petiole*) yang panjangnya mencapai 12-77 mm. Selain itu, pada daun kepundung juga ada daun penumpu (*stipula*) yang berbentuk elips atau segitiga. Helai daun

kepundung berbentuk *ovatus* (bulat telur), *oblongus* (memanjang) atau bulat telur sungsang (*obovatus*) dengan panjang 5,8-22 mm dan lebar 2,3-18,8 mm. Tepi daun kepundung berbentuk *entire* (rata dan tidak bertoreh). Pangkal daun berbentuk *cuneatus* atau segitiga sungsang/baji. Ujung daun kepundung menyempit memanjang (*acuminatus*) (Lim, 2012).

Tumbuhan kepundung ini tersebar di kawasan Thailand, Semenanjung Malaya, Sumatra, Jawa, Kepulauan Sunda Kecil, Borneo, Sulawesi, hingga Maluku. Pohon kepundung ini tumbuh di dataran rendah pada ketinggian 1000 m di atas permukaan air laut. Kepundung umumnya tumbuh di tanah aluvial yang kering, liat, dan berpasir (Lim, 2012).

Tumbuhan kepundung ini berpotensi menjadi inang fungi endofit dengan bioaktivitas yang potensial. Hal ini mengingat tumbuhan dari genus *Baccaurea* sp. seperti tumbuhan kepundung banyak dilaporkan memiliki bioaktivitas seperti antioksidan, antikanker, antimikroba, antidiabetes, antiinflamasi, dan antitripanosoma (Gunawan dkk., 2016). Salah satu contohnya adalah *Baccaurea lanceolata* yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif. *Baccaurea lanceolata* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus aureus* dengan nilai  $IC_{50}$  berturut-turut sebesar 25  $\mu\text{g/ml}$ , 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , dan 50  $\mu\text{g/ml}$  (Galappathie dkk., 2014). Mengingat tumbuhan kepundung masih dalam satu genus dengan *Baccaurea lanceolata* sehingga tumbuhan kepundung juga berpotensi memiliki aktivitas antibakteri yang serupa dengan tumbuhan tersebut. Berdasarkan data empiris, daun tumbuhan kepundung ini biasa dimanfaatkan masyarakat tradisional untuk mengobati diare (Aprilianti dkk., 2009). Hasil penelitian sebelumnya melaporkan bahwa, ekstrak metanol daun kepundung mulai menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 2,5 mg/ml dengan nilai zona hambat berturut-turut sebesar  $6,39 \pm 0,25$  mm dan  $7,36 \pm 0,10$  mm. Fraksi etil asetat daun kepundung juga menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan zona hambat berturut-turut sebesar  $11,37 \pm 0,24$  mm dan  $11,36 \pm 0,36$  mm pada konsentrasi 20 mg/ml (Jumahwi, 2019). Selain



memiliki aktivitas antibakteri, menurut Widodo dkk., daun tumbuhan kepundung juga memiliki aktivitas antioksidan yang poten dengan  $IC_{50}$  sebesar  $4,298 \pm 0,306$   $\mu\text{g/ml}$ . (Widodo dkk., 2019). Bioaktivitas tersebut berkaitan dengan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan ini. Senyawa metabolit sekunder yang banyak ditemui pada tumbuhan genus *Baccaurea* sp. antara lain alkaloid, flavonoid, tanin, dan fenolik. Khusus untuk daun kepundung, di dalam fraksi etil asetat daun kepundung terkandung golongan senyawa polifenol, flavonoid, terpenoid atau steroid, dan alkaloid (Jumahwi, 2019).

## 2.5 Tinjauan Prosedur Penelusuran Metabolit Sekunder Fungi Endofit

### 2.5.1 Isolasi Fungi Endofit

Isolasi merupakan tahapan yang dilakukan untuk mengeluarkan fungi endofit dari jaringan tumbuhan dan menumbuhkannya pada media pertumbuhan in vitro. Media pertumbuhan yang biasa digunakan untuk menumbuhkan fungi endofit antara lain *potato dextrose agar* (PDA), *corn meal malt agar* (CMMA), *malt extract agar* (MEA), *water agar* (WA), *sabouraud dextrose agar* (SAB), *czapek agar* (CZA), *corn meal agar + 2% dextrose* (CMA), *Kenknight Munaier's medium*, dan *nutrient broth* (Zheng dkk., 2015). Prosedur isolasi merupakan tahap yang paling kritis dan menentukan keberhasilan upaya eksplorasi fungi endofit. Ada banyak sekali hal yang perlu diperhatikan ketika melakukan proses isolasi fungi endofit dari sampel organ tumbuhan seperti selang waktu antara pengambilan sampel organ tumbuhan dengan proses isolasi fungi endofit, durasi sterilisasi permukaan sampel organ tumbuhan, konsentrasi disinfektan yang digunakan untuk sterilisasi permukaan serta kondisi sampel organ tumbuhan. Prosedur isolasi harus dilakukan ketika sampel organ tumbuhan masih dalam keadaan segar. Jika tidak memungkinkan untuk mengisolasi fungi endofit dalam selang waktu 24 jam setelah pengambilan sampel organ tumbuhan maka organ tumbuhan tersebut sebaiknya dimasukkan ke dalam kulkas. Hal ini bertujuan untuk mencegah kematian fungi endofit di dalam sampel organ tumbuhan tersebut. Sampel organ tumbuhan yang akan digunakan untuk proses isolasi perlu diberikan perlakuan awal terlebih dahulu seperti pencucian dengan detergen dan sterilisasi permukaan dengan disinfektan.

Proses ini bertujuan untuk mencegah adanya kontaminasi mikroorganisme lain seperti mikroorganisme epifit pada media kultur. Tween 20, Tween 80, dan Triton X-100 merupakan surfaktan yang biasa digunakan sebagai detergen untuk pembersihan awal organ tumbuhan dari kotoran-kotoran yang menempel. Selanjutnya, proses sterilisasi permukaan organ tumbuhan dengan disinfektan tidak boleh terlalu lama agar fungi endofit di dalam jaringan tumbuhan tersebut tidak mati. Konsentrasi disinfektan yang digunakan untuk sterilisasi permukaan organ tumbuhan juga harus diatur, jika terlalu pekat maka akan menyebabkan kematian fungi endofit (Martinez-klimova dkk., 2017). Disinfektan yang biasa digunakan untuk mensterilisasi permukaan organ tumbuhan tersebut antara lain Na hypochlorite (2-10%), etanol (70-90%), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%), dan KMnO<sub>4</sub> (2%) (Zheng dkk., 2015).

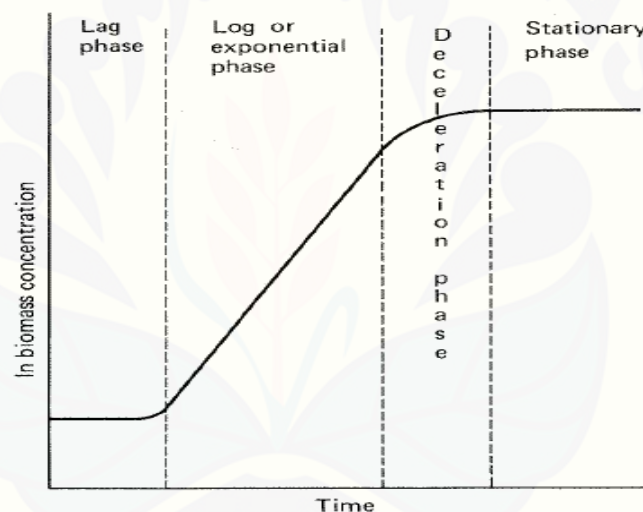
#### 2.5.2 Fermentasi Fungi Endofit

Fermentasi merupakan proses katabolisme senyawa organik oleh mikroorganisme untuk menghasilkan energi dan produk metabolit tertentu dalam kondisi anaerob (Glazer dan Nikaido, 2007). Untuk mendapatkan produk metabolit mikroorganisme ada tiga sistem fermentasi yang bisa diterapkan yaitu sistem *batch culture*, *fed batch culture*, dan *continous culture*. Sistem *batch culture* dilakukan dalam sistem tertutup yang bebas dari kontaminasi mikroorganisme lain selain kultur mikroorganisme target yang ditambahkan dalam jumlah tertentu ke dalam media fermentasi. Proses fermentasi dengan sistem *batch culture* dilakukan selama waktu tertentu tanpa adanya penambahan nutrisi ke dalam media sehingga jumlah nutrisi dalam media terbatas. Tipe lain sistem fermentasi tertutup selain sistem *batch culture* adalah sistem *fed batch culture*. Pada sistem *fed batch culture* dilakukan penambahan nutrisi sedikit demi sedikit ke dalam media yang tertutup sehingga terjadi peningkatan jumlah media fermentasi. Di lain pihak, sistem *continous batch culture* merupakan sistem fermentasi terbuka. Pada sistem *continous batch culture*, media fermentasi selalu diperbarui. Diantara semua metode tersebut, *batch culture* merupakan sistem fermentasi yang paling sering



digunakan untuk memanen produk metabolit sekunder dari mikroorganisme (Stanbury dkk., 1995; Ali dkk., 2018).

Fase kehidupan mikroorganisme pada fermentasi sistem *batch culture* diawali oleh fase lag yaitu ketika mikroorganisme melakukan adaptasi terhadap kondisi media fermentasi yang baru. Selanjutnya diikuti oleh fase log atau eksponensial atau tropofase yaitu ketika laju pertumbuhan mikroorganisme meningkat secara drastis hingga mencapai maksimum. Kemudian diikuti oleh fase stasioner atau idiofase yaitu ketika laju pertumbuhan mikroorganisme melambat atau tidak ada sama sekali akibat jumlah nutrisi dalam media semakin terbatas (Stanbury dkk., 1995; Ali dkk., 2018). Kurva laju pertumbuhan mikroorganisme ini dapat dilihat pada Gambar 2.11 berikut.



Gambar 2.11 Kurva pertumbuhan mikroorganisme pada sistem *batch culture fermentation*

(Stanbury dkk., 1995; Ali dkk., 2018)

Produk metabolit yang dihasilkan oleh mikroorganisme selama proses fermentasi dapat berupa metabolit primer maupun sekunder. Metabolit primer umumnya dihasilkan selama fase eksponensial atau log atau tropofase karena senyawa metabolit primer tersebut diperlukan untuk menunjang pertumbuhan mikroorganisme. Di lain pihak, senyawa metabolit sekunder banyak dihasilkan ketika kehidupan mikroorganisme tersebut memasuki fase stasioner atau idiofase (Poonam, 2009).

Proses biosintesis senyawa metabolit sekunder terjadi ketika ada komponen nutrisi dalam media yang habis. Beberapa komponen nutrisi yang memengaruhi pembentukan senyawa metabolit sekunder adalah fosfor, karbon dan nitrogen. Contoh senyawa metabolit sekunder yang terbentuk ketika jumlah fosfor dalam media habis adalah alkaloid ergot. Biosintesis asam giberelat terjadi ketika jumlah nitrogen dalam media terbatas. Penisilin dibentuk ketika suplai glukosa dalam media hampir habis. Keterbatasan nutrisi pada fase stasioner memicu akumulasi senyawa metabolit sekunder pada media sehingga fase stasioner merupakan fase yang paling sesuai untuk memanen senyawa metabolit sekunder dari hasil proses fermentasi mikroorganisme (Barrios-gonzalez dan Mejia, 1996).

Proses biosintesis senyawa metabolit sekunder sebenarnya berhubungan erat dengan jalur biosintesis senyawa metabolit primer. Secara garis besar jalur biosintesis senyawa metabolit sekunder mikroorganisme ini terbagi menjadi empat macam yaitu jalur asam shikimat, jalur asam amino, jalur asetil Co-A, dan jalur glukosa. Contoh senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dari jalur shikimat antara lain alkaloid ergot, candicidin, dan kloramfenikol. Contoh senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dari jalur asam amino antara lain penisilin, sefalosporin, sefamisin, gramisidin, dan siklosporin. Contoh senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dari jalur asetil Co-A antara lain eritromisin, avermectin, doxorubicin, serta taxol. Contoh senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dari jalur glukosa antara lain streptomisin dan kanamisin (Fernandez dan Tomasini, 2003).

### 2.5.3 Ekstraksi Hasil Fermentasi Fungi Endofit

Mikroorganisme umumnya menyekresikan senyawa metabolit primer dan sekunder ke dalam media fermentasi yang mengandung berbagai komponen yang kompleks sehingga diperlukan proses pemisahan senyawa metabolit sekunder tersebut dari media fermentasi. Metode partisi cair-cair merupakan metode yang paling umum digunakan untuk memisahkan senyawa target dari media fermentasi. Menurut metode ini, senyawa target dapat ditarik dari media fermentasi yang bersifat aqueous dengan memanfaatkan prinsip partisi senyawa tersebut pada dua

cairan yang tidak saling campur. Prinsip partisi ini didasarkan pada karakteristik polaritas senyawa terhadap pelarut. Polaritas suatu senyawa akan menentukan derajat kelarutannya di dalam suatu pelarut. Kelarutan suatu senyawa dalam suatu pelarut mengikuti prinsip *like dissolve like*. Senyawa yang polar akan terlarut dalam pelarut polar sedangkan senyawa non polar akan lebih mudah terlarut dalam pelarut non polar. Prinsip inilah yang digunakan sebagai dasar ekstraksi partisi cair-cair. Untuk memisahkan senyawa target tersebut ditambahkan pelarut organik dengan polaritas tertentu ke dalam media fermentasi yang berair sehingga terbentuk dua fase yang tidak saling bercampur yaitu fase pelarut organik dan fase air. Proses pemisahan senyawa target dengan metode partisi ini dapat dilakukan di dalam corong pisah (Houck dan Siegel, 2015).

## 2.6 Tinjauan Prosedur Uji Aktivitas Antibakteri

Selama ini metode uji antibakteri yang telah tervalidasi merupakan metode pengujian kepekaan bakteri patogen terhadap obat-obatan antibiotik untuk penentuan antibiotik definitif bagi pasien penderita infeksi. Di lain pihak, metode uji antibakteri yang digunakan pada penelitian aktivitas antibakteri ekstrak bahan alam masih belum tervalidasi. Metode uji antibakteri secara umum ada dua macam yaitu metode difusi dan dilusi. Penentuan potensi aktivitas antibakteri dengan metode difusi didasarkan pada ukuran diameter zona hambat yang ditimbulkan oleh sampel uji terhadap koloni bakteri. Semakin luas zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi sampel uji yang kecil maka sampel tersebut bisa dikatakan memiliki aktivitas antibakteri yang poten. Contoh metode difusi antara lain *agar-disk diffusion method*, *Etest (antimicrobial gradient method)*, *agar-well diffusion method*, dan *agar-plug diffusion method*. Di lain pihak, metode dilusi merupakan metode yang biasa digunakan untuk menentukan nilai KHM (konsentrasi hambat minimum) dan KBM (konsentrasi bakterisidal minimum) dari senyawa antibiotik. Metode dilusi ini ada dua macam yaitu *broth dilution method (macrodilution method and microdilution method)* dan *agar dilution method* (Balouiri dkk., 2016).

Salah satu metode difusi yang umum digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi cakram Kirby-Bauer. Cakram yang digunakan

umumnya berukuran 6 mm. Cakram ini diimpregnasi terlebih dahulu dalam larutan uji antibiotik dengan berbagai konsentrasi. Ketika cakram antibiotik ini diletakkan pada media agar maka air yang terkandung pada media agar akan meresap ke dalam cakram tersebut dan mengekstraksi senyawa antibiotik yang terkandung dalam cakram. Senyawa antibiotik tersebut akan terbawa keluar dari cakram dan berdifusi pada media agar. Kecepatan difusi senyawa antibiotik pada media agar tidak secepat kecepatan senyawa antibiotik keluar dari cakram sehingga konsentrasi antibiotik akan menurun seiring dengan semakin jauhnya jarak difusi. Ini mengakibatkan konsentrasi senyawa antibiotik terbesar terletak di sisi yang paling dekat dengan cakram. Selain itu, kondisi ini juga dipengaruhi oleh berat molekul dan kelarutan senyawa antibiotik dalam sampel uji. Semakin besar berat molekul dan semakin kecil kelarutan senyawa antibiotik maka proses difusi senyawa tersebut pada media agar akan semakin lambat (Hudzicki, 2009). Faktor inilah yang menyebabkan penentuan aktivitas antibakteri dengan metode difusi kurang akurat.

Salah satu metode dilusi yang sering digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah *broth microdilution* dan *broth macrodilution*. Dengan menggunakan metode dilusi tersebut, dapat didapatkan informasi tentang konsentrasi minimum ekstrak/sampel uji yang menunjukkan aktivitas antibakteri dan derajat penghambatan sampel tersebut secara akurat dan *reproducible* dibandingkan dengan menggunakan metode difusi. Dari kedua metode tersebut, metode yang paling sering dipilih untuk uji adalah metode *broth microdilution*. Hal ini dikarenakan sebagian besar proses uji makrodilusi masih dilakukan secara manual sehingga resiko mendapatkan hasil *error* cukup tinggi, proses uji membutuhkan waktu cukup lama serta metode ini membutuhkan reagen dan peralatan yang cukup banyak. Sebaliknya, proses uji pada metode mikrodilusi hanya membutuhkan bahan dan peralatan yang sedikit serta membutuhkan waktu yang relatif lebih cepat sehingga lebih sesuai untuk uji laboratorium (Balouiri dkk., 2016).

Berdasarkan penelitian Klancnik dkk, metode mikrodilusi merupakan metode yang paling cepat dan akurat untuk mengukur potensi aktivitas antibakteri



ekstrak bahan alam berdasarkan nilai KHM atau KBM. Sebaliknya, metode difusi cakram merupakan metode yang sesuai untuk skrining awal apakah suatu ekstrak bahan alam memiliki aktivitas antibakteri atau tidak (Klancnik dkk., 2010).

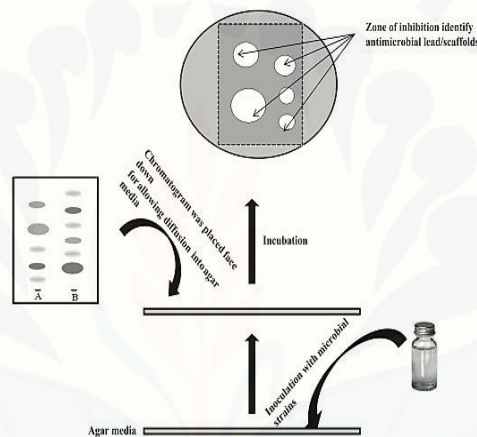
### **2.7 Tinjauan Analisa Golongan Senyawa Metabolit Sekunder dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis macam-macam golongan metabolit sekunder yang terkandung di dalam suatu ekstrak bahan alam dapat diidentifikasi secara cepat. Identifikasi golongan senyawa metabolit sekunder ini biasa disebut dengan nama skrining fitokimia. Dalam skrining fitokimia dengan metode KLT ini, ekstrak diekstraksi dengan komposisi eluen tertentu sehingga komponen-komponen yang terkandung di dalam ekstrak tersebut akan terpisah berdasarkan tingkat afinitasnya terhadap fase diam dan fase gerak sistem KLT. Komponen ekstrak yang terpisah-pisah dengan jarak migrasi tertentu pada plat KLT tersebut kemudian disemprot dengan reagen pendeteksi yang spesifik untuk mendeteksi golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak (Harborne, 1973).

Selain digunakan untuk mengidentifikasi golongan senyawa dalam suatu ekstrak, metode KLT juga bisa dikembangkan untuk mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak yang bertanggung jawab terhadap suatu aktivitas biologis. Metode identifikasi bioaktivitas tersebut dinamakan KLT bioautografi. Metode uji KLT bioautografi ini ada tiga macam yaitu metode kontak (*contact bioautography*), metode perendaman (*immersion or agar overlay bioautography*), dan metode langsung (*direct bioautography*) (Dewanjee dkk., 2015).

Prinsip uji KLT bioautografi kontak mirip dengan metode uji difusi. Senyawa uji dibiarkan berdifusi dari absorben silika pada lempeng KLT menuju media agar yang telah mengandung bakteri uji seperti yang terlihat pada Gambar 2.12. Plat KLT yang mengandung sampel hasil eluasi ditempelkan pada media tersebut selama beberapa waktu tertentu untuk berdifusi. Kemudian plat KLT tersebut diambil dan media yang berisi inokulum bakteri diinkubasi selama 18-24

jam. Keberadaan zona bening di sekitar bekas penempelan plat KLT menunjukkan bahwa ada komponen dalam sampel memiliki aktivitas antibakteri sehingga akan memberikan informasi yang lebih lengkap tentang senyawa yang berperan menimbulkan aktivitas biologis dibandingkan uji difusi biasa. Di lain sisi, KLT bioautografi kontak ini memiliki kekurangan yaitu kondisi kontak yang optimal antara noda hasil eluasi pada lempeng KLT dengan media agar bakteri sulit didapatkan sehingga dapat menimbulkan bias pada hasil uji. Selain itu, senyawa yang tidak larut dalam air akan sulit berdifusi dari absorben silika pada lempeng menuju media agar bakteri (Dewanjee dkk., 2015). Skema uji KLT bioautografi kontak ini dapat dilihat pada Gambar 2.12.



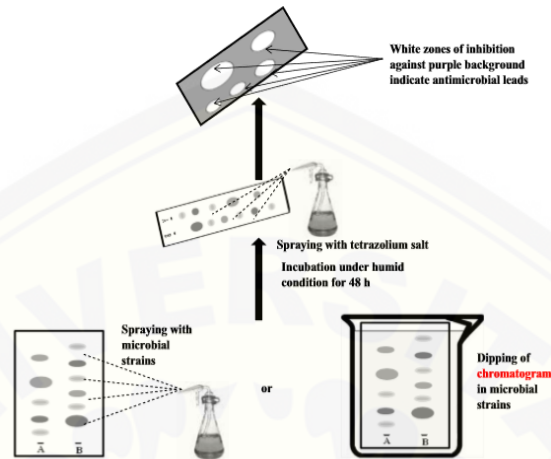
Gambar 2.12 Skema uji KLT bioautografi metode kontak (*contact bioautography*)

(Dewanjee dkk., 2015)

Pada uji KLT bioautografi metode langsung (*direct bioautography*) plat KLT yang mengandung noda hasil eluasi sampel disemprot atau direndam dalam suspensi bakteri uji lalu diinkubasi dalam kondisi lembab selama 24 jam. Setelah itu, plat tersebut disemprot dengan garam tetrazolium dan diinkubasi lagi selama 24 jam. Adanya area putih dengan latar belakang ungu pada plat KLT menunjukkan adanya komponen sampel yang memiliki aktivitas antibakteri (Dewanjee dkk., 2015). KLT bioautografi metode langsung ini memiliki sensitivitas yang lebih baik (Choma dan Jesionek, 2015) dan sering digunakan untuk uji KLT bioautografi dibandingkan KLT bioautografi dengan metode kontak (Choma dan Grzelak, 2011). Di lain pihak, metode tersebut membutuhkan proses yang lebih banyak dan



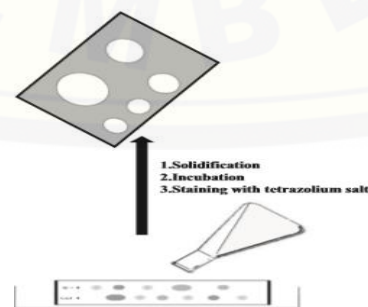
waktu yang lebih lama dibandingkan uji KLT bioautografi dengan metode kontak. Skema uji KLT bioautografi metode langsung (*direct bioautography*) dapat dilihat pada Gambar 2.13.



Gambar 2.13 Skema uji KLT bioautografi metode langsung (*direct bioautography*)

(Dewanjee dkk., 2015)

Uji KLT bioautografi dengan metode perendaman (*immersion or agar overlay bioautography*) menggabungkan prinsip kedua metode uji KLT bioautografi yang sebelumnya. Pada metode ini, media pertumbuhan agar dan cair dengan komposisi tertentu dituang pada plat KLT yang mengandung noda hasil eluasi sampel kemudian diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya plat KLT tersebut disemprot dengan garam tetrazolium. Adanya area berwarna putih dengan latar belakang ungu menunjukkan adanya komponen sampel yang memiliki aktivitas antibakteri. Skema uji KLT bioautografi dengan metode *agar overlay* ini dapat dilihat pada Gambar 2.14



Gambar 2.14 Skema uji KLT bioautografi *agar overlay*

(Dewanjee dkk., 2015)

## BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepundung termasuk dalam *true experimental laboratories*.

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit ini dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Farmasi Universitas Jember serta di Laboratorium Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember mulai bulan September 2019 - Januari 2020.

### 3.3 Variabel Penelitian

#### 3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang diteliti pada uji aktivitas antibakteri ini adalah nilai konsentrasi larutan ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepundung.

#### 3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang diteliti adalah nilai % penghambatan ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepundung terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*

#### 3.3.3 Variabel Terkendali

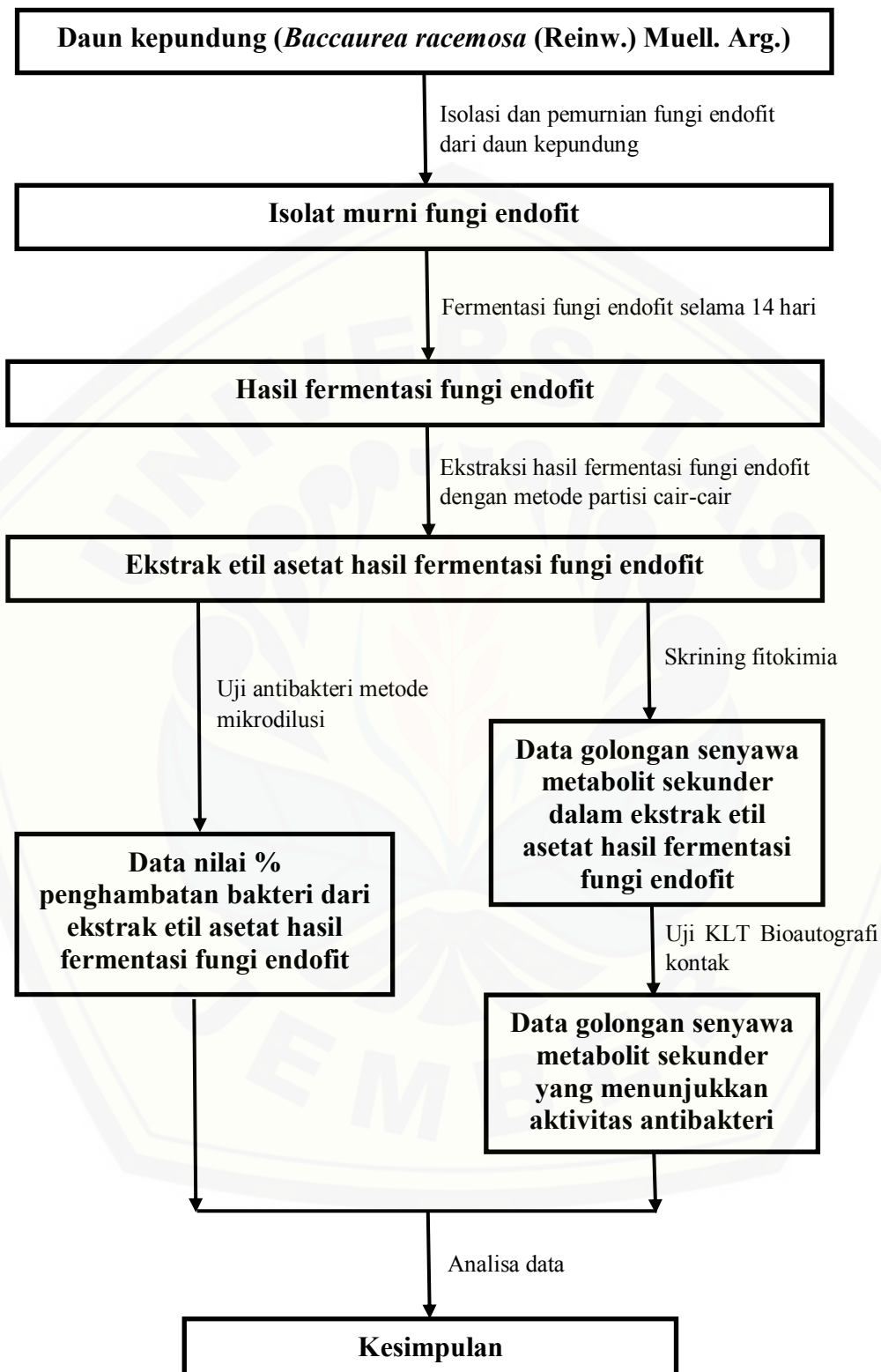
Variabel yang dikendalikan pada penelitian ini antara lain :

1. Tempat pengambilan dan spesifikasi sampel daun kepundung
2. Metode dan media isolasi, kultur, dan fermentasi fungi endofit
3. Metode ekstraksi hasil fermentasi fungi endofit
4. Metode dan media uji antibakteri
5. Strain bakteri uji yang digunakan

### 3.4 Definisi Operasional

1. Spesifikasi daun kepundung (*Baccaurea racemosa* Reinw. (Muell.). Arg) yang digunakan pada penelitian ini tidak ditentukan karena daun diambil secara acak. Sampel daun kepundung diambil dari Desa Karangpring, Kecamatan Sukorambi, Jember pada bulan Mei 2019. Pemilihan daun hanya didasarkan pada kondisi morfologi dan kesehatan daun, daun yang dipilih adalah daun yang sehat dan bebas dari bercak atau penyakit.
2. Isolat fungi yang diambil dari daun kepundung adalah yang berupa kapang. Kapang adalah fungi multiseluler yang memiliki hifa. Identifikasi isolat fungi endofit yang berbentuk kapang dilakukan secara makroskopis dengan kasat mata dan mikroskopis.
3. Ekstraksi pada penelitian ini digunakan untuk menyari senyawa metabolit sekunder dari media fermentasi isolat fungi yang telah berumur 14 hari. Untuk menyari metabolit sekunder dari media fermentasi yang bersifat aqueous maka digunakan metode partisi cair-cair. Dalam metode partisi cair-cair ini digunakan prinsip partisi/penyebaran senyawa pada dua pelarut yang tidak saling campur. Hal inilah yang menjadi dasar pemilihan etil asetat sebagai cairan penyari hasil fermentasi isolat fungi endofit karena etil asetat dan air tidak saling bercampur.
4. Uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini hanya dilakukan pada konsentrasi 100 µg/ml sehingga parameter yang diukur pada penelitian ini adalah nilai persen penghambatan masing-masing ekstrak uji terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* bukan nilai IC<sub>50</sub> (konsentrasi minimum untuk menghambat 50% koloni bakteri) atau KHM (konsentrasi hambat minimum).
5. Uji KLT bioautografi kontak digunakan untuk menskrining komponen-komponen senyawa di dalam ekstrak uji yang memiliki aktivitas antibakteri dengan memanfaatkan prinsip difusi kontak.

### 3.5 Rancangan Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

### 3.6 Alat dan Bahan

#### 3.6.1 Alat

Timbangan analitik digital (SARTORIUS), autoklaf (ALP), *Laminar Air Flow Cabinet* (AIRETCH), inkubator (18-ONE SIC 50L), vortex (HEIDOLPH), mikropipet (EPPENDORF), microplate *flat bottom* 96-well (IWAKI), mikrotip biru dan kuning, ELISA reader, cawan petri (DURAN), corong pisah (PYREX), *shaker incubator*, jangka sorong (TRICLE BRAND), gelas beaker, tabung reaksi, erlenmeyer, pipet tetes, *hot plate* (UC-152), spatula, vial, eppendorf, bunsen, plug pelubang (*cork borer*), kawat ose, pisau steril, pinset, gelas ukur, batang pengaduk, spektrofotometer UV-Vis (Genesys), alat penyemprot reagen, dan *chamber* KLT.

#### 3.6.2 Bahan

Daun kepundung (*Baccaurea racemosa* (Reinw.) Muell. Arg.), media PDB, media PDA, media MHA, media CAMHB, media *Rose Bengal Chloramphenicol Agar*, aquabides steril, aqua demineralata, larutan NaOCl 1%, DMSO 1%, etil asetat, bakteri uji gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, larutan NaCl 0,9% steril, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, larutan injeksi gentamisin, plat KLT F<sub>254</sub>, reagen Dragendorff, anisaldehida H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, vanilin H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, ninhidrin, asam asetat glasial, *n*-heksan.

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Preparasi Media

##### 1. Preparasi Media *Rose-Bengal Chloramphenicol Agar*

Media *Rose Bengal Chloramphenicol* merupakan media yang mengandung kloramfenikol sehingga media ini selektif hanya terhadap fungi sedangkan bakteri akan mati sehingga kontaminasi bakteri pada media isolasi dapat dicegah. Untuk membuat media *Rose Bengal Chloramphenicol Agar* dilarutkan sejumlah 6,87 gram media *Rose Bengal Chloramphenicol Agar* dalam 200 ml aqua demineralata sambil dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk sampai larut sempurna. Selanjutnya,



media *Rose Bengal Chloramphenicol Agar* tersebut disterilisasi dengan metode panas basah di dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 1-3 menit.

#### 2. Preparasi Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Media PDA digunakan sebagai media kultur fungi endofit yang telah berhasil diisolasi dari daun kepungung. Untuk membuat media PDA, dilarutkan sejumlah 9,75 gram media PDA dalam 250 ml aqua demineralata sambil dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk sampai larut sempurna. Kemudian media PDA ini disterilisasi dengan metode panas basah di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### 3. Preparasi Media *Potato Dextrose Broth* (PDB)

Media PDB digunakan untuk memfermentasi isolat fungi endofit daun kepungung. Untuk membuat media PDB, dilarutkan sejumlah 6 g media PDB dalam 250 ml aqua demineralata dan diaduk sampai larut sempurna. Kemudian media PDB ini disterilisasi dengan metode panas basah di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### 4. Preparasi Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

MHA digunakan sebagai media peremajaan bakteri uji dan skrining KLT biautografi kontak. Untuk membuat media MHA, dilarutkan sejumlah 5,44 g serbuk MHA ke dalam aqua demineralata 250 ml yang dididihkan dan diaduk sampai larut sempurna. Setelah itu, media MHA tersebut disterilisasi dengan metode panas basah di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### 5. Preparasi Media *Cationic Adjusted Mueller Hinton Broth* (CAMHB)

CAMHB merupakan media yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi. CAMHB merupakan media MHB yang ditambah kation  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$ . Penambahan ini ditujukan untuk meminimalkan rentang kesalahan hasil. Persyaratan jumlah  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$  yang harus terkandung dalam

media berturut-turut sebesar 20-25 mg  $\text{Ca}^{2+}/\text{L}$  dan 10-12,5 mg  $\text{Mg}^{2+}/\text{L}$  (CLSI, 2012a).

Untuk membuat media CAMHB, pertama-tama dilarutkan 1,78 g media MHB dalam 80 ml aqua demineralata. Kemudian media tersebut disterilisasi dengan metode panas basah di dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Di dalam media MHB yang digunakan tidak terkandung kation  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$  sehingga ditambah senyawa yang mengandung kation tersebut yaitu  $\text{MgCl}_2$  dan  $\text{CaCl}_2$  hingga diperoleh konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$  sesuai rentang yang dipersyaratkan. dilarutkan 0,836466 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dalam aqua demineralata 10 ml sehingga diperoleh larutan induk yang mengandung  $\text{Mg}^{2+}$  sebesar 10 mg/ml. dilarutkan 0,366809 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dalam aqua demineralata 10 ml sehingga diperoleh larutan induk yang mengandung  $\text{Ca}^{2+}$  sebesar 10 mg/ml. Kemudian dipipet sebanyak 0,1 ml larutan induk  $\text{Mg}^{2+}$  dan 0,2 ml larutan induk  $\text{Ca}^{2+}$  lalu dimasukkan ke dalam media MHB yang sudah disterilisasi sehingga diperoleh konsentrasi  $\text{Mg}^{2+}$  dan  $\text{Ca}^{2+}$  berturut-turut sebesar 12,5 mg  $\text{Mg}^{2+}/\text{L}$  dan 25 mg  $\text{Ca}^{2+}/\text{L}$  di dalam media MHB yang digunakan.

### 3.7.2 Prosedur Penelusuran Senyawa Metabolit Sekunder dari Fungi Endofit Daun Kepundung

#### 1. Isolasi Fungi Endofit dari Daun Kepundung

Sampel daun kepundung yang digunakan dalam penelitian diambil dari Desa Karangpring, Kecamatan Sukorambi, Jember pada bulan Mei 2019. Daun kepundung yang dipilih yang segar dan sehat atau terbebas dari bercak penyakit. Daun tersebut lalu dicuci dengan air mengalir. Kemudian daun tersebut direndam dalam aquabides steril selama 1 menit. Selanjutnya, daun tersebut secara berurutan direndam dalam larutan etanol 70% selama 1 menit,  $\text{NaClO}$  1% selama 3 menit, dan dalam larutan etanol 70% lagi selama 1 menit. Setelah itu, daun tersebut dibilas dengan aquabides steril sebanyak tiga kali. Daun yang telah disterilisasi dihilangkan bagian tepinya lalu dipotong kecil-kecil dan disayat-sayat dengan menggunakan pisau steril. Potongan kecil daun yang telah disayat tersebut selanjutnya diletakkan

secara aseptis pada media *Rose Bengal Chloramphenicol Agar* dalam cawan petri. Proses isolasi ini dikatakan berhasil jika ada fungi yang muncul dan tumbuh di sekitar tempat sayatan pada daun.

Fungi yang tumbuh dari proses isolasi awal dalam satu media *Rose Bengal Chloramphenicol Agar* umumnya ada banyak dan berbeda-beda karakteristiknya sehingga diperlukan proses pemurnian untuk memisahkan masing-masing isolat fungi yang didapat. Isolat fungi tersebut direkultur dengan cara mengambil sedikit bagian tubuh isolat fungi dengan *cork borer* lalu dipindahkan dengan kawat ose secara aseptis ke media PDA dalam cawan petri. Proses rekultur ini diulangi hingga diperoleh isolat fungi endofit yang murni. Isolat fungi dikatakan murni jika dalam setiap satu media kultur hanya ada satu isolat fungi endofit yang tumbuh. Untuk memastikan kemurnian isolat fungi, dilakukan pengamatan karakteristik morfologi fungi tersebut.

## 2. Fermentasi Fungi Endofit

Isolat fungi endofit pada media PDA dicuplik dengan plug pelubang (*cork borer*) sebanyak lima cuplikan lalu dimasukkan ke dalam media PDB dalam labu erlenmeyer. Kemudian media PDB yang mengandung cuplikan fungi tersebut diinkubasi pada suhu ruang dalam *shaker incubator* selama 14 hari dengan kecepatan 125 rpm.

## 3. Ekstraksi Hasil Fermentasi Fungi Endofit

Fungi endofit yang sudah difermentasi selama 14 hari dalam media PDB disaring dan diambil filtratnya. Filtrat tersebut dihitung volumenya lalu ditambah etil asetat sejumlah volume filtrat dan dilakukan ekstraksi dengan metode partisi cair-cair. Campuran filtrat dan ekstrak tersebut dikocok selama 15 menit hingga diperoleh dua lapisan larutan yang tidak saling campur. Langkah ini diulang sebanyak dua kali sehingga didapat perbandingan filtrat : etil asetat = 1:2 dengan menggunakan corong pisah. Setelah dilakukan pengocokan terbentuk 2 fase larutan, larutan yang berada di atas adalah fase etil asetat sedangkan yang berada di bawah adalah fase air. Larutan yang diambil adalah yang terletak di sebelah atas yaitu fase

etil asetat. Fase etil asetat ini kemudian diletakkan di bawah lemari asam dan ditunggu hingga terbentuk ekstrak kering.

### 3.7.3 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit Daun Kepundung dengan Metode Mikrodilusi

#### 1). Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* direkultur secara aseptis di dalam ruang *Laminar Air Flow* (LAF) dengan cara menginokulasikan bakteri uji tersebut pada media MHA yang baru. Proses inokulasi tersebut menggunakan metode goresan. Setelah itu, kultur bakteri uji tersebut diinkubasi di dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

#### 2). Preparasi Suspensi Bakteri Uji

Bakteri uji yang telah direkultur diinokulasikan ke dalam larutan NaCl 0,9% steril dengan menggunakan jarum ose secara aseptis lalu dilakukan homogenisasi dengan vortex agar diperoleh suspensi bakteri yang homogen atau terdispersi merata. Turbiditas atau tingkat kekeruhan suspensi bakteri tersebut diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm. Turbiditas atau tingkat kekeruhan suspensi bakteri tersebut dikatakan sudah memenuhi persyaratan McFarland jika nilai absorbansinya berada dalam rentang 0,08-0,13. Ketika nilai absorbansi suspensi yang dibuat telah masuk dalam rentang tersebut maka diperkirakan jumlah sel bakteri uji di dalam suspensi tersebut sebesar  $1 \times 10^8$  CFU/ml. Selanjutnya, suspensi bakteri tersebut diencerkan 100 kali lipat dengan CAMHB sehingga akan diperoleh jumlah sel bakteri sekitar  $1 \times 10^6$  CFU/ml.

#### 3). Preparasi Larutan Kontrol

Kontrol positif yang digunakan adalah larutan gentamisin konsentrasi 2 µg/ml dalam media CAMHB. Kontrol positif ini dibuat dengan cara mengencerkan larutan injeksi gentamisin 40 mg/ml dengan CAMHB. Kontrol negatif dibuat dengan cara mengencerkan DMSO 100% dengan media CAMHB. DMSO 100%

dipipet sebanyak 10  $\mu$ l lalu ditambah CAMHB sebanyak 990  $\mu$ l sehingga diperoleh DMSO 1%.

#### 4). Preparasi Larutan Uji

Ditimbang ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit sebanyak 1 mg dan dilarutkan dalam DMSO 100% sebanyak 100  $\mu$ l sehingga diperoleh konsentrasi larutan ekstrak sebesar 10.000  $\mu$ g/ml. Kemudian larutan ekstrak tersebut diencerkan dengan CAMHB untuk membuat konsentrasi 100  $\mu$ g/ml dalam DMSO 1%.

#### 5). Uji Antibakteri

Sampel uji antibakteri terdiri dari campuran 50  $\mu$ l suspensi bakteri uji dalam CAMHB dan 50  $\mu$ l masing-masing larutan ekstrak DK1, DK2, DK3 konsentrasi 100  $\mu$ g/ml dengan pelarut DMSO 1% dalam media CAMHB. Kontrol negatif terdiri dari 50  $\mu$ l suspensi bakteri uji dalam media CAMHB dan 50  $\mu$ l DMSO 1% dalam media CAMHB. Kontrol ekstrak terdiri dari 50  $\mu$ l masing-masing larutan ekstrak DK1, DK2, DK3 konsentrasi 100  $\mu$ g/ml dengan pelarut DMSO 1% dalam media CAMHB dan 50  $\mu$ l media CAMHB. Media CAMHB 100  $\mu$ l digunakan sebagai kontrol media. 50  $\mu$ l DMSO 1% dalam media CAMHB dan 50  $\mu$ l media CAMHB digunakan sebagai kontrol DMSO 1%. Kontrol positif yang digunakan terdiri dari 50  $\mu$ l gentamisin konsentrasi 2  $\mu$ g/ml dan 50  $\mu$ l suspensi bakteri dalam media CAMHB. Kontrol gentamisin yang digunakan terdiri dari 50  $\mu$ l gentamisin konsentrasi 2  $\mu$ g/ml dalam media CAMHB dan 50  $\mu$ l media CAMHB. Kontrol negatif gentamisin terdiri dari 50  $\mu$ l DMSO 1% dalam media CAMHB dan 50  $\mu$ l suspensi bakteri uji dalam CAMHB. Kontrol media yang digunakan berupa 100  $\mu$ l media CAMHB. Proses uji ini diulangi sebanyak tiga kali dengan menggunakan *96-well microplate* yang berbeda seperti yang terlihat pada Gambar 3.2.















	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Gambar 3.2 Desain microplate untuk uji antibakteri dengan metode mikrodilusi

Keterangan :

-  = ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit isolat DK1 konsentrasi 100 µg/ml dalam DMSO 1% 50 µl + suspensi bakteri uji dalam CAMHB 50 µl
-  = ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit isolat DK2 konsentrasi 100 µg/ml dalam DMSO 1% 50 µl + suspensi bakteri uji dalam CAMHB 50 µl
-  = ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit isolat DK3 konsentrasi 100 µg/ml dalam DMSO 1% 50 µl + suspensi bakteri uji dalam CAMHB 50 µl
-  = ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit isolat DK1 konsentrasi 100 µg/ml dalam DMSO 1% 50 µl + media CAMHB 50 µl

	= ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit isolat DK2 konsentrasi 100 µg/ml dalam DMSO 1% 50 µl + media CAMHB 50 µl
	= ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit isolat DK3 konsentrasi 100 µg/ml dalam DMSO 1% 50 µl + media CAMHB 50 µl
	= DMSO 1% dalam media CAMHB 50 µl + suspensi bakteri uji dalam CAMHB 50 µl
	= DMSO 1% dalam media CAMHB 50 µl + media CAMHB 50 µl
	= media CAMHB 50 µl + suspensi bakteri dalam CAMHB 50 µl
	= media CAMHB 100 µl
	= gentamisin 2 µg/ml dalam media CAMHB 50 µl + suspensi bakteri uji dalam CAMHB 50 µl
	= gentamisin 2 µg/ml dalam media CAMHB 50 µl + media CAMHB 50 µl

#### 3.7.4 Analisa Data Hasil Penelusuran Aktivitas Antibakteri

Nilai % penghambatan bakteri dari hasil uji mikrodilusi ditetapkan dengan persamaan (1) sebagai berikut :

$$\text{Persen inhibisi pertumbuhan bakteri} = \left[ 1 - \frac{(\text{Abs } U - \text{Abs } Z)}{(\text{Abs } X - \text{Abs } Y)} \right] \times 100\% \quad \dots\dots (1)$$

Keterangan

- Abs : absorbansi  
 U : sampel ekstrak/gentamisin  
 Z : kontrol ekstrak/gentamisin  
 X : kontrol negatif ekstrak /gentamisin  
 Y : kontrol media

Nilai % penghambatan dari masing-masing ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK1, DK2, DK3 pada konsentrasi uji 100 µg/ml dianalisa dengan uji statistik One Way Anova dengan tingkat kepercayaan 95% dan signifikansi  $p < 0,05$ . Uji statistik Kruskall Wallis digunakan sebagai alternatif uji One Way Anova jika data yang didapat tidak homogen dan normal. Uji statistika

ini digunakan untuk mengidentifikasi perbedaan data pada masing-masing kelompok sampel uji.

### 3.7.5 Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit dari Daun Kepundung

Pada penelitian ini dilakukan skrining golongan senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepundung dengan metode KLT. Golongan senyawa yang diidentifikasi antara lain alkaloid, terpenoid, flavonoid dan polifenol. Larutan ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit dengan konsentrasi 5000 µg/ml dalam pelarut etil asetat ditotolkan pada plat KLT sebanyak 20 µl kemudian dieluasi dengan menggunakan eluen yang terdiri dari *n*-heksan : etil asetat = 3 : 1 dengan penambahan 1 tetes asam asetat glasial. Noda yang terbentuk kemudian disemprot dengan reagen pendeteksi sebagai berikut :

1. Reagen Dragendorff untuk mengidentifikasi keberadaan golongan senyawa alkaloid dalam ekstrak. Ekstrak dikatakan mengandung alkaloid jika noda hasil eluasi tersebut menunjukkan warna kuning-jingga setelah disemprot reagen tersebut (Harborne, 1973).
2. Reagen ninhidrin untuk mendeteksi keberadaan senyawa yang mengandung gugus amina seperti asam amino. Ekstrak dikatakan mengandung senyawa yang mengandung gugus amina jika ada noda hasil eluasi yang menunjukkan warna merah atau ungu setelah disemprot reagen tersebut (Harborne, 1973; Wagner dkk., 1984; Spangenberg, 2008).
3. Reagen vanilin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> untuk mengidentifikasi keberadaan golongan senyawa terpenoid dan fenolik dalam ekstrak. Ekstrak dikatakan mengandung golongan senyawa terpenoid, fenolat jika noda hasil eluasi setelah disemprot vanilin-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> secara berturut-turut berwarna ungu dan merah muda (Harborne, 1973; Wagner dkk., 1984)
4. Reagen anisaldehyda-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> untuk mendeteksi keberadaan golongan senyawa terpenoid dan steroid di dalam ekstrak. Ekstrak dikatakan

mengandung senyawa terpenoid atau steroid jika noda hasil eluasi berwarna ungu (Harborne, 1973; Wagner dkk., 1984)

5. Reagen  $\text{FeCl}_3$  untuk mengidentifikasi keberadaan golongan senyawa fenolat atau polifenol. Ekstrak dikatakan mengandung senyawa polifenol jika noda hasil eluasi setelah disemprot berwarna hijau, ungu, biru, atau hitam (Harborne, 1973)
6. Uap amoniak untuk mengidentifikasi keberadaan golongan senyawa flavonoid. Ekstrak dikatakan mengandung flavonoid jika noda hasil eluasi setelah disemprot berwarna kuning (Harborne, 1973).

#### 3.7.6 Skrining KLT-Bioautografi Kontak

Golongan senyawa metabolit yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri fungi endofit daun kepundung dideteksi dengan metode KLT bioautografi kontak. Ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit sebanyak 5000  $\mu\text{g/ml}$  dalam etil asetat ditotolkan pada plat KLT silika gel  $\text{F}_{254}$  dengan volume penotolan sebanyak 20  $\mu\text{l}$  kemudian dieluasi dengan fase gerak yang terdiri dari *n*-heksan : etil asetat dengan perbandingan 3 : 1 dan ditambah 1 tetes asam asetat glasial. Setelah proses eluasi selesai, plat KLT dikeringkan lalu diamati pada sinar UV  $\lambda$  254 nm dan 366 nm. Selanjutnya plat KLT disterilisasi di bawah sinar UV selama 15 menit. Plat KLT tersebut lalu diletakkan selama 60 menit pada media MHA di cawan petri yang telah ditambah dengan 100  $\mu\text{l}$  suspensi *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* sesuai standar McFarland. Setelah itu, plat KLT diambil dan media MHA tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya diamati keberadaan zona bening yang terbentuk di sepanjang bekas penempelan plat KLT (Dewanjee dkk., 2015). Nilai Rf zona bening tersebut kemudian dibandingkan dengan nilai Rf noda yang telah dideteksi dengan reagen semprot pada skrining fitokimia sebelumnya sehingga akan diketahui golongan senyawa yang berperan menimbulkan aktivitas antibakteri pada ekstrak.

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka didapatkan kesimpulan bahwa

1. Ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK1 pada konsentrasi 100 $\mu$ g/ml menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* sebesar  $27,59 \pm 2,25\%$  dan *Pseudomonas aeruginosa* sebesar  $14,81 \pm 2,69\%$ .
2. Ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK2 pada konsentrasi 100  $\mu$ g/ml mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* sebesar  $34,55 \pm 1,61 \%$ , tetapi tidak mampu menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*. Ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK3 pada konsentrasi 100  $\mu$ g/ml menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* sebesar 26,47% dan *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 7,48%. Secara keseluruhan ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepundung (DK1, DK2, DK3) memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar terhadap *Staphylococcus aureus* dibandingkan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK1, DK2, DK3 antara lain fenolat, flavonoid, alkaloid, dan terpenoid.
4. Golongan senyawa metabolit sekunder yang diduga berperan menimbulkan aktivitas antibakteri pada ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK1 adalah flavonoid dan alkaloid. Golongan senyawa metabolit sekunder yang diduga berperan menimbulkan aktivitas antibakteri pada ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK2 dan DK3 adalah flavonoid, alkaloid, dan terpenoid.



## 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepundung. Hal ini mengingat ada beberapa noda hasil eluasi yang tidak terdeteksi dengan reagen  $\text{FeCl}_3$ , vanilin- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , anisaldehyd- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , uap amoniak, Dragendorff, dan ninhidrin padahal keenam reagen ini biasa digunakan untuk mendeteksi golongan senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan. Ini kemungkinan terjadi karena mikroorganisme seperti fungi endofit seringkali memproduksi golongan senyawa metabolit sekunder yang unik dan berbeda dengan golongan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan. Upaya yang bisa dilakukan salah satunya adalah menyemprot noda hasil eluasi tersebut dengan berbagai reagen pendeteksi lain yang sensitif terhadap golongan senyawa metabolit sekunder yang biasa diproduksi oleh fungi endofit.
2. Golongan senyawa flavonoid, terpenoid, dan alkaloid di dalam ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit daun kepundung yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri bisa diisolasi dan ditentukan nilai  $\text{IC}_{50}$ , KHM, dan KBM-nya terhadap kedua bakteri uji dan bakteri patogen yang lain.
3. Perlu dilakukan uji aktivitas ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit ini terhadap fungi patogen, sel kanker dan senyawa radikal bebas untuk mengetahui apakah ekstrak ini memiliki aktivitas antifungi, antikanker/sitotoksik dan antioksidan. Hal ini mengingat sebagian besar senyawa metabolit sekunder yang diproduksi oleh fungi endofit banyak dilaporkan memiliki bioaktivitas yang potensial berdasarkan hasil tinjauan literatur.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, E. P. 1987. Cephalosporins 1945-1986. *Drugs*. 34(Supplement 2):1–14.
- ACS. 2019. Discovery and Development of Penicillin. <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html> [Diakses pada May 29, 2019].
- Ali, S., S. T. Asma, S. F. Nadeem, dan M. Samar. 2018. Strategies and kinetics of industrial fermentation for the mass production of various primary and secondary metabolites from microbes. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*. 5(6):595–606.
- Aprilianti, P., R. Lestari, dan W. U. Putri. 2009. Potensi *Baccaurea* Sp.: Studi Kasus Di Kebun Raya Bogor. *Konservasi Flora Indonesia Dalam Mengatasi Dampak Pemanasan Global*. 2009. LIPI: 534–541.
- Arnold, A. E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi : progress , challenges , and frontiers. *Fungal Biology Reviews*. 21:51–66.
- Arnold, A. E. dan F. Lutzoni. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes : are tropical leaves biodiversity hotspots ? *Ecology*. 88(3):541–549.
- Balouiri, M., M. Sadiki, dan S. K. Ibsouda. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2):71–79.
- Barrios-gonzalez, J. dan A. Mejia. 1996. Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. *Biotechnology Annual Review*. 2:85–121.
- Bernier, S. P., D.-G. Ha, W. Khan, J. H. Merritt, dan G. A. O’Toole. 2011. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling. *Res.Microbio*. 162(7):1–14.
- Bishwabidyalay, G. dan S. Nahar. 2016. Partial purification and characterization of alkaline protease enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* for tannery in Bangladesh. *Asian-Australasian Journal of Bioscience and Biotechnology*. 1(2):221–229.
- Blair, L. M., M. B. Calvert, dan J. Sperry. 2017. *Flavoalkaloids-Isolation , Biological Activity , and Total Synthesis*. Elsevier Ltd. *The Alkaloids*.
- Brown, E. D. dan G. D. Wright. 2016. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*. (529):3366–343.

- Bullerman, L. B. 2003. *Spoilage Fungi In Food*. Dalam Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Editor L. Trugo dan P. M.Finglas. Maryland,USA: Academic Press.
- Butler, M. S. dan A. D. Buss. 2006. Natural products — the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology*. 71:919–929.
- Castillo, U. F., G. A. Strobel, E. J. Ford, W. M. Hess, H. Porter, J. B. Jensen, H. Albert, R. Robison, M. A. M. Condrón, D. B. Teplow, D. Stevens, dan D. Yaver. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology*. 148:2675–2685.
- Choma, I. dan W. Jesionek. 2015. TLC-direct bioautography as a high throughput method for detection of antimicrobials in plants. *Chromatography*. 2(2):225–238.
- Choma, I. M. dan E. M. Grzelak. 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1218(19):2684–2691.
- CLSI. 2012a. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition*. Edisi M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. 2012b. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*. Edisi M100-S22. Wayne, PA 19087 USA: CLSI. 3.
- Costa, S. S., M. Viveiros, L. Amaral, dan I. Couto. 2013. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. *The Open Microbiology Journal*. 7(Suppl 1-M5):59–71.
- Cragg, G. M. dan D. J. Newman. 2014. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica Biophysica Acta*. 1830(6):3670–3695.
- Deacon, J. 2006. *The Diversity of Fungi and Fungus-like Organisms*. Dalam The Diversity of Fungi and Fungus-like Organism. Garsington Road, Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.
- De Souza, J. J., I. J. C. Vieira, E. Rodrigues-Filho, dan R. Braz-Filho. 2011. Terpenoids from endophytic fungi. *Molecules*. 16(12):10604–10618.
- Demain, A. L. 2014. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 41:185–201.
- Dewanjee, S., M. Gangopadhyay, N. Bhattacharya, R. Khanra, dan T. K. Dua. 2015. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of*

*Pharmaceutical Analysis*. 5(2):75–84.

Dipiro, J. T., R. L. Talbert, G. C. Yee, G. R. Matzke, B. G. Wells, dan L. M. Posey. 2017. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. Edisi 10. New York: McGrawHill Education.

Driscoll, J. A., S. L. Brody, dan M. H. Kollef. 2007. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*. 67(3):351–368.

Fernandez, F. J. dan A. Tomasini. 2003. Microbial secondary metabolites production and strain improvement. *Indian Journal of Biotechnology*. 2:322–333.

Finn, R. K. 1954. Agitation-aeration in the laboratory and industry. *Bacteriology Reviews*. 18(4):254–274.

Foster, T. J. 2017. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. current status and future prospects. *FEMS Microbiology Reviews*. 41(3):430–449.

Foster, T. J. dan J. A. Geoghegan. 2015. *Staphylococcus aureus*. Elsevier Ltd. *Molecular Medical Microbiology, Three-Volume Set*.

Galappathie, S., E. A. Palombo, T. C. Yeo, D. L. S. Ley, C. L. Tu, F. M. Malherbe, dan P. J. Mahon. 2014. Comparative antimicrobial activity of South East Asian plants used in bornean folkloric medicine. *Journal of Herbal Medicine*. 4(2):96–105.

Glazer, A. N. dan H. Nikaido. 2007. *Microbial Biotechnology Fundamental of Applied Microbiology*. Edisi 2. United Kingdom: Cambridge University Press.

Gonzaga, L. L., L. E. O. Costa, T. T. Santos, E. F. Araújo, dan M. V. Queiroz. 2015. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. *Journal of Applied Microbiology*. 118(2):485–496.

González-Teuber, M., C. Vilo, dan L. Bascuñán-Godoy. 2017. Molecular characterization of endophytic fungi associated with the roots of *Chenopodium quinoa* inhabiting the Atacama desert, Chile. *Genomics Data*. 11:109–112.

Gouda, S., G. Das, S. K. Sen, H. S. Shin, dan J. K. Patra. 2016. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in Microbiology*. 7(SEP):1–8.

Gunawan, T. Chikmawati, dan Sulistijorini. 2016. Review: fitokimia genus *Baccaurea* sp. *Bioeksperimen: Jurnal Penelitian Biologi*. 2(2):96–110.



- Haapalainen, M., J. Mattinen, dan M. C. Metzler. 2000. The growth of a plant-parasitic bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, is enhanced by xylem fluid components. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 56(4):147–155.
- Harborne, J. B. 1973. *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Edisi 2. London: Chapman and Hall.
- Hata, K., R. Atari, dan K. Sone. 2002. Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and their within-leaf distributions. *Mycoscience*. 43:369–373.
- Hee-Soo Park dan J.-H. Yu. 2016. *Molecular Biology of Asexual Sporulation in Filamentous Fungi*. Dalam *Biochemistry and Molecular Biology*. Switzerland: Springer International Publishing.
- Hellwig, V., T. Grothe, A. Mayer-Bartschmid, R. Endermann, F. U. Geschke, T. Henkel, dan M. Stadler. 2002. Altersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. *Journal of Antibiotics*. 55(10):881–892.
- Horn, W. S., M. S. J. Simmonds, R. E. Schwartz, dan W. M. Blaney. 1995. *Phomopsichalasin*, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron*. 51(14):3969–3978.
- Houck, M. M. dan J. A. Siegel. 2015. *Separation Methods : Liquid-Liquid Extraction*. Dalam *Fundamental of Forensic Science*. Elsevier.
- Houghton, P. J., M. Waksmundzka-Hajnos, A. Petruczynik, T. Mroczek, dan J. Flieger. 2008. *Secondary Metabolite-Amino Acid Derivative*. Dalam *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Editor M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, dan T. Kowalska. New York: CRC Press.
- Huang, Q., H. An, H. Song, H. Mao, W. Shen, dan J. Dong. 2015. Diversity and biotransformative potential of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Kadsura angustifolia*. *Research in Microbiology*. 166(1):45–55.
- Hudzicki, J. 2009. *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. American Society for Microbiology (ASM)
- ITIS Organization. 2019. *Baccaurea racemosa* (Reinw.) Muell. Arg. <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt#null> [Diakses pada May 15, 2019].
- Jones, R. N. 2010. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. 51(Suppl 1):81–87.



- Ju, Y., J. N. Sacalis, dan C. C. Still. 1998. Bioactive flavonoids from endophyte-infected blue grass (*Poa ampla*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(9):3785–3788.
- Jumahwi. 2019. Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun kepundung (*Baccaurea racemosa* (Reinw.) Muell. Arg) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Universitas Jember.
- Kajikawa, H., M. Mitsumori, dan S. Ohmomo. 2002. Stimulatory and inhibitory effects of protein amino acids on growth rate and efficiency of mixed ruminal bacteria. *Journal of Dairy Science*. 85(8):2015–2022.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2018. Hasil Riskesdas. [www.litbang.kemkes.go.id](http://www.litbang.kemkes.go.id). [Diakses pada November 24, 2018].
- Kim, S., D. S. Shin, T. Lee, dan K. B. Oh. 2004. Periconicins, two new fusicoccane diterpenes produced by an endophytic fungus *Periconia* sp. with antibacterial activity. *Journal of Natural Products*. 67(3):448–450.
- Klancnik, A., B. Jer, dan S. Smole. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 81:121–126.
- Koch, A., S. Basar, dan R. Richter. 2008. *Secondary Metabolites-Isoprenoids TLC of Mono- and Sesquiterpenes*. Dalam *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Editor M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, dan T. Kowalska. New York: CRC Press.
- Kusari, S., C. Hertweck, dan M. Spiteller. 2012. Perspective chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology*. 19(7):792–798.
- Kusari, S., J. Košuth, E. Čellárová, dan M. Spiteller. 2011. Survival-strategies of endophytic *Fusarium solani* against indigenous camptothecin biosynthesis. *Fungal Ecology*. 4(3):219–223.
- Lim, T. K. 2012. *Baccaurea racemosa*. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. 4:243–2447.
- Martinez-klimova, E., K. Rodríguez-peña, dan S. Sánchez. 2017. Endophytes as sources of antibiotics. *Biochemical Pharmacology*. 134:1–17.
- Mousa, W. K. dan M. N. Raizada. 2013. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. *Frontiers in Microbiology*. 4(65):1–18.

- Newman, D. J. dan G. M. Cragg. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*. 70(3):461–477.
- Nisa, H., A. N. Kamili, I. A. Nawchoo, S. Shafi, N. Shameem, dan S. A. Bandh. 2015. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. *Microbial Pathogenesis*. 82:50–59.
- Nugraha, A. S. dan P. A. Keller. 2011. Revealing indigenous Indonesian traditional medicine: anti-infective agents. *Natural Product Communications*. 6(12):1953–1966.
- Osiewacz, H. D. 2002. *Molecular Biology of Fungal Development*. New York: Taylor & Francis.
- Oxoid. 2019. Rose Bengal Chloramphenicol Agar. [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0549&cat=&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0549&cat=&c=UK&lang=EN) [Diakses pada February 9, 2020].
- Oxoid. 2020a. Potato Dextrose Broth (Oxoid). [www.oxoid.com](http://www.oxoid.com) [Diakses pada January 14, 2020].
- Oxoid. 2020b. Potato Dextrose Agar. [www.oxoid.com](http://www.oxoid.com) [Diakses pada January 14, 2020].
- Pan, Z. H., D. S. Ning, S. S. Huang, Y. F. Wu, T. Ding, dan L. Luo. 2015. A new picrotoxane sesquiterpene from the berries of *Baccaurea ramiflora* with antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Natural Product Research*. 29(14):1323–1327.
- Patil, R. H., M. P. Patil, dan V. L. Maheshwari. 2016. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi: a review of biotechnological production and their potential applications. *Studies in Natural Products Chemistry*. 49(December):189–205.
- Peacock, S. J. dan G. K. Paterson. 2015. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry*. 84:577–601.
- Pepper, I. L. dan T. J. Gentry. 2015. *Earth Environments*. Dalam *Environmental Microbiology: Third Edition*. Elsevier Inc.
- Planet, P. J. 2018. *Pseudomonas aeruginosa*. Dalam *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. Elsevier Inc.
- Poole, K., L. D. Hazlett, W. State, dan E. P. Greenberg. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*. 2(65):1–13.

- Poonam, S. nee' N. 2009. *Production of Bioactive Secondary Metabolites*. Dalam *Biotechnology for Agro-Industrial Residue Utilisation*. Springer Dordrecht.
- Reygaert, W. C. 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*. 4(3):482–501.
- Sanchini, A. 2007. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*. 2(3):323–334.
- Sasaki, G. L., L. M. de Souza, T. R. Cipriani, dan M. Iacomini. 2008. *TLC of Carbohydrate*. Dalam *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Editor M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, dan T. Kowalska. London: CRC Press.
- Schulz, B., C. Boyle, S. Draeger, A. Ro, dan K. Krohn. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* 106(9):996–1004.
- Sherma, J. 2009. *Detection of TLC Zones*. Dalam *Encyclopedia of Chromatography*, Third Edition. London: CRC Press.
- Siek, T. J. 1978. Effective use of organic solvents to remove drugs from biologic specimens. *Clinical Toxicology*. 13(2):205–230.
- Singh, C. P., M. Mathur, H. Dadhich, dan S. Ganguly. 2018. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* of camel ( *Camelus dromedarius* ) skin origin. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7(1):3486–3490.
- Singh, S. B. dan J. F. Barrett. 2006. Empirical antibacterial drug discovery — foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology*. 71:1006–1015.
- Spangenberg, B. 2008. *Derivatization, Detection (Quantification), and Identification of Compounds Online*. Dalam *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Editor M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, dan T. Kowalska. London: CRC Press.
- Stanbury, P. F., A. Whitaker, dan S. J. Hall. 1995. *Principles of Fermentation Technology*. Edisi 2. Amsterdam: Butterworth Heinemann.
- Stefani, S., D. Ryeon, J. A. Lindsay, A. W. Friedrich, A. M. Kearns, H. Westh, dan F. M. Mackenzie. 2012. International journal of antimicrobial agents methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ( MRSA ): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 39(4):273–282.
- Stierle, A., G. Strobel, dan D. Stierle. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* , an endophytic fungus of pacific yew. *Science*. 260(5105):214–216.

- Strobel, G. dan B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(4):491–502.
- Strobel, G., B. Daisy, U. Castillo, dan J. Harper. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. 67:257–268.
- Strobel, G., J. Li, F. Sugawara, H. Koshino, J. Harper, dan W. M. Hess. 1999. Oocydin a , a chlorinated macrocyclic lactone with potent anti-oomycete activity from *Serratia marcescens*. *Microbiology*. 145(12):3557–3564.
- Strobel, G., A. Stierle, D. Stierle, dan W. M. Hess. 1993. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with pacific yew (*Taxus brevifolia*). *Mycotaxon*. 47:pp.71-80.
- Sun, X. dan L. Guo. 2012. Endophytic fungal diversity : review of traditional and molecular techniques. *Mycology An International Journal on Fungal Biology*. 3(1):65–76.
- Tejesvi, M. V, D. R. Segura, K. M. Schnorr, D. Sandvang, S. Mattila, P. B. Olsen, S. Neve, T. Kruse, dan H. H. Kristensen. 2013. An antimicrobial peptide from endophytic *Fusarium tricinctum* of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Diversity*. 60:153–159.
- Tong, S. Y. C., J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, dan V. G. Fowler. 2015. *Staphylococcus aureus* infections : epidemiology , pathophysiology , clinical manifestations , and management. *Clinical Microbiology Reviews*. 28(3):603–661.
- Vasundhara, M., M. S. Reddy, dan A. Kumar. 2019. *Secondary Metabolites From Endophytic Fungi and Their Biological Activities*. Elsevier B.V. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*.
- Verma, V. C., R. N. Kharwar, dan G. A. Strobel. 2009. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. *Natural Product Communications*. 4(11):1511–1532.
- Vincent, J., J. Marshall, A. Anzueto, C. D. Martin, dan C. Gomersall. 2009. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 302(21):2323–2329.
- Wagner, H., S. Bladt, dan E. M. Zgainski. 1984. *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. Edisi 1. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- WHO. 2017. WHO Priority Pathogen List for R&D of New Antibiotics
- WHO. 2018. The Top 10 Causes of Death



- Widodo, H., S. Sisindari, W. Asmara, dan A. Rohman. 2019. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of selected medicinal plants used for liver diseases and its classification with chemometrics. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 9(6):99–105.
- Wohlleben, W., Y. Mast, E. Stegmann, dan N. Ziemert. 2016. Antibiotic drug discovery. *Microbial Biotechnology*. 9:541–548.
- Wójciak-Kosior, M. dan A. Oniszczyk. 2008. *Sample Preparation and TLC Analysis of Phenolic Acids*. Dalam *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Editor M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, dan T. Kowalska. London: CRC Press.
- Wu, F., D. Yang, L. Zhang, Y. Chen, X. Hu, L. Li, dan J. Liang. 2019. Diversity estimation and antimicrobial activity of culturable endophytic fungi from *Litsea cubeba* (lour.) pers. in china. *Forests*. 10(1):1–12.
- Wu, W., Y. Jin, F. Bai, dan S. Jin. 2015. *Pseudomonas aeruginosa*. Edisi 2. Elsevier Ltd. *Molecular Medical Microbiology*.
- Xie, Y., W. Yang, F. Tang, X. Chen, dan L. Ren. 2014. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*. 22(1):132–149.
- Yang, Y., Z. Jin, Q. Jin, dan M. Dong. 2015. Isolation and fatty acid analysis of lipid-producing endophytic fungi from wild chinese *Torreya grandis*. *Microbiology (Russian Federation)*. 84(5):710–716.
- Zhang, H. W., Y. C. Song, dan R. X. Tan. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*. 23(5):753–771.
- Zhang, J., D. Liu, H. Wang, dan T. Liu. 2014. Fusartricin , a sesquiterpenoid ether produced by an endophytic fungus *Fusarium tricinctum* Salicorn 19. *European Food Research and Technology*. 240(4):805–814.
- Zheng, Y., X. Qiao, C. Miao, K. Liu, dan Y. Chen. 2015. Diversity , distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Ann Microbiol*. 66(2):529–542.



**LAMPIRAN****Lampiran 1 Hasil Determinasi Daun Kepundung**

Kode Dokumen : FR-AUK-064
Revisi : 0



**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI**  
**POLITEKNIK NEGERI JEMBER**  
**LABORATORIUM TANAMAN**  
Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531  
E-mail : [Polije@polije.ac.id](mailto:Polije@polije.ac.id) Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

---

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN**

No: 64/PL17.3.1.02/LL/2018

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Farmasi Universitas Jember No: 3065/UN25.13/LL/2018 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Jumahwi  
NIM : 152210101041  
Jur/Fak/PT : Fakultas Farmasi/ Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:  
*Kingdom/Regnum: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Euphorbiales; Famili: Euphorbiaceae; Genus: Baccaurea; Spesies: Baccaurea racemosa, Muell.Arg.*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 11 Desember 2018

Kepala Laboratorium Tanaman



Lilik Mastuti, MP  
NIP. 195808201987032001

## Lampiran 2 Perhitungan Preparasi Media CAMHB, Ekstrak Uji, Kontrol Positif, dan Suspensi Bakteri Uji

### 1. Preparasi Media CAMHB

Penimbangan media MHB = 1,68 g

Volume Media = 80 ml

#### 1) Perhitungan penambahan $Mg^{2+}$ ke dalam media MHB

Untuk membuat konsentrasi induk  $Mg^{2+}$  sebesar 10 mg/ml dalam volume 10 ml maka massa  $Mg^{2+}$  yang dibutuhkan = 100 mg

Ar  $Mg^{2+}$  = 24,305

Mr  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  = 203,303

Jumlah  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  yang harus ditimbang agar diperoleh  $Mg^{2+}$  100 mg =

$$\frac{203,303}{24,305} \times 100 \text{ mg} = 836,466 \text{ mg}$$

Jadi 836,466 mg  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  dilarutkan dalam 10 ml aqua demineralata sehingga diperoleh konsentrasi 10 mg  $Mg^{2+}$ /ml

Menurut CLSI, jumlah  $Mg^{2+}$  yang harus ditambahkan ke media = 10 - 12,5 mg  $Mg^{2+}$ /L maka ke dalam media MHB 80 ml dipipet larutan induk  $Mg^{2+}$  10 mg/ml sebanyak 0,08 - 0,1 ml

$$\frac{0,08-0,1 \text{ ml}}{80 \text{ ml}} \times 10 \text{ mg } Mg^{2+}/ml = 0,01- 0,0125 \text{ mg } Mg^{2+}/ml = 10 - 12,5 \text{ mg } Mg^{2+}/L$$

$$\frac{0,09 \text{ ml}}{80 \text{ ml}} \times 10 \text{ mg } Mg^{2+}/ml = 0,01125 \text{ mg } Mg^{2+}/ml = 11,25 \text{ mg } Mg^{2+}/L$$

Dipipet 0,09 ml = 90 ml larutan  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  ke dalam 80 ml media MHB

#### 2) Perhitungan penambahan $Ca^{2+}$ ke dalam media MHB

Untuk membuat konsentrasi induk  $Ca^{2+}$  sebesar 10 mg/ml dalam volume 10 ml maka massa  $Ca^{2+}$  yang dibutuhkan = 100 mg

Ar  $Ca^{2+}$  = 40,078

Mr  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  = 147,01

Jumlah  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  yang harus ditimbang agar diperoleh  $\text{Ca}^{2+}$  100 mg =

$$\frac{147,01}{40,078} \times 100 \text{ mg} = 366,809 \text{ mg}$$

Jadi ditimbang  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  sebesar 366,809 mg dan dilarutkan dalam 10 ml aqua demineralata sehingga diperoleh konsentrasi larutan induk 10 mg  $\text{Ca}^{2+}$ /ml. Menurut CLSI, jumlah  $\text{Ca}^{2+}$  yang harus ditambahkan ke media sebesar 20-25 mg  $\text{Ca}^{2+}$ /L maka dipipet 80 ml larutan induk  $\text{Ca}^{2+}$  10 mg/ml sebanyak 0,16 – 0,2 ml lalu dimasukkan ke dalam media MHB 80 ml

$$\frac{0,16-0,2 \text{ ml}}{80 \text{ ml}} \times 10 \text{ mg } \text{Ca}^{2+}/\text{ml} = 0,02 - 0,025 \text{ mg } \text{Ca}^{2+}/\text{ml} = 20 - 25 \text{ mg } \text{Ca}^{2+}/\text{L}$$

$$\frac{0,18 \text{ ml}}{80 \text{ ml}} \times 10 \text{ mg } \text{Ca}^{2+}/\text{ml} = 0,0225 \text{ mg } \text{Ca}^{2+}/\text{ml} = 22,5 \text{ mg } \text{Ca}^{2+}/\text{L}$$

Dipipet 0,18 ml = 180  $\mu\text{l}$  larutan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dan dimasukkan ke dalam media MHB yang jumlahnya 80 ml

## 2. Preparasi Ekstrak Uji Hasil Fermentasi Fungi Endofit Daun Kepundung

### 1. Preparasi Larutan Induk Ekstrak

Ditimbang 1 mg ekstrak lalu dilarutkan dalam DMSO 100%

$$\frac{1 \text{ mg ekstrak}}{100 \mu\text{l DMSO } 100\%} \times \frac{1000 \mu\text{g}}{1 \text{ mg}} \times \frac{1 \mu\text{l}}{0,001 \text{ ml}} = 10.000 \mu\text{g/ml}$$

### 2. Pengenceran larutan induk dengan CAMHB

Konsentrasi Awal ( $\mu\text{g/ml}$ )	Volume larutan induk yang diambil ( $\mu\text{l}$ )	Volume CAMHB yang ditambahkan ( $\mu\text{l}$ )	Konsentrasi Akhir ( $\mu\text{g/ml}$ )
10.000	30	2970	100

### 3. Preparasi Kontrol Positif (Gentamisin)

Konsentrasi gentamisin sulfat = 40 mg/ml = 40.000 µg/ml

BM gentamisin = 477,596 g/mol

BM gentamisin sulfat = 575,675 g/mol

Konsentrasi gentamisin =  $\frac{477,596 \text{ g/mol}}{575,675 \text{ g/mol}} \times 40.000 \text{ µg/ml} = 33185,113 \text{ µg/ml}$

#### 1. Pembuatan larutan induk gentamisin konsentrasi 200 µg/ml

Konsentrasi Awal (µg/ml)	Volume larutan induk yang diambil (µl)	Volume CAMHB yang ditambahkan (µl)	Konsentrasi Akhir (µg/ml)
33185,113	25	4123	200

#### 2. Pengenceran larutan induk gentamisin dengan media CAMHB

Konsentrasi Awal (µg/ml)	Volume larutan induk yang diambil (µl)	Volume CAMHB yang ditambahkan (µl)	Konsentrasi Akhir (µg/ml)
200	25	2475	2

### 4. Preparasi Suspensi Bakteri

Persyaratan absorbansi berdasarkan standar Mc Farland  $\lambda$  625 nm = 0,08 - 0,13

Pada rentang tersebut jumlah koloni bakteri =  $\pm 1 \times 10^8$  CFU/ml

Absorbansi *Staphylococcus aureus* dalam NaCl 0,9% pada  $\lambda$  625 nm = 0,095

Absorbansi *Pseudomonas aeruginosa* dalam NaCl 0,9% pada  $\lambda$  625 nm = 0,093

Pengenceran konsentrasi suspensi bakteri dengan CAMHB

Konsentrasi Awal (CFU/ml)	Volume larutan induk yang diambil (µl)	Volume CAMHB yang ditambahkan (µl)	Konsentrasi Akhir (CFU/ml)
$10^8$	50	4950	$10^6$





**4) Data absorbansi gentamisin**

Abs	Gentamisin + CAMHB			Gentamisin + <i>Staphylococcus aureus</i>			Gentamisin + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
	0,071	0,073	0,070	0,151	0,151	0,150	0,076	0,076	0,075
Rerata	0,071			0,151			0,076		
Abs									

**5) Data absorbansi DMSO 1%**

Abs	DMSO 1% + CAMHB		DMSO 1% + <i>Staphylococcus aureus</i>		DMSO 1% + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
	0,070	0,070	0,578	0,653	1,135	1,143
Rerata	0,070		0,697		1,139	
Abs						

**6) Data absorbansi CAMHB**

Abs	CAMHB		CAMHB + <i>Staphylococcus aureus</i>		CAMHB + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
	0,086	0,086	0,739	0,669	1,134	1,154
Rerata	0,086		0,704		1,144	
Abs						

**7) Persentase penghambatan bakteri uji oleh ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat DK1**

1) %penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* (replikasi 1)

$$= \left[ 1 - \frac{(0,518-0,066)}{(0,697-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,452}{0,627} \right) \right] \times 100\% = 27,91 \%$$

2) %penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* (replikasi 2)

$$= \left[ 1 - \frac{(0,537-0,068)}{(0,697-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,469}{0,627} \right) \right] \times 100\% = 25,19 \%$$

3) %penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* (replikasi 3)

$$= \left[ 1 - \frac{(0,512-0,071)}{(0,697-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,441}{0,627} \right) \right] \times 100\% = 29,66 \%$$

4) %penghambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,967-0,066)}{(1,139-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,901}{1,069} \right) \right] \times 100\% = 15,72 \%$$

5) %penghambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

$$= \left[ 1 - \frac{(1,011-0,068)}{(1,139-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,943}{1,069} \right) \right] \times 100\% = 11,78 \%$$

6) %penghambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,959-0,071)}{(1,139-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,888}{1,069} \right) \right] \times 100\% = 16,93 \%$$

**8) Persentase penghambatan bakteri uji oleh ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat DK2**

1) %penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,493-0,088)}{(0,697-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,405}{0,627} \right) \right] \times 100\% = 35,41 \%$$

2) %penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,508-0,086)}{(0,697-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,422}{0,627} \right) \right] \times 100\% = 32,69 \%$$

3) %penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,491-0,087)}{(0,697-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,404}{0,627} \right) \right] \times 100\% = 35,56 \%$$

4) %penghambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

$$= \left[ 1 - \frac{(1,205-0,066)}{(1,139-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{1,139}{1,069} \right) \right] \times 100\% = - 6,55 \%$$

5) %penghambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

$$= \left[ 1 - \frac{(1,199-0,068)}{(1,139-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{1,131}{1,069} \right) \right] \times 100\% = - 5,79 \%$$

6) %penghambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

$$= \left[ 1 - \frac{(1,203-0,071)}{(1,139-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{1,132}{1,069} \right) \right] \times 100\% = - 5,89 \%$$

**9) Persentase penghambatan bakteri uji oleh ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat DK3**

1) %penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,546-0,092)}{(0,697-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,454}{0,627} \right) \right] \times 100\% = 27,59 \%$$

2) %penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,560-0,090)}{(0,697-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,470}{0,627} \right) \right] \times 100\% = 25,04 \%$$

3) %penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,546-0,087)}{(0,697-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,459}{0,627} \right) \right] \times 100\% = 26,79 \%$$

4) %penghambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

$$= \left[ 1 - \frac{(1,078-0,092)}{(1,139-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,986}{1,069} \right) \right] \times 100\% = 7,76 \%$$

5) %penghambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

$$= \left[ 1 - \frac{(1,081-0,090)}{(1,139-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,991}{1,069} \right) \right] \times 100\% = 7,29 \%$$

6) %penghambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

$$= \left[ 1 - \frac{(1,077-0,087)}{(1,139-0,070)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,990}{1,069} \right) \right] \times 100\% = 7,39 \%$$

### 10) Data Persen Penghambatan Bakteri Uji oleh Ekstrak Hasil Fermentasi Fungi Endofit

	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	DK1	DK2	DK3	DK1	DK2	DK3
	27,91	35,41	27,59	15,72	-6,55	7,76
	25,19	32,69	25,04	11,78	-5,79	7,29
	29,66	35,56	26,79	16,93	-5,89	7,39
<b>Rata-rata</b>	27,58667	34,55333	26,47333	14,81	-6,07667	7,48
<b>SD</b>	2,252473	1,615436	1,30416	2,692898	0,412957	0,247588
<b>CV</b>	8,17%	4,68%	4,93%	18,18%	6,79%	3,31%

### 11) Persentase penghambatan bakteri uji oleh gentamisin

1) %penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,151-0,071)}{(0,704-0,086)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,08}{0,618} \right) \right] \times 100\% = 87,05 \%$$

2) %penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,151-0,073)}{(0,704-0,086)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,078}{0,618} \right) \right] \times 100\% = 87,37 \%$$

3) %penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,150-0,070)}{(0,704-0,086)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,08}{0,618} \right) \right] \times 100\% = 87,05 \%$$

Rata-rata %penghambatan gentamisin = 87,156 %

Simpangan deviasi (SD) = 0,184 %

CV = 0,211%

4) %penghambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,076-0,071)}{(1,144-0,086)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,005}{1,058} \right) \right] \times 100\% = 107,088 \% = 99,53 \%$$

5) %penghambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,076-0,073)}{(1,144-0,086)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,003}{1,058} \right) \right] \times 100\% = 107,088 \% = 99,71 \%$$

6) %penghambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,075-0,070)}{(1,144-0,086)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,005}{1,058} \right) \right] \times 100\% = 107,088 \% = 99,53 \%$$

Rata-rata % penghambatan gentamisin = 99,59 %

SD = 0,103 %

CV = 0,001 %

## 12) Persentase penghambatan bakteri uji oleh DMSO 1%

1) %penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus*

$$= \left[ 1 - \frac{(0,697-0,070)}{(0,704-0,086)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{0,627}{0,618} \right) \right] \times 100\% = - 1,45 \%$$

2) %penghambatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

$$= \left[ 1 - \frac{(1,139-0,070)}{(1,144-0,086)} \right] \times 100\% = \left[ 1 - \left( \frac{1,069}{1,058} \right) \right] \times 100\% = - 1,04 \%$$



## Lampiran 4 Hasil Analisa Statistik

### 1. Hasil tes normalitas data

Tests of Normality		
	Fungi	Shapiro-Wilk <sup>a</sup>
		Sig.
Penghambatan_ <i>S.aureus</i>	DK1	,762
	DK2	,089
	DK3	,595
Penghambatan_ <i>P.aeruginosa</i>	DK1	,433
	DK2	,232
	DK3	,388

a. Lilliefors Significance Correction

### 2. Hasil tes homogenitas data

Test of Homogeneity of Variances				
	Levene			
	Statistic	df1	df2	Sig.
Penghambatan_ <i>S.aureus</i>	,498	2	6	,631
Penghambatan_ <i>P.aeruginosa</i>	8,115	2	6	,020

Keterangan = variasi data penghambatan terhadap *S.aureus* bersifat homogen ( $p > 0,05$ )  
 variasi data penghambatan terhadap *P.aeruginosa* tidak homogen ( $p < 0,05$ )

Kesimpulan = analisa data persen penghambatan terhadap *S.aureus* dapat dilakukan secara parametrik dengan menggunakan uji One Way Anova sedangkan analisa data persen penghambatan terhadap *P.aeruginosa* tidak bisa dilakukan secara parametrik tetapi secara non parametrik dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis

3. Rata-rata % penghambatan terhadap *S.aureus* dan *P.aeruginosa***Descriptives**

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
Penghambatan_ <i>S.aureus</i>	DK1	3	27,5867	2,25247	1,30047
	DK2	3	34,5533	1,61544	,93267
	DK3	3	26,4733	1,30416	,75296
	Total	9	29,5378	4,09006	1,36335
Penghambatan_ <i>P.aeruginosa</i>	DK1	3	14,8100	2,69290	1,55475
	DK2	3	-6,0767	,41296	,23842
	DK3	3	7,4800	,24759	,14295
	Total	9	5,4044	9,27855	3,09285

4. Analisa % penghambatan *S.aureus* dengan One Way Anova**ANOVA**Penghambatan\_*S.aureus*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	115,060	2	57,530	18,392	,003
Within Groups	18,768	6	3,128		
Total	133,829	8			

5. Analisa LSD %penghambatan terhadap *S.aureus*

## Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Penghambatan\_S.aureus

LSD

(I) Fungi	(J) Fungi	Mean Difference			95% Confidence Interval	
		(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
DK1	DK2	-6,96667*	1,44408	,003	-10,5002	-3,4331
	DK3	1,11333	1,44408	,470	-2,4202	4,6469
DK2	DK1	6,96667*	1,44408	,003	3,4331	10,5002
	DK3	8,08000*	1,44408	,001	4,5465	11,6135
DK3	DK1	-1,11333	1,44408	,470	-4,6469	2,4202
	DK2	-8,08000*	1,44408	,001	-11,6135	-4,5465

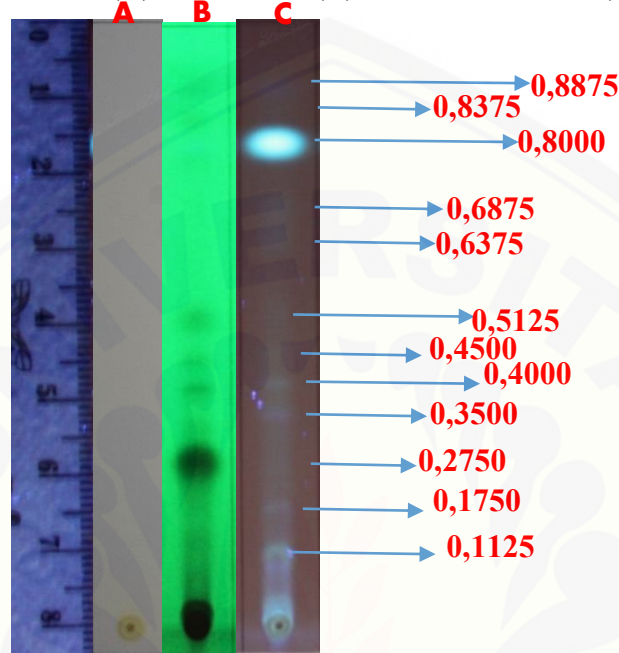
\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

6. Analisa %penghambatan terhadap *P.aeruginosa* dengan Kruskal-WallisTest Statistics<sup>a,b</sup>

Penghambatan_ P.aeruginosa		a. Kruskal Wallis Test
Chi-Square	7,200	b. Grouping Variable: Fungi
df	2	
Asymp. Sig.	,027	

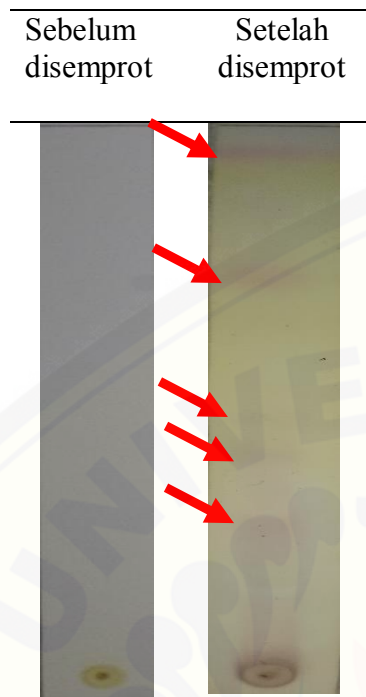
**Lampiran 5 Hasil Skrining Fitokimia**

- Hasil skrining fitokimia ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK1  
 Hasil eluasi dengan *n*-heksan : etil asetat = 3 : 1 + 1 tetes asam asetat glasial  
 diamati di bawah (A) sinar biasa, (B) sinar UV 254 nm, (C) sinar UV 365 nm

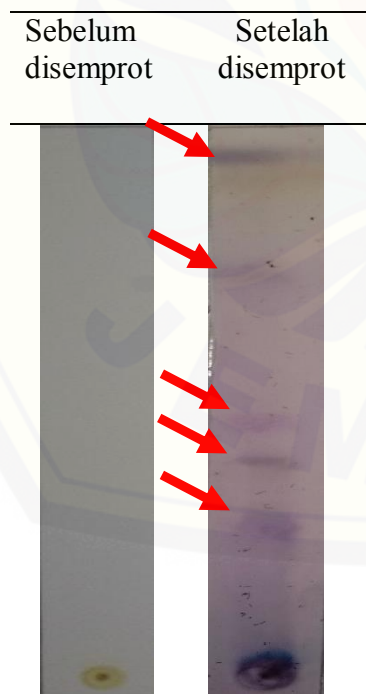


- Hasil deteksi dengan  $\text{FeCl}_3$  (+ fenolat)



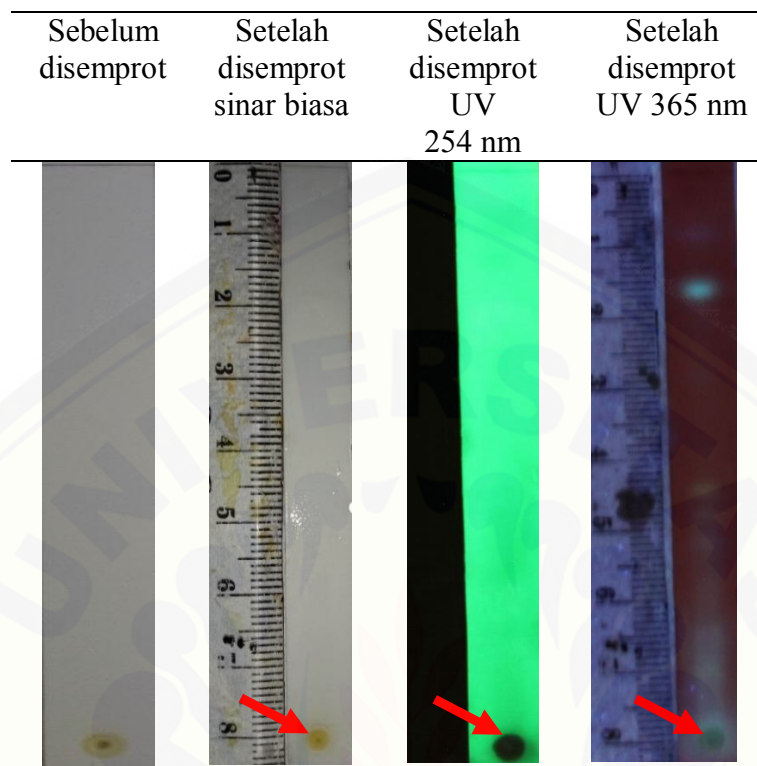
2) Hasil deteksi dengan vanilin- $H_2SO_4$  (+terpenoid)

## 3) Hasil deteksi dengan anisaldehyda asam sulfat (+terpenoid, +steroid)





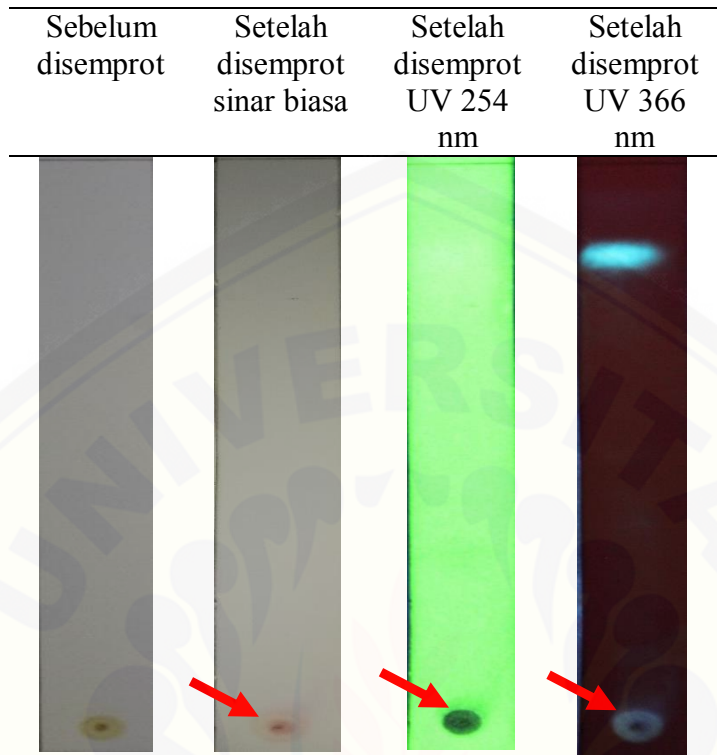
## 4) Hasil deteksi dengan uap amoniak (+ flavonoid)



## 5) Hasil deteksi dengan Dragendorff (+alkaloid)

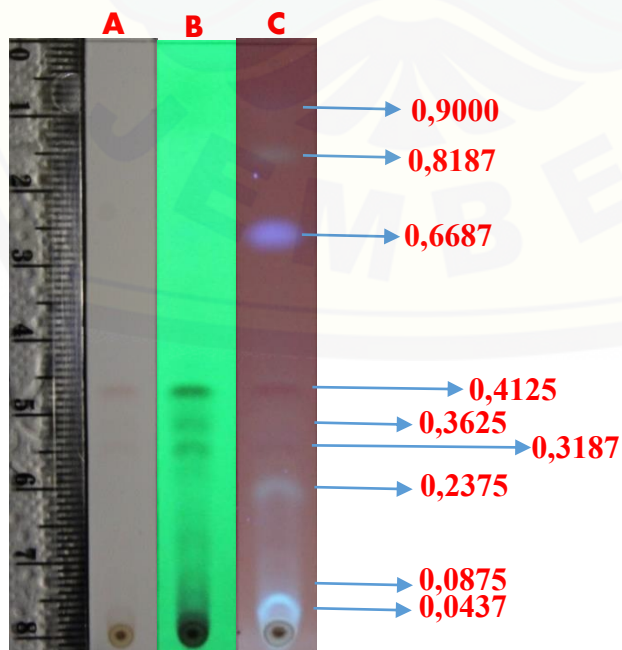


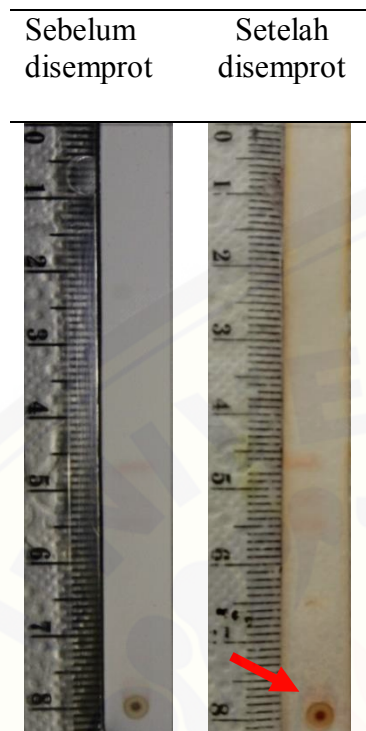
6) Hasil deteksi dengan ninhidrin (+ gugus amina)



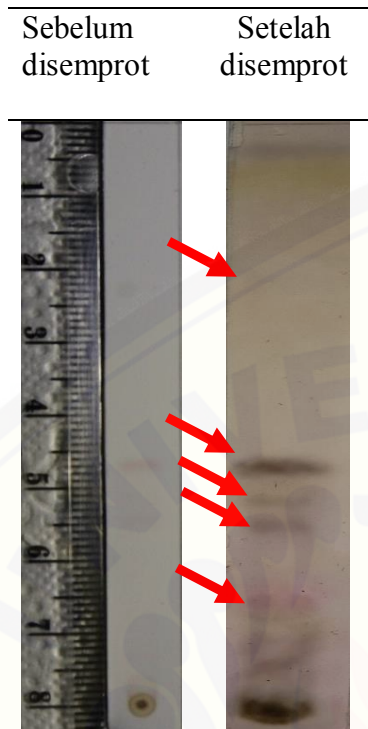
2. Hasil skrining fitokimia ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK2

Hasil eluasi dengan *n*-heksan : etil asetat = 3 : 1 + 1 tetes asam asetat glasial diamati di bawah (A) sinar biasa, (B) sinar UV 254 nm, (C) sinar UV 365 nm

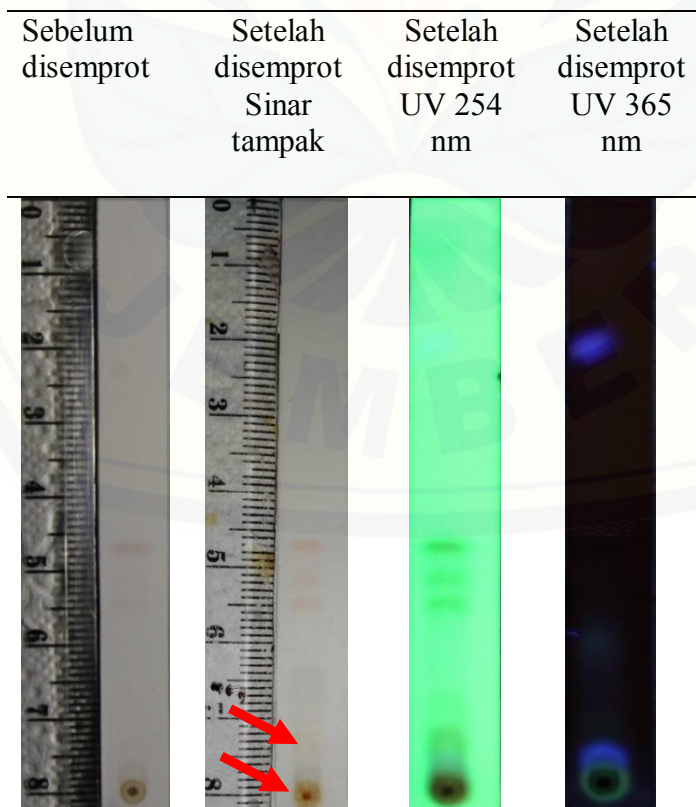


1) Hasil deteksi dengan  $\text{FeCl}_3$  (+ fenolat)2) Hasil deteksi dengan vanillin- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (+ terpenoid)

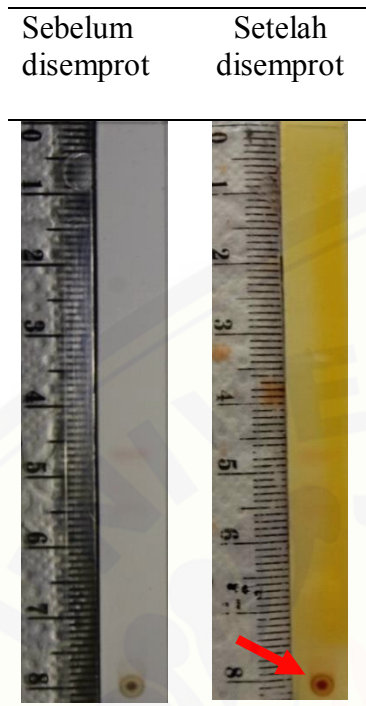
3) Hasil deteksi dengan anisaldehyde asam sulfat (+terpenoid, + steroid)



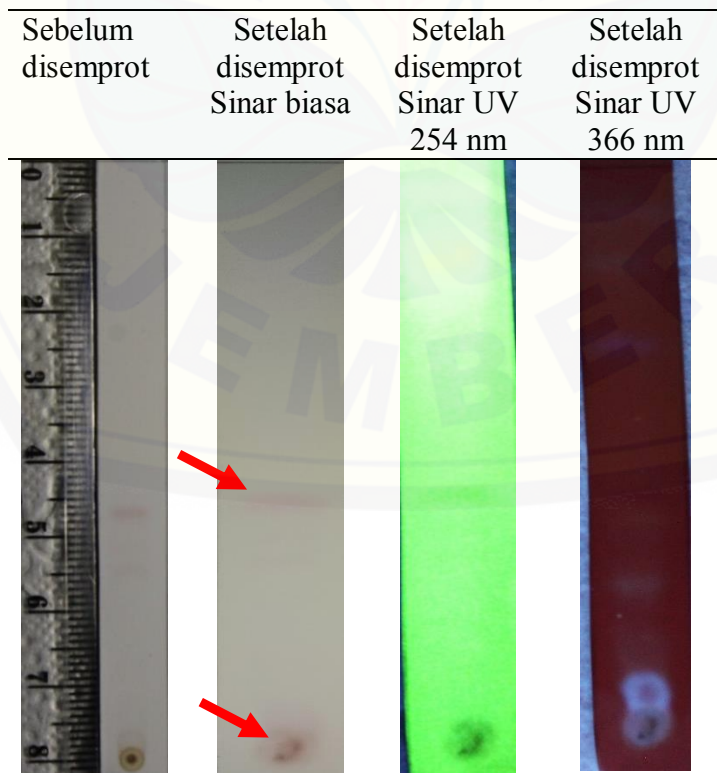
4) Hasil deteksi dengan dengan uap amoniak (+ flavonoid)



5) Hasil deteksi dengan Dragendorff (+alkaloid)



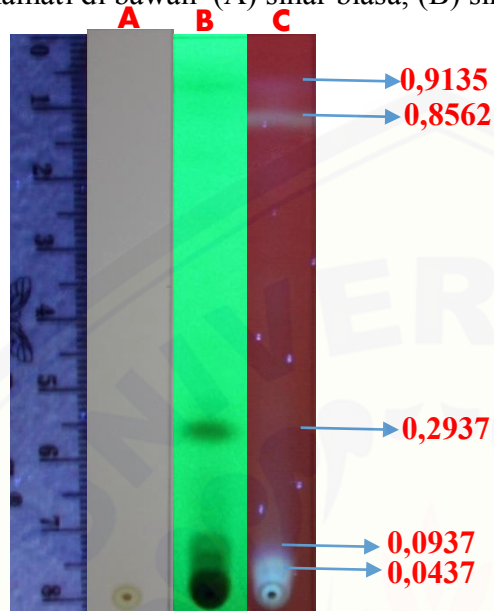
6) Hasil deteksi dengan ninhidrin (+ senyawa dengan gugus amina)





1. Hasil skrining fitokimia ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi endofit DK3

Hasil eluasi dengan *n*-heksan : etil asetat = 3 : 1 + 1 tetes asam asetat glasial diamati di bawah (A) sinar biasa, (B) sinar UV 254 nm, (C) sinar UV 365 nm



1) Hasil deteksi dengan  $\text{FeCl}_3$  (+ fenolat)



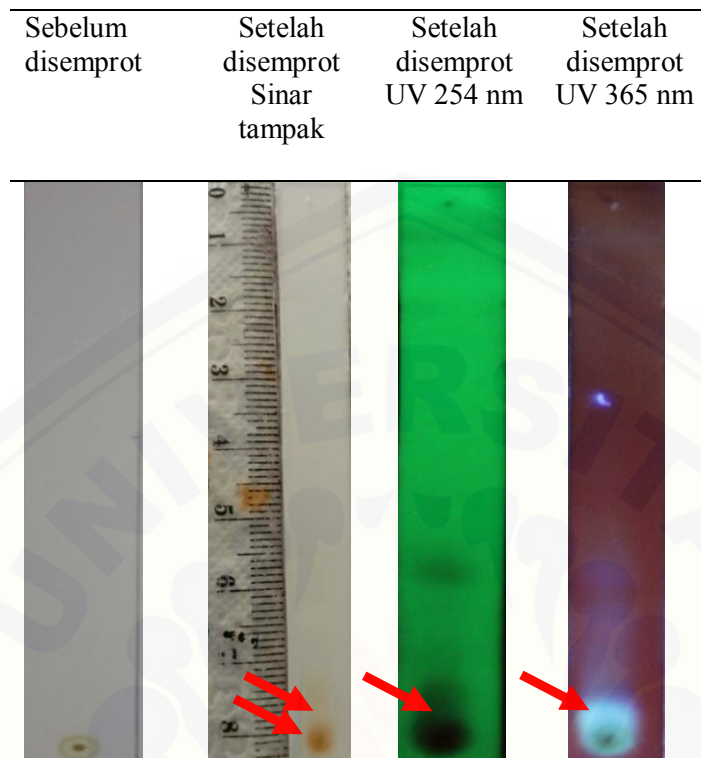
2) Hasil deteksi dengan vanillin- $H_2SO_4$  (+ gula, + terpenoid)



3) Hasil deteksi dengan anisaldehyda-  $H_2SO_4$  (terpenoid)



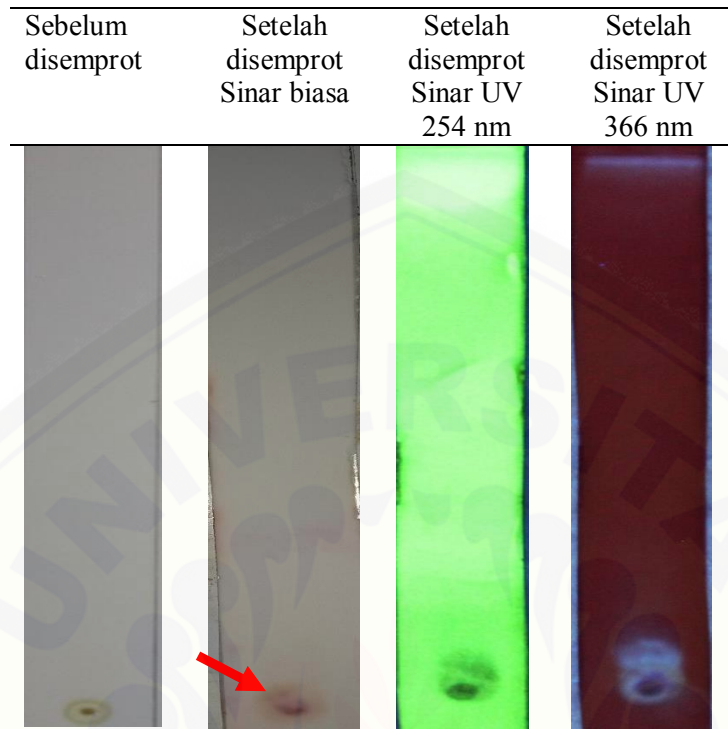
## 4) Hasil deteksi dengan uap amoniak (+ flavonoid)



## 5) Hasil deteksi dengan Dragendorff (+ alkaloid)



## 6) Hasil deteksi dengan ninhidrin (+senyawa dengan gugus asam amina)



Data Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Endofit Daun Kepundung

Golongan Senyawa	Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi DK1	Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi DK2	Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi DK3
Fenolat	+	+	+
Flavonoid	+	+	+
Alkaloid	+	+	+
Terpenoid	+	+	+
Asam amino	+	+	+