



UNIVERSITAS INDONESIA

**IDENTIFIKASI KAPANG ENDOFIT ES1, ES2, ES3, DAN ES4
DARI *Broussonetia papyrifera* Vent.
DAN PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIMIKROBA**

SKRIPSI

**KIRANA LISTIANDIANI
0706263990**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**IDENTIFIKASI KAPANG ENDOFIT ES1, ES2, ES3, DAN ES4
DARI *Broussonetia papyrifera* Vent.
DAN PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIMIKROBA**

SKRIPSI

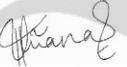
Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memenuhi gelar Sarjana Sains

**KIRANA LISTIANDIANI
0706263990**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**

HALAMAN PENGESAHAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar**

**Nama : Kirana Listiandiani
NPM : 0706263990
Tanda Tangan : 
Tanggal : 12 Juli 2011**

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Kirana Listiandiani
NPM : 0706263990
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Identifikasi Kapang Endofit ES1, ES2, ES3, dan ES4
dari *Broussonetia papyrifera* Vent. dan Pengujian Aktivitas Antimikroba

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I	: Ariyanti Oetari, Ph.D.	()
Pembimbing II	: Prof. Dr. Atiek Soemiatni	()
Penguji I	: Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D.	()
Penguji II	: Dra. Dian Hendrayanti, M.Sc.	()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 12 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur Penulis ucapkan kepada Allah SWT atas semua rahmat, karunia, dan kasih sayang yang diberikan sehingga Penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Penulis juga ingin mengucapkan banyak terima kasih kepada:

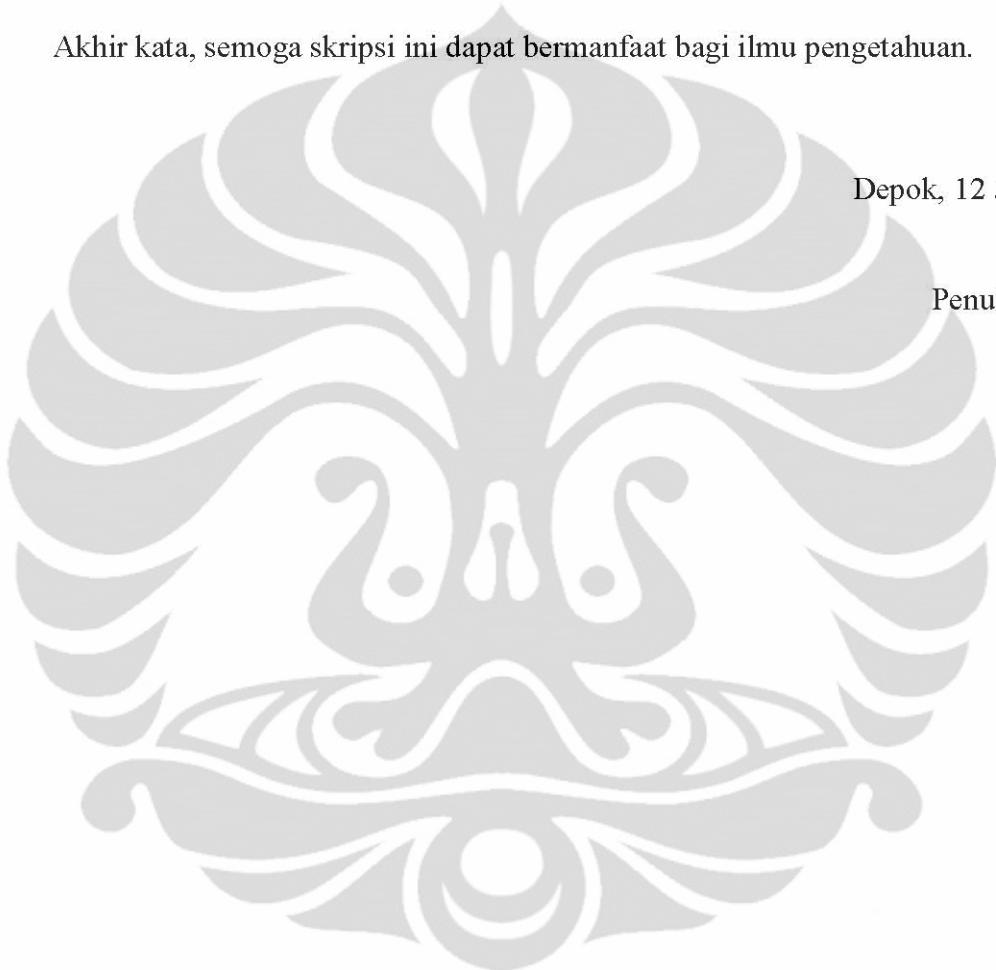
1. Ariyanti Oetari, Ph.D. dan Prof. Dr. Atiek Soemiatyi selaku Pembimbing I dan II atas segala bimbingan, waktu, dukungan, semangat, materi, dan perhatiannya sehingga Penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini.
2. Hibah Riset Unggulan Bidang Prioritas *Indigenous Studies* tahun 2010 atas nama Ariyanti Oetari, Ph.D., yang telah membiayai Penulis selama melakukan penelitian.
3. Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. dan Dra. Dian Hendrayanti, M.Sc. selaku Pengaji I dan II yang telah memberikan saran-saran selama Penulis melakukan penelitian dan penulisan skripsi.
4. Dr. Nisyawati selaku Penasehat Akademik, Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen, Dra. Titi Soedjiarti, M.U. selaku Koordinator Pendidikan, Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc., dan seluruh pengajar Departemen Biologi atas ilmu yang sangat berharga.
5. Mama, Bapa, dan Fini yang selalu memberikan doa, kasih sayang, dan dukungan tiada henti kepada Penulis.
6. Bpk. AB. Susanto dari tim Beasiswa Unggulan dari Biro Perencanaan dan Kerjasama Luar Negeri Kementerian Pendidikan Nasional yang telah memberikan beasiswa selama Penulis menempuh pendidikan di Departemen Biologi, FMIPA UI.
7. Rendi, Imora, dan Kenardo, teman seperjuangan, yang telah menjalani suka dan duka bersama Penulis selama penelitian hingga penyusunan skripsi ini.
8. Galuh, Doni, Bama, Ine, Estri, Bregas, Niar, Fahreza, Diana, Pak Priyadi, Kak Dafina, Kak Irvan, Mba Reno, dan Mba Dalia atas persahabatan, kebersamaan dan bantuan yang diberikan selama berada di laboratorium mikrobiologi.

9. Wiena, Putri, Wawa, Tiwi, Ratih R., Lulu, dan semua teman-teman Biologi angkatan 2007 yang telah bersama-sama menjalani suka duka bersama Penulis selama berkuliahan di Departemen Biologi.
10. Semua teman-teman di OSUI Mahawaditra atas segala dukungannya kepada Penulis.

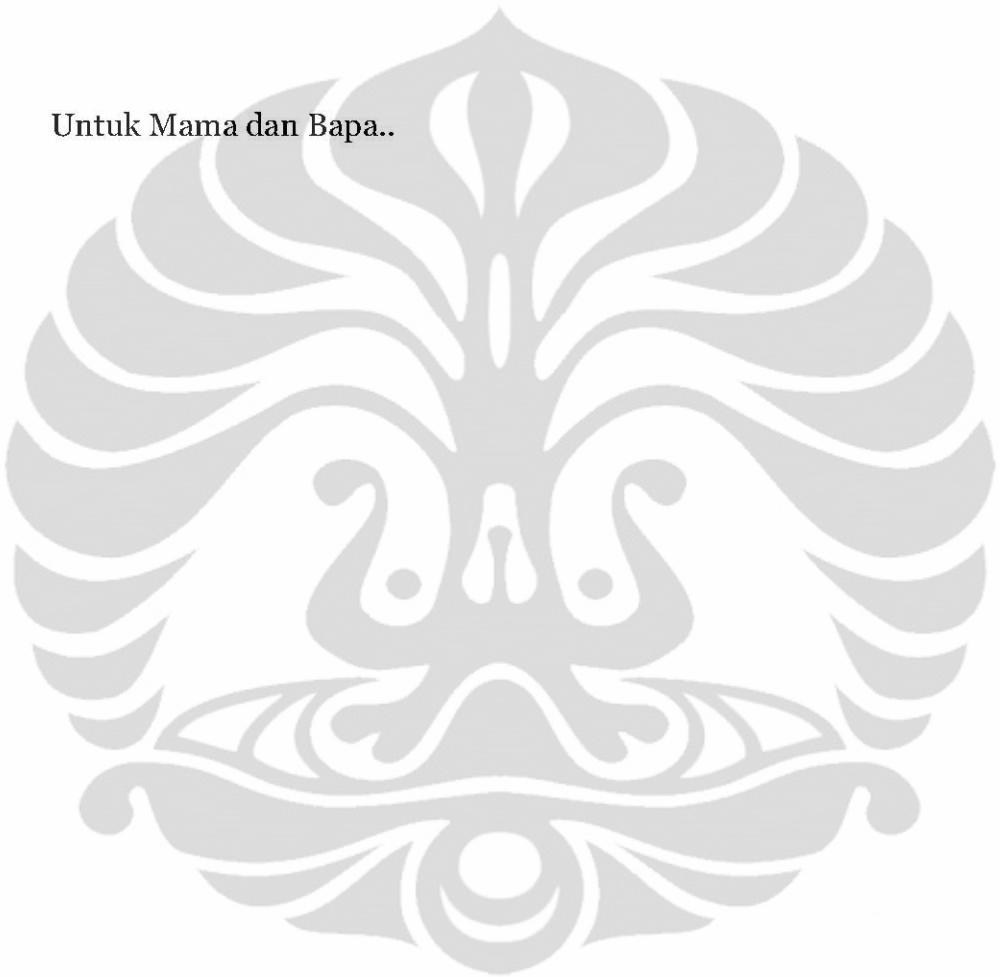
Akhir kata, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan.

Depok, 12 Juli 2011

Penulis



Untuk Mama dan Bapa..



HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Kirana Listiandiani
NPM : 0706263990
Program Studi : S1
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Non-eksklusif (Non-exclusive Royalty-Free Right)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Identifikasi Kapang Endofit ES1, ES2, ES3, dan ES4 dari *Broussonetia papyrifera* Vent. dan Pengujian Aktivitas Antimikroba

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 12 Juli 2011
Yang menyatakan



(Kirana Listiandiani)

ABSTRAK

Nama : Kirana Listiandiani

Program Studi : Biologi

Judul : Identifikasi Kapang Endofit ES1, ES2, ES3, dan ES4 dari *Broussonetia papyrifera* Vent. dan Pengujian Aktivitas Antimikroba

Sebanyak 4 isolat kapang endofit telah diisolasi dari *Broussonetia papyrifera* Vent. dan berdasarkan karakter morfologi diidentifikasi sebagai *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES1 dan ES4, *Cladosporium macrocarpum* ES3, dan *Fusarium equiseti* ES2. Aktivitas antimikroba ditunjukkan oleh blok agar dari *F. equiseti* ES2 terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan blok agar dari *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29. Ekstrak *F. equiseti* ES2 dalam etil asetat dan metanol menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *B. subtilis* ATCC 6633, sedangkan ekstrak *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 tidak menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *C. albicans* UICC Y-29. KLT dari ekstrak dalam etil asetat dan metanol menggunakan eluen etil asetat:metanol (7:3) menghasilkan 2 dan 1 bercak, berturut-turut. Bioautografi pada bercak tidak menunjukkan aktivitas antimikroba.

Kata kunci:

Aktivitas antimikroba, *Aspergillus*, *Broussonetia papyrifera*, *Cladosporium*, identifikasi, *Fusarium*, kapang endofit.

ABSTRACT

Name : Kirana Listiandiani
Study program : Biology
Title : Identification of ES1, ES2, ES3, and ES4 Fungal Endophytes from *Broussonetia papyrifera* Vent. and Their Antimicrobial Test

Four endophytic fungi were isolated from *Broussonetia papyrifera* Vent. and identified as *Aspergillus* subgenus *Circumdati* section *Flavi* ES1 and ES4, *Cladosporium macrocarpum* ES3, and *Fusarium equiseti* ES2. Antimicrobial activity was shown by agar block of *F. equiseti* ES2 against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and of *Aspergillus* subgenus *Circumdati* section *Flavi* ES4 against *Candida albicans* UICC Y-29. *F. equiseti* ES2 extract in ethyl acetate and methanol showed antimicrobial activity against *B. subtilis* ATCC 6633, while *Aspergillus* subgenus *Circumdati* section *Flavi* ES4 extracts showed no antimicrobial activity against *C. albicans* UICC Y-29. TLC of fungal extract in ethyl acetate and methanol with ethyl acetate:methanol (7:3) as eluent produces 2 and 1 spots, respectively. Bioautography of the spots showed no antimicrobial activity.

Keywords:

Antimicrobial activity, *Aspergillus*, *Broussonetia papyrifera*, *Cladosporium*, identification, endophytic fungi, *Fusarium*.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1. Fungi	4
2.2. Fungi Endofit	5
2.3. <i>Broussonetia papyrifera</i> Vent.	6
2.4. Isolasi Kapang Endofit	7
2.5. Identifikasi Konvensional Berdasarkan Karakter Morfologi Kapang...	8
2.6. Metabolit Sekunder dari Fungi Endofit	15
2.7. Senyawa Antimikroba	18
2.7.1. Senyawa Antibakteri	19
2.7.2. Senyawa Antifungi	20
2.8. Ekstraksi Metabolit Sekunder	21
2.9. Pengujian Aktivitas Antimikroba.....	22
2.10. Mikroorganisme Uji.....	24
2.11. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Bioautografi	25
3. METODOLOGI PENELITIAN	28
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	28
3.2. Alat.....	28
3.3. Bahan	28
3.3.1. Sampel Tumbuhan	28
3.3.2. Mikroorganisme.....	28
3.3.3. Medium	29
3.3.4. Bahan Kimia	29
3.3.5. Bahan Habis Pakai	29
3.4. Cara Kerja	29
3.4.1. Pembuatan Medium	30
3.4.1.1. Potato Dextrose Agar (PDA)	30
3.4.1.2. Plate Count Agar (PCA)	30
3.4.1.3. Nutrient Agar (NA)	30
3.4.1.4. Yeast Malt Agar (YMA).....	31
3.4.2. Isolasi Kapang Endofit	31

3.4.3.	Pemurnian Mikroorganisme	31
3.4.4.	Pembuatan <i>Stock Culture</i> dan <i>Working Culture</i>	32
3.4.5.	Identifikasi Konvensional dengan Pengamatan Karakter Morfologi Kapang	32
3.4.6.	Pengujian Aktivitas Antimikroba dengan Blok Agar	33
3.4.7.	Ekstraksi Senyawa Antimikroba dari Kapang Endofit	34
3.4.8.	Pengujian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kapang Endofit dengan Difusi Agar Cara Cakram.....	35
3.4.9.	Pemisahan Senyawa Antimikroba dengan Kromatografi Lapis Tipis	36
3.4.10.	Bioautografi	36
3.4.11.	Pengolahan dan Analisis Data	37
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	38
4.1.	Isolasi Kapang Endofit	38
4.2.	Identifikasi Konvensional Berdasarkan Karakter Morfologi Kapang ..	39
4.2.1.	<i>Aspergillus</i> subgenus <i>Circumdati section Flavi</i> ES1 dan ES4 .	39
4.2.2.	<i>Cladosporium marcocarpum</i> ES3	44
4.2.3.	<i>Fusarium equiseti</i> ES2.....	47
4.3.	Pengujian Aktivitas Antimikroba dengan Blok Agar.....	51
4.4.	Ekstraksi Senyawa Antimikroba dari Kapang Endofit	55
4.5.	Pengujian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kapang Endofit dengan Difusi Agar Cara Cakram.....	56
4.6.	Pemisahan Senyawa Antimikroba	61
4.7.	Bioautografi	62
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	64
5.1.	Kesimpulan	64
5.2.	Saran	64
	DAFTAR REFERENSI.....	66

DAFTAR TABEL

Tabel 4.2.1.	Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dan makroskopik dari <i>Aspergillus</i> sp. ES1 dan <i>Aspergillus</i> sp. ES4 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang	41
Tabel 4.2.2.	Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dan makroskopik dari <i>Cladosporium</i> sp. ES3 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang	45
Tabel 4.2.3.	Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dan makroskopik dari <i>Fusarium</i> sp. ES2 umur 13 hari pada medium PDA di suhu ruang	49
Tabel 4.3.	Hasil pengujian aktivitas antimikroba menggunakan blok agar terhadap mikroorganisme uji, inkubasi selama 24 jam di suhu ruang.....	51
Tabel 4.5.(1).	Hasil pengujian aktivitas antimikroba ekstrak kapang endofit dengan difusi agar cara cakram terhadap mikroorganisme uji, inkubasi selama 24 jam di suhu ruang.....	57
Tabel 4.5.(2).	Konsentrasi ekstrak <i>Fusarium</i> ES2 yang disetarkan dengan konsentrasi antibiotik tetrasiplin berdasarkan diameter zona hambat.....	59
Tabel 4.6.	Hasil KLT untuk pemisahan senyawa antimikroba ekstrak <i>Fusarium</i> ES2 divisualisasikan dengan sinar UV 365 nm.....	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.3.	Daun <i>Broussonetia papyrifera</i> asal Bandung	6
Gambar 2.5.(1).	Zigospora dan Askospora	9
Gambar 2.5.(2).	Tipe-tipe askomata yang dihasilkan <i>Ascomycota</i>	10
Gambar 2.5.(3).	Berbagai bentuk konidia	11
Gambar 2.5.(4).	Hifa bersekat dan tidak bersekat	12
Gambar 2.5.(5).	Struktur morfologi <i>Aspergillus</i> secara umum	12
Gambar 2.5.(6).	Struktur morfologi <i>Emericella nidulans</i>	13
Gambar 2.5.(7).	Struktur morfologi <i>Fusarium</i> secara umum.....	14
Gambar 2.5.(8).	Struktur umum <i>Mucor</i> dan <i>Rhizopus</i>	14
Gambar 2.6.(1).	Subglutinol A, senyawa imunosupresan yang dihasilkan kapang endofit <i>Fusarium oxysporum</i>	17
Gambar 2.6.(2).	Cytonic acid A dan B, senyawa antivirus yang dihasilkan kapang endofit <i>Cytonaema</i> sp.	18
Gambar 2.6.(3).	Paclitaxel, senyawa antikanker yang dihasilkan oleh kapang endofit <i>Taxomyces andreanae</i>	18
Gambar 2.7.2.	<i>Cryptocandin</i> , senyawa antifungi yang dihasilkan oleh kapang endofit <i>Cryptosporiopsis quercina</i>	12
Gambar 2.9.	Daun <i>Broussonetia papyrifera</i> asal Bandung	13
Gambar 2.8.	Difusi Agar Cara Cakram.....	19
Gambar 4.1.	Hasil isolasi kapang endofit dari daun tumbuhan <i>Broussonetia papyrifera</i> asal Kota Bandung	38
Gambar 4.2.1.(1).	Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dari <i>Aspergillus</i> sp. ES1 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang	41
Gambar 4.2.1.(2).	Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik dari <i>Aspergillus</i> sp. ES1 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang	42
Gambar 4.2.1.(3).	Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dari <i>Aspergillus</i> sp. ES4 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang	43
Gambar 4.2.1.(4).	Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik dari <i>Aspergillus</i> sp. ES4 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang	43
Gambar 4.2.2.(1).	Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dari <i>Cladosporium</i> sp. ES3 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang.....	46
Gambar 4.2.2.(2).	Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik dari <i>Cladosporium</i> sp. ES3 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang	46
Gambar 4.2.2.(3)	Struktur <i>Cladosporium macrocarpum</i>	47
Gambar 4.2.3.(1).	Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dari <i>Fusarium</i> sp. ES2 umur 13 hari pada medium PDA di suhu ruang.....	49

Gambar 4.2.3.(2). Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik dari <i>Fusarium</i> sp. ES2 umur 13 hari pada medium PDA di suhu ruang	50
Gambar 4.2.3.(3) Struktur <i>Fusarium equiseti</i>	50
Gambar 4.3. Hasil pengujian aktivitas antimikroba kapang endofit dengan blok agar terhadap mikroorganisme uji, inkubasi selama 24 jam di suhu ruang.....	53
Gambar 4.5.(1). Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak <i>Fusarium</i> ES2 dengan difusi agar cara cakram terhadap <i>B. subtilis</i> ATCC 6633, inkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.....	58
Gambar 4.5.(2). Hasil pengujian aktivitas antifungi ekstrak <i>Aspergillus</i> ES4 dengan difusi agar cara cakram terhadap <i>C. albicans</i> UICC Y-29, inkubasi selama 24 jam pada suhu ruang.....	60



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian.....	75
Lampiran 2. Skema Cara Kerja Purifikasi Mikroorganisme Serta Pembuatan <i>Stock Culture dan Working Culture</i>	76
Lampiran 3. Skema Cara Kerja Identifikasi Konvensional Berdasarkan Karakter Morfologi Kapang Endofit.....	76
Lampiran 4. Skema Cara Kerja Pengujian Aktivitas Antimikroba dari Kapang Endofit Dengan Blok Agar	77
Lampiran 5. Skema Cara Kerja Ekstraksi Senyawa Antimikroba dari Kapang Endofit	77
Lampiran 6. Skema Cara Kerja Pengujian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kapang Endofit Terhadap Dengan Difusi Agar Cara Cakram	78
Lampiran 7. Skema Cara Kerja Kromatografi Lapis Tipis	78
Lampiran 8. Skema Cara Kerja Bioautografi	79
Lampiran 9. Standar Warna Faber Castell.....	80



BAB 1 **PENDAHULUAN**

Mikroorganisme endofit secara alami hidup di dalam jaringan tumbuhan, namun tidak memberikan dampak negatif terhadap tumbuhan tersebut (Tan dan Zou 2001: 448). Mikroorganisme endofit dapat berupa bakteri atau fungi (Simarmata dkk. 2007: 1--2), namun yang paling banyak ditemukan berupa fungi (kapang atau khamir) (Strobel dan Daisy 2003: 493).

Salah satu tumbuhan yang menjadi inang untuk kapang endofit adalah *Broussonetia papyrifera* Vent. (de Errasti dkk. 2010: 29). *Broussonetia papyrifera* atau *paper mulberry* merupakan tumbuhan tropis dan termasuk ke dalam famili *Moraceae* (Whistler dan Elevitch 2006: 1). Tumbuhan *B. papyrifera* di Jawa Barat dikenal dengan nama saeh (Permadi 2005a: 2--3). Pemanfaatan tumbuhan *B. papyrifera* di negara-negara Asia Tenggara termasuk Indonesia adalah sebagai bahan pembuatan kertas dan obat-obatan (Whistler dan Elevitch 2006: 8). Kinghorn dkk. (2004: 12) melaporkan bahwa ekstrak tumbuhan *B. papyrifera* memiliki aktivitas antifungi, antihepatotoksik, dan antioksidan.

Kapang endofit diisolasi dari organ tumbuhan yang masih dalam keadaan segar dan telah disterilkan permukaannya (Agusta 2009: 3). Isolasi kapang endofit dari sampel tumbuhan dapat dilakukan dengan metode *surface sterilization* menggunakan hipoklorit dan alkohol 70% sebagai disinfektan (Ando dkk. 2003: 12) dan kemudian sampel tumbuhan tersebut diletakkan pada medium agar (Tan dan Zou 2001: 448). Metode *surface sterilization* digunakan untuk menghilangkan mikroorganisme epifit pada tumbuhan (Larran dkk. 2001: 1).

Kapang endofit yang telah diisolasi, umumnya diidentifikasi untuk mengetahui identitas dari kapang tersebut. Identifikasi kapang secara konvensional secara umum dapat dilakukan dengan pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dan makroskopik (Pitt 1979: 24). Tujuan dari pengamatan morfologi adalah memperoleh deskripsi karakter dari suatu kapang. Deskripsi yang diperoleh selanjutnya dibandingkan dengan literatur atau monograf untuk mengetahui identitas kapang tersebut (Gandjar dkk. 1999: 4).

Kapang endofit dikenal sebagai sumber metabolit sekunder berupa enzim atau senyawa bioaktif lainnya (Kumala dan Siswanto 2007: 145). Sebagai contoh

adalah senyawa bioaktif sebagai antimikroba (antibakteri atau antifungi), yang dapat dimanfaatkan dalam bidang kedokteran dan farmasi (Strobel dan Daisy 2003: 493). Hingga saat ini, pencarian akan berbagai senyawa antimikroba masih terus dilakukan. Hal tersebut salah satunya disebabkan oleh kurangnya efek dari obat-obatan (antibiotik) yang telah ada, seiring dengan terus berkembangnya resistensi dari mikroorganisme penginfeksi seperti *Staphylococcus* Rosenbach dan *Mycobacterium* Lehmann & Neumann (Strobel dan Daisy 2003: 491 & 497).

Berbagai penelitian mengenai kapang endofit sebagai penghasil senyawa antimikroba telah dilaporkan. Kapang endofit *Cryptosporiopsis quercina* Petr. dari tumbuhan *Tripterygium wilfordii* Hook.f. menghasilkan senyawa *cryptocandin* sebagai antifungi yang menghambat pertumbuhan khamir patogen *Candida albicans* (Robin) Berkout (Strobel dkk. 1999: 1919). Simarmata dkk. (2007: 90) melaporkan bahwa isolat-isolat kapang endofit dari tanaman sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.) mampu menghambat pertumbuhan beberapa mikroorganisme, yaitu *C. albicans*, *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers, dan *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn.

Pengujian aktivitas antimikroba yang dihasilkan oleh kapang endofit dapat dilakukan dengan metode difusi agar cara cakram (Kumala dkk. 2006: 46). Aktivitas antimikroba ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekitar cakram yang mengindikasikan terjadinya difusi senyawa antimikroba ke dalam medium agar, sehingga pertumbuhan mikroorganisme yang terkandung di dalam medium tersebut menjadi terhambat (Benson 2001: 143). Beberapa contoh mikroorganisme uji yang umum digunakan antara lain *E. coli*, *B. subtilis*, dan *C. albicans* (Simarmata dkk. 2007: 90).

Senyawa antimikroba mengandung berbagai macam komponen, baik berupa komponen aktif, maupun komponen tidak aktif. Pemisahan komponen-komponen tersebut dapat dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) (Sudirman 2005: 67). Kromatografi lapis tipis adalah salah satu metode kromatografi yang dapat digunakan untuk proses pemisahan komponen penyusun suatu senyawa berdasarkan perbedaan kelarutan dan berat molekul yang terserap pada fase diam (padat) dan terlarut pada fase gerak (cair) (Bishop dkk. 1992: 123).

Hasil KLT, namun demikian, tidak memberikan informasi mengenai

komponen aktif pada senyawa antimikroba, sehingga perlu dikombinasikan dengan metode bioautografi (Sudirman 2005: 67). Metode bioautografi merupakan metode sederhana yang dapat digunakan untuk menunjukkan adanya aktivitas antimikroba. Metode tersebut menggabungkan penggunaan hasil teknik kromatografi dengan respon dari mikroorganisme yang diuji berdasarkan dari aktivitas biologi dari suatu sampel yang berupa antimikroba (Choma 2005: 1).

Saat ini *University of Indonesia Culture Collection* (UICC) telah memiliki isolat-isolat kapang endofit dari daun tumbuhan *B. papyrifera*, di antaranya tiga isolat yang berasal dari Desa Bejijong (Kota Mojokerto). Namun demikian, identifikasi konvensional berdasarkan karakter morfologi kapang-kapang endofit tersebut belum dilakukan. Selain itu isolasi kapang endofit dari tumbuhan *B. papyrifera* asal Kota Bandung dan identifikasi konvensional berdasarkan karakter morfologinya belum dilakukan. Kapang-kapang endofit dengan aktivitas antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji (*E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633, dan *C. albicans* UICC Y-29) belum diketahui. Pemisahan komponen senyawa antimikroba dengan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mengetahui komponen yang memiliki aktivitas antimikroba dengan bioautografi belum dilakukan.

Penelitian bertujuan untuk mengisolasi kapang endofit dari daun tumbuhan *B. papyrifera* asal Kota Bandung; mengidentifikasi konvensional berdasarkan karakter morfologi kapang-kapang endofit dari tumbuhan *B. papyrifera* asal Desa Bejijong dan Kota Bandung; mengetahui aktivitas antimikroba dari kapang-kapang endofit terhadap mikroorganisme uji; melakukan pemisahan komponen senyawa antimikroba; dan mengetahui komponen yang memiliki aktivitas antimikroba. Hipotesis dari penelitian adalah diperoleh isolat kapang endofit dari daun tumbuhan *B. papyrifera* asal Kota Bandung; identitas kapang-kapang endofit dari tumbuhan *B. papyrifera* asal Desa Bejijong dan Kota Bandung dapat diketahui; terdapat kapang endofit yang memiliki aktivitas antimikroba; senyawa antimikroba dapat terpisah berdasarkan komponen penyusunnya; dan komponen-komponen yang telah terpisah tersebut memiliki aktivitas antimikroba. Target jangka panjang dari penelitian ini adalah senyawa antimikroba yang diperoleh dari kapang endofit dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar berbagai obat-obatan.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Fungi

Fungi merupakan mikroorganisme eukariota (Hanson 2008: 1), memiliki dinding sel yang sebagian besar tersusun atas berbagai polisakarida dan kitin (Kavanagh 2005: 211). Fungi disebut organisme heterotrof karena memanfaatkan senyawa karbon organik sebagai sumber nutrien melalui penyerapan (Campbell *dkk.* 2003: 185). Fungi mensekresikan enzim ekstraselular untuk mengurai molekul yang bersifat kompleks menjadi bentuk yang lebih sederhana sehingga dapat diserap melalui hifa (Hogg 2005: 199).

Menurut Deacon (2006: 16), Kingdom Fungi atau Eumycota digolongkan menjadi lima filum, yaitu *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, dan *Glomeromycota*. Penggolongan fungi menjadi filum-filum tersebut dilakukan berdasarkan alat reproduksi (spora) seksual yang dihasilkan (Hogg 2005: 199). Alat reproduksi seksual yang dihasilkan adalah zoospora oleh *Chytridiomycota*; zigospora oleh *Zygomycota*; askospora oleh *Ascomycota*; dan basidiospora oleh *Basidiomycota* (Carlile *dkk.* 2001: 32, 38, 44, 57). Fungi yang berasal dari filum *Glomeromycota* melakukan reproduksi dengan menghasilkan spora aseksual yang disebut glomerospora, dan hingga saat ini belum ditemukan spora seksualnya (Schüßler *dkk.* 2001: 1414).

Berdasarkan morfologi, fungi dapat berupa filamen (*filamentous fungi*) atau sel tunggal (*unicellular fungi*). *Filamentous fungi* terbagi menjadi kapang (*mold*) dan cendawan (*mushroom*), sedangkan fungi yang berupa sel tunggal disebut khamir (*yeast*) (Kavanagh 2005: 2). Kapang merupakan *filamentous fungi* dan tersusun atas filamen-filamen yang disebut hifa (Benson 2001: 48).

Peran fungi di alam adalah sebagai saprofit atau parasit (Campbell *dkk.* 2003: 186). Fungi yang hidup sebagai saprofit menyerap nutrien dari bahan organik yang telah mati, menguraikannya menjadi zat-zat kimia yang lebih sederhana. Fungi yang hidup sebagai parasit yang menyerap nutrien dari sel-sel inang yang masih hidup (Sadava *dkk.* 2004: 604). Fungi dapat ditemukan hidup

bersimbiosis mutualisme dengan tumbuhan. Asosiasi antara fungi dan tumbuhan antara lain berupa *lichen*, mikoriza, dan endofit (Deacon 2006: 6--7).

2.2. Fungi Endofit

Fungi endofit secara alami dapat hidup di dalam jaringan, daun, akar, dan batang tumbuhan tanpa memberikan kerugian bagi tumbuhan tersebut (Khan dkk. 2007: 1). Menurut Simarmata dkk. (2007: 85), hubungan antara fungi endofit dengan tumbuhan inangnya merupakan simbiosis yang saling menguntungkan (mutualisme). Tumbuhan inang memberikan nutrien berupa materi organik dan proteksi bagi fungi endofit (Tan dan Zou 2001: 449). Sebaliknya, bagi tumbuhan inang, fungi endofit memberikan keuntungan berupa proteksi terhadap herbivora, serangga, atau mikroorganisme yang bersifat patogen (Simarmata dkk. 2007: 86).

Petrini (1991, lihat Agusta 2009: 1--2) mendefinisikan endofit sebagai koloni organisme hidup yang tidak memberikan efek pada suatu jaringan tumbuhan inang, namun pada periode tertentu dapat menimbulkan penyakit. Menurut Photita dkk. (2004: 137), kapang endofit dapat bersifat patogen apabila tumbuhan inang memperoleh tekanan dari lingkungannya, di antaranya ketika inang kekurangan nutrien. Beberapa spesies kapang endofit seperti *Cladosporium musae* E.W. Mason, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., dan *Cordana musae* (Zimm.) Höhn. diketahui dapat menyebabkan penyakit berupa bintik-bintik hitam pada daun tumbuhan *Musa acuminata* Colla.

Menurut Suryanarayanan dkk. (2009: 5), apabila tumbuhan inang suatu fungi endofit mengalami kematian, maka fungi endofit tersebut dapat berkoloni dan mengurai jaringan tumbuhan inang yang telah mati, sehingga perannya berubah dari endofit menjadi saprofit. Oleh karena itu, fungi endofit dapat berubah peran sebagai dekomposer di alam.

Fungi endofit dapat berupa kapang atau khamir. Beberapa kapang endofit yang telah dilaporkan yaitu: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. dan *Colletotrichum gloeosporioides* dari tumbuhan *Lycopersicon esculentum* Mill. (Larran dkk. 2001: 181); *Phoma chrysanthemicola* Hollos dari tumbuhan *Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton (Khan dkk. 2007: 2235); *Coprinellus*

micaceus (Bull.) Vilgalys, Hopple, & Jacq. Johnson dan *Fusarium lateririum* Ness dari tumbuhan *Broussonetia papyrifera* (de Errasti dkk. 2009: 33).

2.3. *Broussonetia papyrifera* Vent.

Broussonetia papyrifera Vent. berasal dari Famili *Moraceae*.

Broussonetia papyrifera merupakan tumbuhan berkayu yang mampu mencapai tinggi 4--15 m. *Broussonetia papyrifera* memiliki bunga jantan dan betina. Daun tumbuhan *B. papyrifera* berbentuk oval (*ovatus*), memiliki 3 lobus (*trilobed*), serta berukuran panjang 7--20 cm dan lebar 5--15 cm (Backer dan Brink 1965: 15--16). Daun tumbuhan *B. papyrifera* dimanfaatkan sebagai bahan makanan di Indonesia (Whistler dan Elevitch 2006: 3--8).



Gambar 2.3. Daun *Broussonetia papyrifera* asal Bandung
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Persebaran *B. papyrifera* meliputi daerah beriklim tropis dan tumbuh pada ketinggian 0--1.500 m di atas permukaan laut (Whistler dan Elevitch 2006: 1). *Broussonetia papyrifera* dapat ditemukan antara lain di Samoa, Hawai, China, Jepang, Korea, Myanmar, Vietnam, Thailand, dan Indonesia (Whistler dan

Elevitch 2006: 4). Persebaran *B. papyrifera* di Indonesia meliputi pulau Jawa, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, Bali, Papua, dan Maluku (Permadi 2005b: 1--6). *Broussonetia papyrifera* disebut juga *paper mulberry* dan di Indonesia dikenal dengan nama laklak (Sumatera Utara), ranta (Sulawesi Selatan), glugu (Jawa dan Madura), atau saeh (Jawa Barat) (Permadi 2005a: 2--3).

Ekstrak tumbuhan *B. papyrifera* diketahui memiliki aktivitas antifungi, antihepatotoksik, dan antioksidan. Tumbuhan *B. papyrifera* telah digunakan sebagai pengobatan impotensi dan *ophthalmic disorder* di negara China (Kinghorn *dkk.* 2004: 12). Pemanfaatan lain dari tumbuhan *B. papyrifera* diantaranya sebagai bahan dasar pembuatan kain tradisional dan kertas di negara-negara Asia Tenggara termasuk Indonesia (Whistler dan Elevitch 2006: 8). Menurut Permadi (2005b: 2), kulit kayu tumbuhan *B. papyrifera* di Indonesia telah lama dimanfaatkan sebagai bahan pembuatan kertas tradisional yang disebut kertas daluang.

2.4. Isolasi Kapang Endofit

Isolasi merupakan cara untuk memisahkan suatu mikroorganisme dari lingkungannya, sehingga diperoleh biakan yang sudah tidak tercampur dengan biakan lain atau disebut biakan murni (Gandjar *dkk.* 1992: 20). Sebelum dilakukan isolasi, diperlukan perlakuan-perlakuan awal (*pretreatments*) untuk keberhasilan proses isolasi tersebut. *Pretreatments* yang dilakukan tergantung dari karakteristik substrat atau inang tempat kapang endofit berada (Ando *dkk.* 2003: 11). Metode *surface sterilization* digunakan sebagai perlakuan awal (*pretreatment*) untuk mengisolasi kapang endofit (Ando *dkk.* 2003: 12) yang berasal dari organ tumbuhan yang masih dalam keadaan segar (Agusta 2009: 3). Metode tersebut bertujuan menghilangkan mikroorganisme epifit yang berada di permukaan tumbuhan, sehingga koloni yang diperoleh merupakan koloni endofit yang berasal dari dalam jaringan tumbuhan (Larran *dkk.* 2001: 181).

Metode *surface sterilization* menggunakan alkohol dan hipoklorit sebagai disinfektan (Ando *dkk.* 2003: 12). Disinfektan adalah senyawa kimia yang digunakan dalam proses disinfeksi, yaitu proses mengurangi mikroorganisme

patogen termasuk spora bakteri pada permukaan suatu objek (Rao 2008: 1). Disinfektan dalam metode *surface sterilization* digunakan untuk menghilangkan mikroorganisme epifit pada tumbuhan (Larran dkk. 2001: 1). Alkohol dan hipoklorit yang digunakan memiliki spektrum aktivitas yang berbeda. Alkohol bekerja dengan cara merusak lapisan membran sel mikroorganisme (Rao 2008: 7). Alkohol dapat melarutkan lipid dan mendenaturasi protein yang ada pada membran sel. Hal tersebut dapat mengganggu fungsi membran sel dalam mengatur transportasi cairan ke dalam dan keluar sel sehingga membuat sel mikroorganisme menjadi lisis (McDonnell dan Russell 1999: 151).

Alkohol memiliki spektrum aktivitas yang relatif sempit, sehingga dalam proses *surface sterilization* dikombinasikan dengan disinfektan lain seperti natrium hipoklorit (NaOCl) (Agusta 2009: 3--4). Natrium hipoklorit merupakan senyawa klorin (Rao 2008: 8). Senyawa klorin diketahui mampu menghambat pertumbuhan sel mikroorganisme dengan cara mengganggu proses oksidasi dari enzim-enzim penting sehingga fungsi metabolisme dari sel tersebut terganggu dan sel mikroorganisme tidak dapat tumbuh (Valera dkk. 2009: 557).

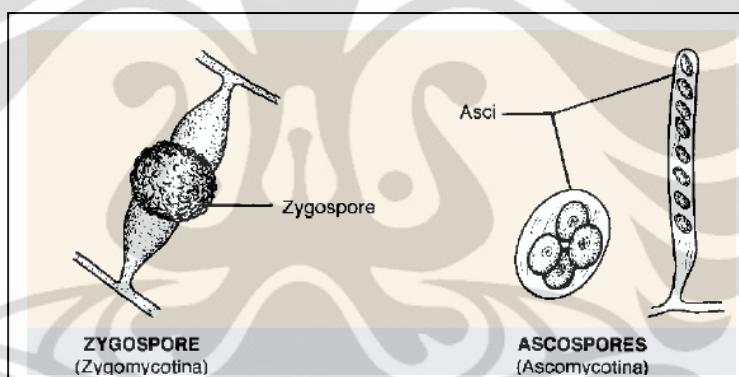
Proses isolasi umumnya diikuti dengan proses pemurnian atau purifikasi untuk mendapatkan kultur murni (Cappuccino dan Sherman 1996: 13). Salah satu teknik pemurnian yang umum digunakan adalah metode *quadrant streak*. Metode *quadrant streak* menggunakan jarum inokulasi untuk membantu persebaran sel-sel mikroorganisme dengan cara menggoreskan ujung jarum tersebut pada medium agar di dalam cawan petri. Proses purifikasi kemudian diikuti dengan inkubasi pada kondisi yang sesuai, hingga diperoleh koloni tunggal yang representatif. Koloni tunggal yang representatif tersebut diasumsikan berasal dari pertumbuhan sel tunggal sehingga seragam secara genetik (Hogg 2005: 85--86).

2.5. Identifikasi Konvensional Berdasarkan Karakter Morfologi Kapang

Identifikasi kapang secara konvensional dapat dilakukan dengan pengamatan karakter fenotipik di antaranya karakter morfologi dan selanjutnya dibandingkan dengan deskripsi suatu kapang pada literatur atau monograf. Tujuan dari pengamatan morfologi adalah memperoleh deskripsi dari suatu

kapang untuk mengetahui identitas dari kapang tersebut. Pengamatan karakter morfologi dilakukan secara mikroskopik dan makroskopik (Gandjar dkk. 1999: 4).

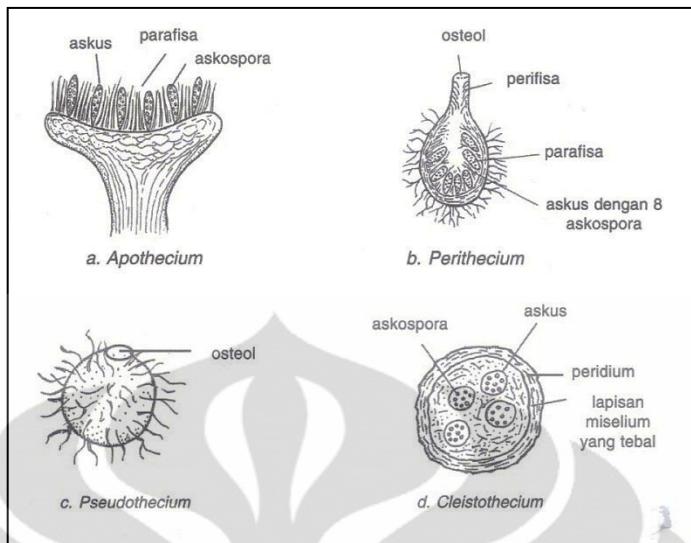
Kapang merupakan fungi yang berasal dari filum *Ascomycota* dan *Zygomycota*. Karakter utama yang membedakan kapang dari kedua filum tersebut adalah struktur alat reproduksi seksual atau spora seksual. Spora seksual dari *Ascomycota* disebut askospora, sedangkan spora seksual dari *Zygomycota* disebut zigospora (Benson 2001: 49). Apabila ditemukan struktur spora seksual, maka kapang tersebut berada pada fase teleomorf, sedangkan apabila hanya ditemukan struktur spora aseksual maka kapang tersebut berada pada fase anamorf (Webster dan Weber 2007: 32). Apabila hanya terdapat struktur hifa dan tidak ditemukan struktur spora, maka kapang tersebut merupakan hifa steril (Barnett dan Hunter 2003: 34).



Gambar 2.5.(1). Zigospora dan Askospora

[Sumber: Benson 2001: 50.]

Filum *Ascomycota* bereproduksi secara seksual menghasilkan askospora. Askospora berada di dalam askus, dan askus terdapat pada tubuh buah atau karpus atau disebut juga askomata. Terdapat empat tipe askomata, yaitu *apothecium*, *perithecium*, *pseudothecium*, dan *cleistothecium*. *Apothecium* berbentuk seperti cawan yang lebar, atau seperti cangkir. *Perithecium* berbentuk seperti labu dengan leher panjang yang pada ujungnya terdapat lubang atau osteol. *Pseudothecium* berbentuk bulat seperti *perithecium* yang tidak memiliki leher namun memiliki osteol. *Cleistothecium* berbentuk bulat bulat yang seluruh permukaannya tertutup oleh hifa-hifa yang rapat mirip suatu dinding yang disebut peridium (Gandjar dkk. 2006: 48--50).

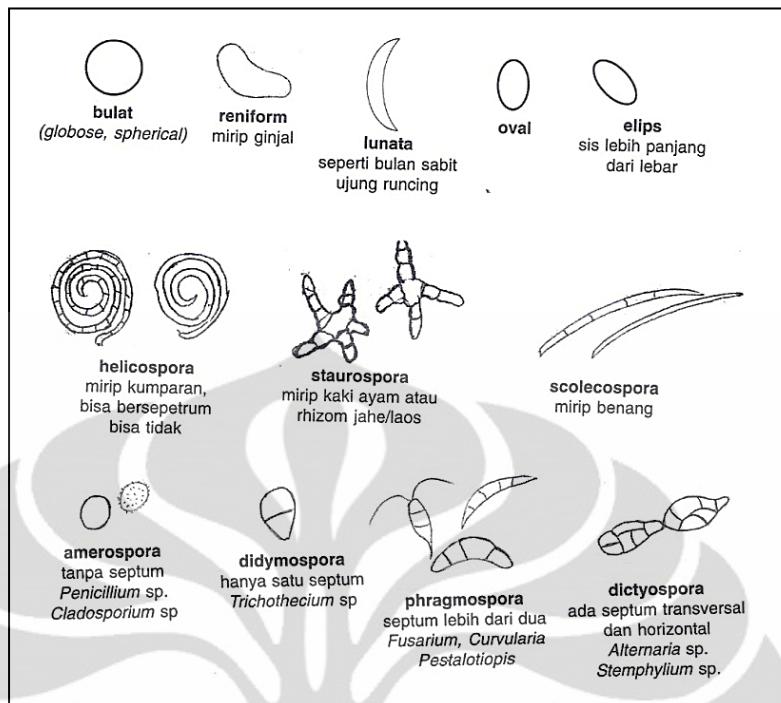


Gambar 2.5.(2). Tipe-tipe karpus seksual yang dihasilkan *Ascomycota*

[Sumber: Gandjar dkk. 2006: 49.]

Spora aseksual pada kapang filum *Zygomycota* disebut sporangiospora karena dihasilkan di dalam suatu struktur kantung yang disebut sporangium. Sporangium dapat berbentuk bulat (seperti ditemukan pada *Rhizopus*, *Mucor*, dan *Absidia*) (Webster dan Weber 2007: 168) atau berbentuk silindris (seperti ditemukan pada *Syncephalastrum*) (Gandjar dkk. 2006: 62).

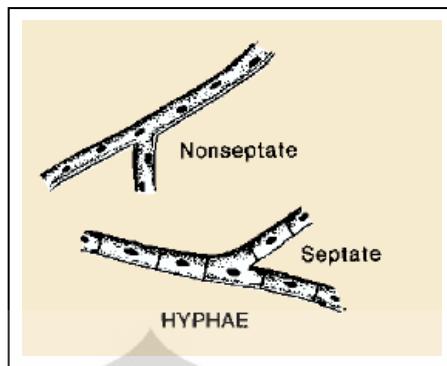
Spora aseksual pada kapang filum *Ascomycota* disebut konidiospora atau konidia dan dihasilkan oleh sel konidiogenus atau sel penghasil konidia. Berdasarkan ukurannya, konidia dikelompokkan menjadi makrokonidia dan mikrokonidia (Benson 2001: 48--49). Bentuk dari konidia bervariasi, dapat berbentuk bulat, semibulat, oval, silindris, elips, seperti benang (scolecospora), seperti bulan sabit (*lunata*), seperti ginjal (*reniform*), seperti bintang (staurospongia), atau berbentuk menggulung (helicospora). Selain itu terdapat jenis-jenis spora aseksual lainnya seperti klamidospora, arthrospora, dan blastokonidia (Gandjar dkk. 2006: 60--62). Hal-hal lain yang harus diperhatikan dalam pengamatan konidia kapang meliputi jumlah sel (uniselular atau multiselular), pengaturan konidia (tunggal, membentuk rantai, atau membentuk klaster), dan pengukuran konidia (Gandjar dkk. 1999: 5).



Gambar 2.5.(3). Berbagai bentuk konidia

[Sumber: Gandjar dkk. 2006: 61–62. Dengan modifikasi.]

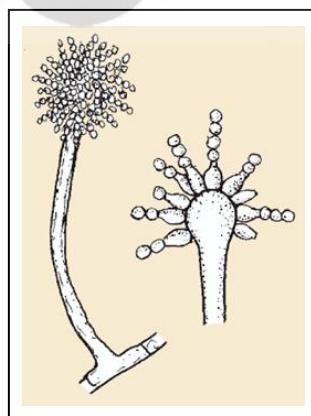
Kapang tersusun atas filamen-filamen yang disebut hifa. Hifa dapat dibedakan dengan ada atau tidaknya septum atau sekat (Benson 2001: 48). Hifa yang bersekat merupakan karakteristik dari fungi tingkat tinggi (*higher fungi*) yaitu fungi dari filum *Ascomycota* (Hogg 2005: 198). Hifa yang memiliki sekat disebut juga hifa *septate*. Sekat membagi hifa menjadi kompartemen-kompartemen (Benson 2001: 48), dan di dalam setiap kompartemen terdapat satu inti sel (Gandjar dkk. 2006: 12). Sebaliknya, hifa yang tidak memiliki sekat dimiliki oleh fungi tingkat rendah (*lower fungi*), yaitu dari filum *Zygomycota*. Hifa yang tidak bersekat disebut hifa *aseptate*, memiliki sejumlah inti sel yang tersebar di dalam sitoplasma sehingga disebut juga hifa *coenocytic* (Hogg 2005: 198–199). Hal-hal lain yang harus diamati pada hifa adalah pigmentasi, yaitu dapat berpigmentasi hialin (tidak berwarna) atau gelap, dan perhitungan lebar hifa (Gandjar dkk. 1999: 4–5).



Gambar 2.5.(4). Hifa bersekat dan tidak bersekat

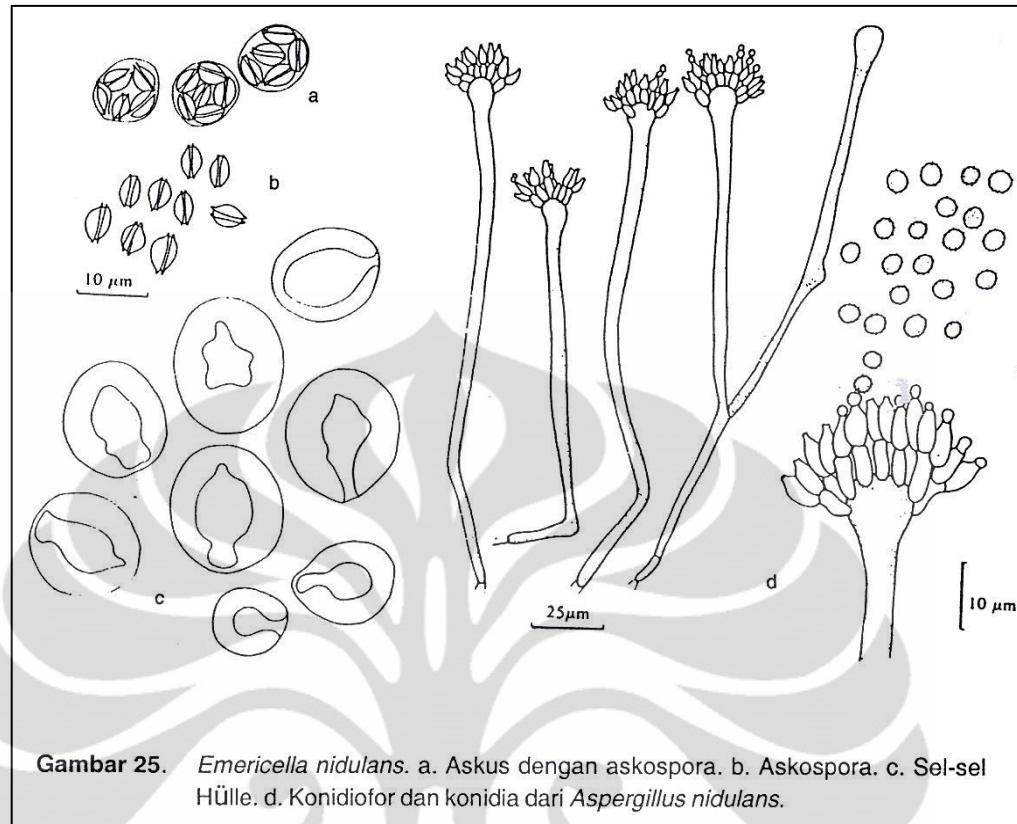
[Sumber: Benson 2001: 48.]

Genus-genus kapang dari filum *Ascomycota* yang umum ditemukan antara lain adalah *Aspergillus* Mich. dan *Fusarium* Link. *Aspergillus* dapat dikenali dengan adanya struktur konidia yang berbentuk oval, semibulat, atau bulat dan ada membentuk rantai. Konidia melekat pada fialid (sel konidiogonus) dan fialid melekat pada bagian ujung konidiofor yang mengalami pembengkakan atau disebut vesikel. Fialid dapat melekat langsung pada vesikel (tipe sterigmata uniseriat) atau dapat melekat pada struktur metula (tipe sterigmata biseriat) (Samson dkk. 2004: 64). Secara makroskopik, warna koloni *Aspergillus* bervariasi dari kuning, hijau, kebiruan, putih, hingga hitam (Koneman dan Roberts 1985: 86). *Aspergillus* merupakan kapang anamorf karena hanya menghasilkan struktur konidia. Teleomorf dari *Aspergillus* antara lain adalah *Eurotium* Link. (Webster dan Weber 2007: 32). *Eurotium* dan *Emericella* menghasilkan askomata tipe *cleistothecium* (Samson dkk. 1981: 32).



Gambar 2.5.(5). Struktur morfologi *Aspergillus* secara umum

[Sumber: Benson 2001: 62.]

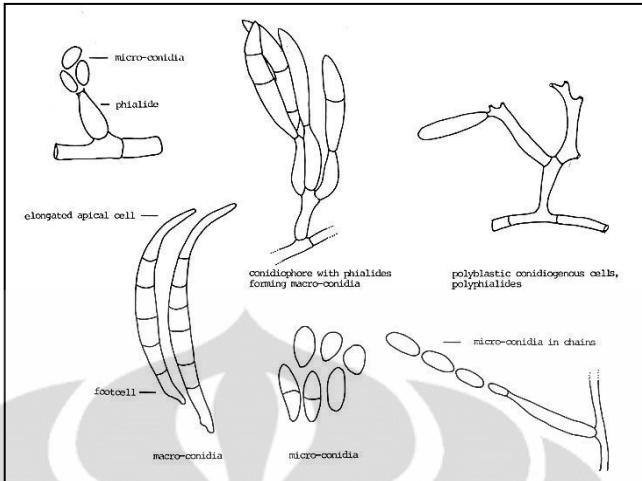


Gambar 25. *Emericella nidulans*. a. Askus dengan askospora. b. Askospora. c. Sel-sel Hülle. d. Konidiofor dan konidia dari *Aspergillus nidulans*.

Gambar 2.5.(6). Struktur morfologi *Emericella nidulans*

[Sumber: Gandjar dkk. 1999: 57.]

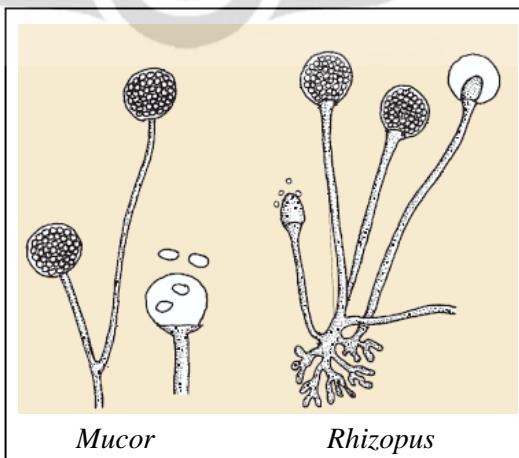
Fusarium Link. dapat menghasilkan konidia mikrokonidia dan makrokonidia. Mikrokonidia berupa sel tunggal, melekat pada fialid, dan ada yang membentuk rantai. Mikrokonidia tidak atau jarang ditemukan pada beberapa spesies *Fusarium*. Makrokonidia juga dihasilkan oleh fialid, multiselular (bersekat), dan berbentuk lurus atau sedikit melengkung menyerupai bulan sabit. Beberapa spesies *Fusarium* dapat menghasilkan klamidospora (Samson dkk. 2004: 120--121). Secara makroskopik koloni *Fusarium* secara umum berwarna putih, krem, kekuningan, kecokelatan, atau kemerahan. Tekstur dari koloni *Fusarium* seperti kapas (*woolly* atau *cottony*) (Koneman dan Roberts 1985: 91). *Fusarium* merupakan kapang yang berada pada fase anamorf. Genus teleomorf dari *Fusarium* antara lain adalah *Albonectria* Rossman & Samuels dan *Cosmospora* Rabenhorst. Fase teleomorf ditandai dengan adanya karpus seksual yang berbentuk *peritheciun* pada beberapa spesies (Samson dkk. 2004: 120).



Gambar 2.5.(7). Struktur morfologi *Fusarium* secara umum

[Sumber: Samson dkk. 2004: 79.]

Contoh genus kapang dari filum Zygomycota yang umum ditemukan antara lain adalah *Rhizopus* Ehrenb. dan *Mucor* Mich. *Rhizopus* dan *Mucor* merupakan kapang yang dapat menghasilkan spora seksual dan aseksual. Spora seksual berupa zigospora terbentuk dari pertemuan dua hifa dengan *matting type* yang berbeda. Spora aseksual berupa sporangiospora berada dalam sporangium. Sporangium melekat pada sporangiofor, yaitu hifa yang menopang sporangium (Benson 2001: 48--49). *Rhizopus* dan *Mucor* memiliki hifa yang tidak bersekat (*aseptate*) dan memiliki struktur seperti akar yang disebut rhizoid (Webster dan Weber 2007: 182). Pada *Mucor* terdapat percabangan pada sporangiofor (Samson dkk. 2004: 8).



Gambar 2.5.(8). Struktur umum *Mucor* dan *Rhizopus*

[Sumber: Benson 2001: 53.]

Selain dilakukan identifikasi dengan pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik, dapat dilakukan juga pengamatan karakter koloni atau secara makroskopik. Pengamatan morfologi secara makroskopik kapang dilakukan dengan mengamati karakteristik koloni suatu biakan, antara lain meliputi: warna dan struktur permukaan koloni; ada atau tidaknya tetes eksudat (*exudate drops*); ada atau tidaknya garis-garis radial (*radial furrow*) dari pusat ke arah tepi koloni; dan ada atau tidaknya lingkaran konsentris (zonasi). Pengamatan koloni dilakukan sejak awal penanaman hingga beberapa waktu tertentu, dan segala macam perubahan yang terjadi harus dicatat. Selain itu, dalam melakukan pengamatan morfologi kapang juga harus selalu memperhatikan medium yang dipakai, suhu inkubasi, dan umur biakan (Gandjar dkk. 1999: 4).

2.6. Metabolit Sekunder dari Fungi Endofit

Fungi secara umum melakukan metabolisme primer dan metabolisme sekunder. Metabolisme primer terdiri dari proses anabolisme dan katabolisme, memanfaatkan nutrien yang berasal dari lingkungannya untuk menghasilkan metabolit primer yang dibutuhkan bagi pertumbuhan fungi. Sebaliknya, senyawa metabolit sekunder yang berasal dari metabolisme sekunder merupakan senyawa tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan (Kavanagh 2005: 115). Metabolisme sekunder pada fungi secara umum terjadi pada saat fase pertumbuhan akan segera berakhir dan mulai memasuki fase stasioner. Metabolisme sekunder pada fungi juga diasosiasikan dengan proses diferensiasi dan sporulasi. Fase terjadinya metabolisme sekunder dikenal dengan istilah idiofase (Carlile 2001:516), sehingga metabolit sekunder disebut juga dengan *idiolite* (Lengeler dkk. 1999: 627). Menurut Devaraju dan Satish (2011:75), metabolit sekunder disekresikan oleh fungi secara ekstraselular.

Jalur pembentukan (*biosynthesis pathways*) metabolit sekunder sangat beragam, tergantung dari golongan senyawa yang dihasilkan. Terdapat tiga prekursor utama dalam pembentukan metabolit sekunder, yaitu asam shikimat, asam amino, dan asetil-CoA. Asam shikimat merupakan prekursor dari pembentukan berbagai senyawa aromatik, seperti asam amino aromatik, asam

sinamat, dan berbagai polifenol. Asam amino merupakan prekursor pembentukan senyawa-senyawa alkaloid, dan beberapa antibiotik seperti penisilin dan sefalosporin. Asetil-CoA merupakan prekursor dari pembentukan poliasetilen, prostaglandin, antibiotik makrosiklik, polifenol, dan isoprenoid (terpene, steroid, dan karotenoid) (Mann 1995: 7).

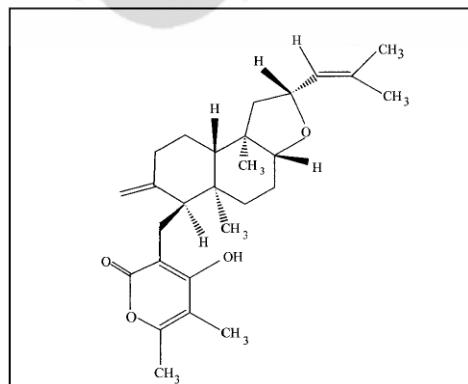
Jalur pembentukan metabolit sekunder pada fungi yang paling umum ditemukan adalah jalur pembentukan poliketida. Jalur pembentukan poliketida melibatkan asetil-CoA (asetat) sebagai prekursor. Pada jalur pembentukan tersebut, asetil-CoA sebagai prekursor mengalami karboksilasi dan membentuk malonil-CoA, selanjutnya tiga atau lebih molekul malonil-CoA berkondensasi dengan asetil-CoA dan membentuk rantai. Rantai tersebut kemudian membentuk struktur cincin (siklik) dan selanjutnya termodifikasi menjadi berbagai produk metabolit sekunder seperti antibiotik (griseofulvin dari *Penicillium griseofulvum*), aflatoksin (dari *Aspergillus flavus* dan *A. parasiticus*), dan mikotoksin (patulin dari *Penicillium patulum*). Jalur pembentukan lainnya adalah jalur pembentukan isoprenoid. Jalur pembentukan isoprenoid merupakan jalur biosintesis sterol yang juga melibatkan asetil-CoA sebagai prekursor. Tiga molekul asetil-CoA berkondensasi membentuk asam mevalonat. Asam mevalonat kemudian terkonversi menjadi unit isoprene yang selanjutnya terkondensasi membentuk rantai. Rantai tersebut mengalami serangkaian proses dan modifikasi menghasilkan metabolit sekunder, salah satunya adalah mikotoksin yang dihasilkan oleh *Fusarium* spp. (Deacon 2006: 133--136).

Senyawa-senyawa metabolit sekunder yang berasal dari golongan alkaloid, flavonoid, terpenoid, anthrakuinon, alifatik, dan senyawa bioaktif lainnya telah diisolasi dan dikarakterisasi dari fungi endofit (Agusta 2009: 34). Berbagai potensi metabolit sekunder yang dihasilkan oleh fungi dapat dimanfaatkan pada berbagai bidang, di antaranya bidang kedokteran dan farmasi (Strobel dan Daisy 2003: 493). Sebagai contoh adalah senyawa antimikroba, yang sangat berpotensi untuk dikembangkan menjadi bahan baku obat dari berbagai penyakit (Radji 2005: 114). Hingga saat ini, pencarian akan senyawa antimikroba baru masih terus dilakukan. Salah satu penyebabnya adalah berkurangnya efek dari obat-obatan (antibiotik) yang telah ada, seiring dengan terus berkembangnya resistensi

dari mikroorganisme penginfeksi (Strobel dan Daisy 2003: 491)

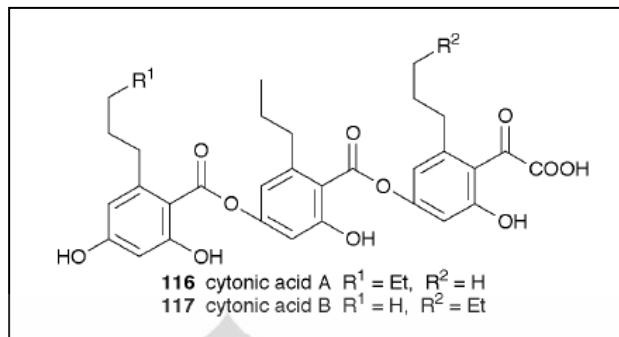
Berbagai penelitian mengenai kapang endofit yang memiliki aktivitas antimikroba telah dilaporkan. Simarmata dkk. (2007: 90) melaporkan bahwa beberapa isolat kapang endofit dari tanaman sambung nyawa (*Gynura procumbens*) mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme, yaitu khamir *C. albicans*, serta bakteri *E. coli* dan *B. subtilis*. Rubini dkk. (2005: 27) melaporkan bahwa kapang endofit *Gliocladium catenulatum* Gilman & Abbott dari tumbuhan *Theobroma cacao* L. berperan sebagai agen antifungi terhadap fungi patogen *Crinipellis perniciosa* (Stabel) Singer.

Kapang endofit juga mampu menghasilkan berbagai metabolit sekunder yang bersifat bioaktif, antara lain senyawa imunosupresif, senyawa antivirus, dan senyawa antikanker. Kapang endofit *Taxomyces andreanae* Strobel, A. Stierle, D. Stierle & W.M. Hess dari tumbuhan *Taxus brevifolia* Nutt, mampu menghasilkan senyawa paclitaxel, suatu senyawa antikanker. Kapang endofit *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas dari tumbuhan *Tripterigium wilfordii* mampu menghasilkan senyawa imunosupresif subglutinol A. Senyawa imunosupresif berpotensi dalam pengobatan penyakit-penyakit autoimun seperti *reumathoid arthritis* dan *insulin-dependent diabetes* (Strobel dan Daisy 2003: 498, 500). Kapang endofit *Cytonaema* sp. mampu menghasilkan senyawa antivirus *cytomic acid* A dan B. Senyawa tersebut merupakan *protease inhibitor* dan dapat menghambat *cytomegalovirus* (Guo dkk. 2000, lihat Radji 2005: 119).



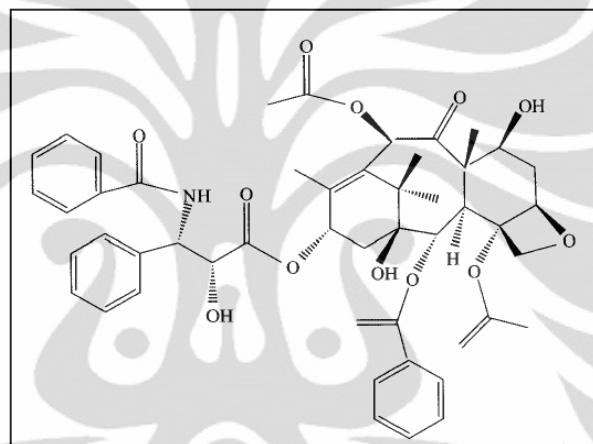
Gambar 2.6.(1). Subglutinol A, senyawa imunosupresan yang dihasilkan oleh kapang endofit *Fusarium subglutinans*

[Sumber: Strobel dan Daisy 2003: 500.]



Gambar 2.6.(2). *Cytonic acid A* dan *B*, senyawa antivirus yang dihasilkan oleh kapang endofit *Cytonaema* sp.

[Sumber: Tan dan Zou 2001: 457.]



Gambar 2.6.(3). Paclitaxel, senyawa antikanker yang dihasilkan oleh kapang endofit *Taxomyces andreanae*

[Sumber: Strobel dan Daisy 2003: 498.]

2.7. Senyawa Antimikroba

Salah satu jenis metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang endofit adalah senyawa antimikroba (Radji 2005: 114). Senyawa antimikroba merupakan senyawa kimia yang memiliki kemampuan dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Berbagai golongan senyawa antimikroba dari fungi endofit yang berhasil diperoleh antara lain: alkaloid, peptida, steroid, terpenoid, fenol, quinon, dan flavonoid (Yu dkk. 2010: 440)

2.7.1. Senyawa Antibakteri

Senyawa antibakteri merupakan senyawa antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Secara umum senyawa antibakteri dapat diklasifikasikan berdasarkan: spektrum aktivitas, efek terhadap bakteri, dan mekanisme kerja penghambatan (Giguére *dkk.* 2006: 3--5).

Berdasarkan spektrum aktivitasnya, senyawa antibakteri terbagi menjadi spektrum luas (*broad spectrum*) dan spektrum sempit (*narrow spectrum*). Senyawa antibakteri dengan spektrum luas mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif, sedangkan senyawa antibakteri dengan spektrum sempit hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif atau Gram positif (Giguére *dkk.* 2006: 5).

Berdasarkan efek terhadap bakteri, senyawa antibakteri dapat bersifat bakteriostatik dan bakterisidal. Bakteriostatik berarti senyawa antibakteri memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan sel, yaitu dengan menahan pertumbuhan bakteri pada fase stasioner. Bakterisidal berarti senyawa antibakteri memiliki kemampuan membunuh sel bakteri. Namun demikian, penentuan senyawa antibakteri bersifat bakteriostatik atau bakterisidal tidak absolut karena dipengaruhi berbagai faktor. Penentuan suatu senyawa antibakteri bersifat bakteriostatik atau bakterisidal dapat dipengaruhi oleh konsentrasi senyawa antibakteri, jumlah inokulum bakteri, dan lama pengujian (inkubasi) (Pankey dan Sabath 2004: 864--865).

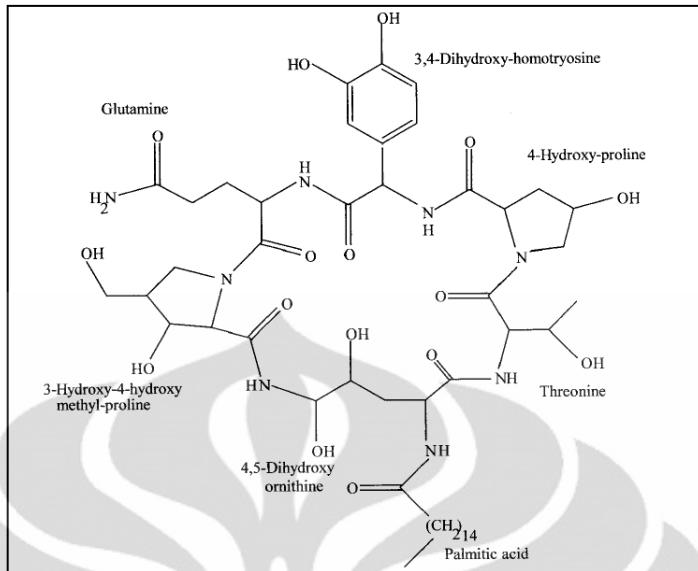
Mekanisme kerja penghambatan pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri terbagi menjadi empat cara, yaitu menghambat sintesis dinding sel, mengganggu fungsi membran sel, menghambat sintesis protein, dan menghambat sintesis asam nukleat (Black 1999: 342). Penghambatan sintesis dinding sel bakteri terjadi karena kelompok senyawa antimikroba yang memiliki struktur cincin β -laktam bekerja dengan mengikat enzim transpeptidase yang berperan dalam proses pembentukan dinding sel. Penghambatan dengan mengganggu fungsi membran sel bakteri terjadi karena senyawa antibakteri bekerja merusak lapisan fosfolipid sehingga sel mengalami kebocoran. Penghambatan sintesis protein pada bakteri terjadi karena beberapa senyawa antibakteri bekerja dengan

berikatan pada ribosom subunit 30S sehingga tidak dapat melekat pada subunit 50S. Hal tersebut dapat menghambat proses inisiasi dari sintesis protein. Penghambatan sintesis asam nukleat pada bakteri terjadi karena senyawa antibakteri bekerja dengan mengikat enzim RNA polimerase, sehingga mencegah produksi mRNA (Hogg 2005: 358--364).

2.7.2. Senyawa Antifungi

Senyawa antifungi merupakan senyawa antimikroba yang mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan fungi (khamir dan kapang). Fungi merupakan mikroorganisme eukariotik, sehingga mekanisme kerja dari senyawa antifungi berbeda dengan senyawa antibakteri. Sebagian besar obat-abatan antifungi yang umum digunakan (*polyene, azole*) bekerja dengan merusak fungsi membran sel, yaitu melalui pengikatan pada ergosterol yang terdapat pada membran sel fungi (Giguére dkk. 2006: 8). Mekanisme penghambatan juga dapat terjadi dengan cara menghambat sintesis dinding sel, yaitu dengan menghambat biosintesis glukan yang merupakan salah satu komponen penyusun dinding sel fungi (Tortora dkk. 2010: 569).

Kemampuan kapang endofit sebagai penghasil senyawa antifungi telah dilaporkan. Kapang endofit *Cryptosporiopsis quercina* dari tumbuhan *Trypterygium wilfordii* dilaporkan menghasilkan senyawa *cryptocandin* (Gambar 2.5.2) yang mampu menghambat pertumbuhan patogen *C. albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* (C.P. Robin) R. Blanch, dan *T. rubrum* (Castell.) Sabour. (Strobel dan Daisy 2003: 495). *Cryptocandin* merupakan senyawa antifungi yang berasal dari golongan yang sama dengan senyawa *echinocandin* (Strobel dkk. 1999: 1925), yaitu antifungi yang bekerja menghambat sintesis dinding sel fungi (Tortora dkk. 2010: 569).



Gambar 2.7.2. *Cryptocandin*, senyawa antifungi yang dihasilkan oleh kapang endofit *Cryptosporiopsis quercina*

[Sumber: Strobel dan Daisy 2003: 496.]

2.8. Ekstraksi Metabolit Sekunder

Ekstraksi merupakan proses pelarutan senyawa kimia yang bersifat terlarut dari bahan yang tidak terlarut menggunakan pelarut cair. Ekstraksi dapat menggunakan beberapa pelarut yang berbeda kepolarannya untuk memisahkan suatu senyawa antimikroba yang diinginkan dari senyawa kimia lainnya. Perbedaan kepolaran tersebut merepresentasikan sifat kepolaran dari senyawa antimikroba yang diperoleh (Macek 1983, lihat Muliana 2007: 13). Menurut Rydberg (2004: 3), terdapat beberapa faktor yang memengaruhi ekstraksi seperti interaksi antara pelarut dan zat terlarut; aktivitas larutan pada fase cair; dan jenis pelarut organik yang digunakan.

Proses ekstraksi untuk mendapatkan senyawa antimikroba dari fungi endofit telah dilaporkan dalam beberapa penelitian. Praptiwi *dkk.* (2009: 1) dalam penelitiannya menggunakan pelarut etil asetat dan berhasil mengekstraksi senyawa antimikroba fungi endofit dari tumbuhan kayu kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr.). Penelitian yang dilakukan Tong *dkk.* (2011: 831) menggunakan pelarut metanol untuk mengekstraksi senyawa antimikroba fungi endofit dari tumbuhan kumis kucing (*Ortosiphon stamineus* Benth.). Ekstraksi senyawa

lovastatin dari kapang *Aspergillus terreus* Thom. dilaporkan oleh Férron dkk. (2005: 2). Proses ekstraksi tersebut menggunakan pelarut etil asetat dan dilakukan pada potongan medium agar yang ditumbuhi kapang. Senyawa lovastatin diperkirakan berdifusi ke dalam medium agar dan penambahan pelarut etil asetat bertujuan untuk melarutkan senyawa lovastatin tersebut.

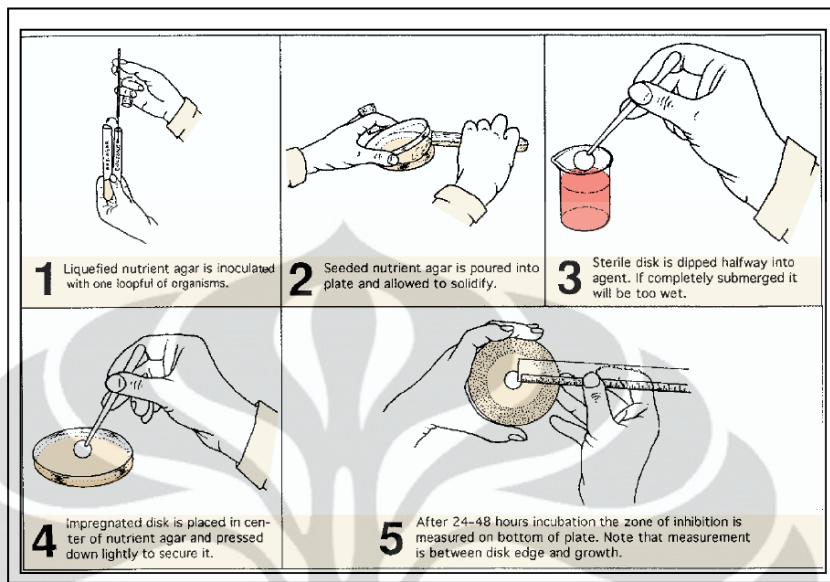
2.9. Pengujian Aktivitas Antimikroba

Salah satu pengujian aktivitas antimikroba adalah metode difusi agar cara cakram. Metode tersebut umum digunakan dalam pengujian aktivitas antimikroba karena penggerjaannya mudah dan relatif murah. Secara umum, metode tersebut dilakukan dengan cara meletakkan kertas cakram yang mengandung senyawa antibiotik atau antimikroba di atas medium agar yang telah diinokulasikan dengan mikroorganisme uji, dan kemudian diinkubasi pada kondisi yang sesuai (Collins dkk. 2004: 168--171).

Senyawa antimikroba yang terkandung dalam kertas cakram akan berdifusi ke segala arah (radial). Aktivitas antimikroba dari metode difusi agar cara cakram ditandai dengan terbentuknya zona hambat atau zona bening (*clear zone*) di sekitar cakram yang mengindikasikan terhambatnya pertumbuhan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba tersebut (Benson 2001: 143). Diameter zona hambat yang terbentuk menunjukkan aktivitas suatu senyawa antimikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Benson 2001: 145). Aktivitas suatu senyawa antimikroba juga dapat ditentukan dari jenis zona hambat yang terbentuk, yaitu dapat berupa zona hambat total dan zona hambat parsial (Madigan dkk. 2000: 751).

Zona total ditandai dengan zona hambat yang bening sempurna. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa antimikroba yang diuji mampu membunuh mikroorganisme sehingga tidak terdapat lagi pertumbuhan sel. Zona parsial ditandai dengan zona hambat yang tidak bening sempurna. Hal tersebut disebabkan masih terdapat pertumbuhan mikroorganisme. Zona hambat parsial menunjukkan bahwa senyawa antimikroba tidak mampu menghambat pertumbuhan seluruh mikroorganisme di sekitar cakram, sehingga masih terdapat

pertumbuhan koloni mikroorganisme (Poeloengan 2009: 65--66).



Gambar 2.9. Difusi Agar Cara Cakram

[Sumber: Benson 2001: 143.]

Aktivitas dari suatu senyawa antimikroba dalam membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme juga dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor lainnya. Faktor-faktor tersebut dapat berupa kemampuan difusi senyawa antimikroba, konsentrasi senyawa antimikroba yang terserap dalam kertas cakram, jumlah inokulum yang terkandung dalam medium, dan tipe medium (Benson 2001: 145).

Berbagai penelitian tentang pengujian aktivitas antimikroba menggunakan metode difusi agar cara cakram telah dilaporkan. Taqwim (2007: 36--38) melakukan uji antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil pengujian menggunakan metode difusi agar cara cakram menunjukkan 10 isolat kapang endofit dari tumbuhan *Garcinia forbesii* King memiliki aktivitas antibakteri yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar kertas cakram. Metode difusi agar cara cakram juga digunakan oleh Muliana (2007: 84--85) dan menunjukkan 4 isolat kapang serasah memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *B. subtilis*.

2.10. Mikroorganisme Uji

Mikroorganisme yang umum digunakan dalam pengujian aktivitas senyawa antimikroba antara lain adalah bakteri Gram negatif *Escherichia coli*, bakteri Gram positif *Bacillus subtilis*, dan khamir *Candida albicans*. Penggunaan mikroorganisme uji yang berasal dari kelompok berbeda dapat digunakan untuk mengetahui spektrum aktivitas dari suatu senyawa antimikroba (Giguére dkk. 2006: 5). Penggunaan *E. coli*, *B. subtilis*, dan *C. albicans* sebagai mikroorganisme uji telah banyak dilaporkan. Srimathi dkk. (2001: 13) menggunakan *E. coli* ATCC 25922 sebagai mikroorganisme uji untuk mengetahui aktivitas antimikroba yang dihasilkan *Chaetomium atrobrunneum* Ames. Kumala dkk. (2006: 46) menggunakan *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633, dan *C. albicans* ATCC 10231 sebagai mikroorganisme uji untuk mengetahui aktivitas antimikroba dari kapang endofit tumbuhan trengguli (*Cassia futula* L.).

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek berukuran $0,5 \mu\text{m} \times (1,0--3,0) \mu\text{m}$, mampu memfermentasi berbagai macam gula (glukosa, galaktosa, fruktosa, laktosa, maltosa) menghasilkan asam dan gas. Secara alami *E. coli* dapat ditemukan berada pada saluran pencernaan manusia (Salle 1954: 698). Secara biokimia, *E. coli* menunjukkan hasil positif dalam uji *Indol* dan *Methyl Red*, namun untuk uji *Voges Proskauer* dan uji sitrat hasilnya negatif (Barrow dan Feltham 1993: 135--136). *Escherichia coli* diketahui dapat menyebabkan infeksi pada saluran pencernaan manusia seperti penyakit diare dan muntah-muntah (Ryan dan Ray 2004: 356).

Bacillus subtilis merupakan bakteri Gram positif dan dapat memproduksi endospora. Bakteri tersebut berbentuk batang dan berukuran $(0,7--0,8) \mu\text{m} \times (2--3) \mu\text{m}$, koloni umumnya berwarna krem, permukaannya kusam, dan tepi koloni tidak rata. *Bacillus subtilis* hidup pada kondisi aerobik dan memiliki pH optimum 5,5--8,5. Kisaran suhu pertumbuhan *B. subtilis* adalah 5--55°C, dengan suhu optimum 20--45°C. *Bacillus subtilis* memiliki kemampuan memfermentasi glukosa menghasilkan asam dan asetoin, selain itu juga mampu menghidrolisis pati (Buchanan dan Gibbons 1974: 531--533). Bakteri tersebut diketahui sebagai penyebab kontaminasi dan kerusakan produk makanan (Collins dkk. 2004: 363).

Bacillus subtilis dapat menyebabkan infeksi pada mata, jaringan halus, dan paru-paru, namun hal tersebut relatif jarang terjadi (Ryan dan Ray 2004: 307).

Candida albicans berbentuk bulat hingga oval, memiliki diameter sel 3–6 μm dan memiliki koloni berwarna putih hingga krem (Barnett dkk. 2000: 130). Kisaran suhu untuk pertumbuhan *C. albicans* adalah 20–40°C, dan khamir tersebut dapat tumbuh pada lingkungan dengan kisaran pH 2–8. *Candida albicans* memiliki kemampuan memfermentasi berbagai jenis gula (glukosa, maltosa, sukrosa, dan xilosa) (Wilson 2005: 221). Khamir tersebut merupakan khamir dimorfik yang dapat tumbuh dalam fase uniselular atau fase filamen tergantung pada kondisi lingkungan sekitarnya (Mc Creath dkk. 1994: 2244). *Candida albicans* dapat menyebabkan infeksi pada rongga mulut, tenggorokan, vagina, dan kulit.

Penyakit infeksi yang disebabkan *Candida* disebut *candidosis* atau kandidiasis.

Candida albicans merupakan khamir oportunistik, dan keberadaannya tidak membahayakan apabila tubuh manusia dalam kondisi sehat (Spencer dan Spencer 1997: 61–62).

2.11. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Bioautografi

Kromatografi adalah sebuah teknik pemurnian biomolekul berdasarkan atas perbedaan interaksi molekul antara fase diam dan fase gerak (Sherma dan Fried 2003: 1). Metode kromatografi dapat dilakukan untuk proses pemisahan komponen-komponen dari suatu senyawa (Sudirman 2005: 67). Salah satu metode kromatografi yang dapat digunakan untuk proses pemisahan tersebut adalah kromatografi lapis tipis (KLT) atau *thin layer chromatography* (TLC). Kromatografi lapis tipis memisahkan komponen-komponen dari suatu senyawa berdasarkan perbedaan berat molekul dan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan (Sharma dkk. 2009: 24). Fase diam pada KLT berupa plat silika, sedangkan fase gerak berupa pelarut maupun campuran pelarut yang disebut eluen (Sherma dan Fried 2003: 1–3).

Pelarut atau eluen sebagai fase gerak berperan penting pada keberhasilan KLT. Kelarutan antara senyawa dengan eluen bergantung kepada sifat kepolaran dari masing-masing komponen. Pemilihan jenis-jenis eluen yang berbeda

kepolarnya dalam KLT dapat digunakan untuk menguji suatu senyawa yang belum diketahui identitasnya. Hal tersebut bertujuan untuk mengetahui polaritas dari suatu senyawa uji (Yulia 2005: 80).

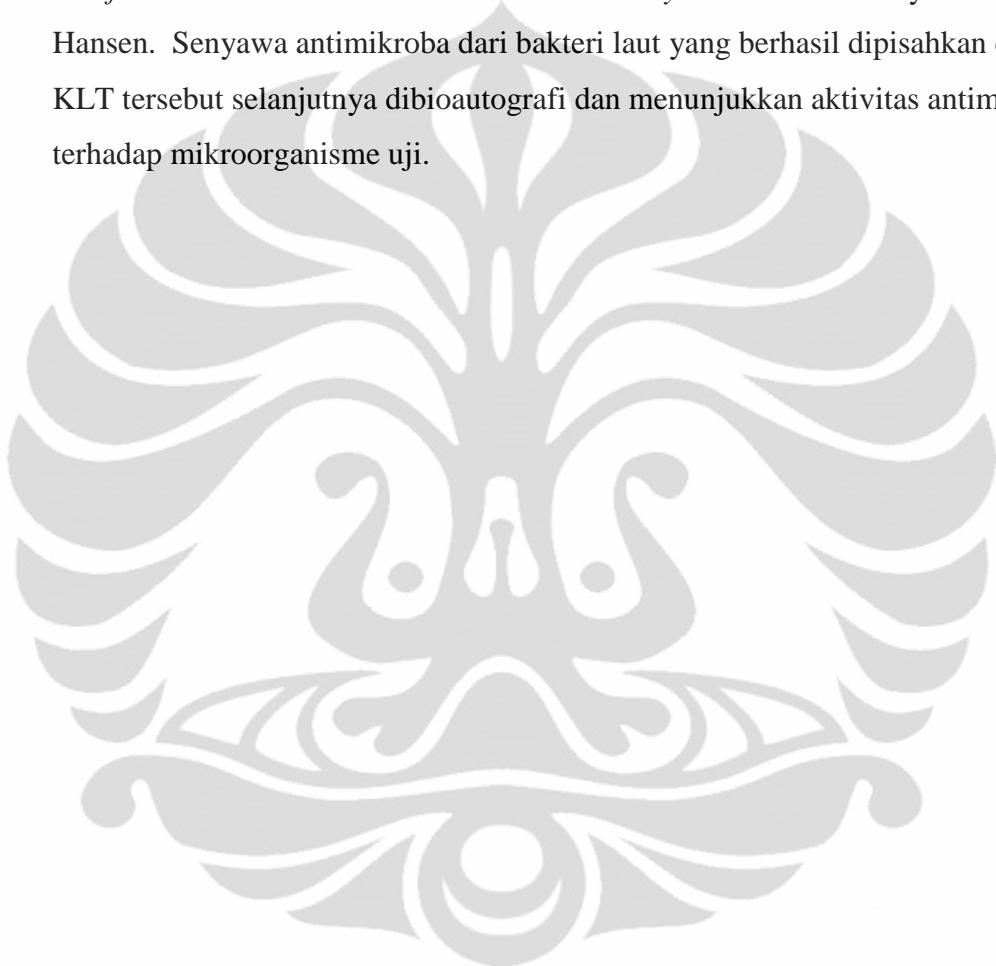
Senyawa antimikroba dari bahan alam pada umumnya merupakan senyawa yang tidak berwarna (Kusumaningtyas dkk. 2008: 77), sehingga diperlukan teknik visualisasi untuk mengetahui bercak yang terbentuk pada kromatogram. Teknik visualisasi dapat menggunakan pencahayaan sinar ultraviolet (UV) atau menggunakan reagen kimia. Visualisasi dengan sinar UV menggunakan sinar dengan panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Panjang gelombang 365 nm akan membuat komponen senyawa yang telah terpisah terlihat berwarna merah, kuning, hijau, biru, atau ungu, sedangkan pelat KLT yang menjadi latar belakang akan terlihat gelap (Sherma dan Fried 2003: 208 & 215).

Hasil KLT, namun demikian, tidak memberikan informasi mengenai komponen yang bersifat aktif pada senyawa antimikroba, sehingga perlu dikombinasikan dengan metode bioautografi (Sudirman 2006: 67). Metode bioautografi merupakan metode sederhana yang dapat digunakan untuk menunjukkan adanya aktivitas antimikroba. Metode tersebut menggabungkan penggunaan hasil teknik kromatografi dengan respon dari mikroorganisme yang diuji berdasarkan atas aktivitas biologi dari suatu sampel yang berupa antimikroba (Choma 2005: 1).

Metode bioautografi terbagi menjadi bioautografi kontak, bioautografi *agar overlay*, dan bioautografi langsung. Bioautografi kontak dilakukan dengan meletakkan hasil kromatogram suatu senyawa ke permukaan medium agar yang sudah mengandung mikroorganisme uji. Bioautografi *agar overlay* menggunakan lempeng kromatogram yang dilapisi medium agar cair yang berisi mikroorganisme uji. Bioautografi langsung dilakukan dengan menyemprot lempeng kromatogram dengan mikroba uji, dan selanjutnya diinkubasi. Zona hambat yang terbentuk divisualisasikan dengan menyemprotkan pewarna *tetrazolium dye* (Choma 2005: 1--2).

Masoko dan Eloff (2006: 1625) melaporkan penggunaan metode KLT-bioautografi untuk mendeteksi senyawa antifungi dari *Combretum* spp. terhadap *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill., *Aspergillus fumigatus*,

Microsporum canis (E. Bodin) E. Bodin, dan *Sporothrix schenckii* Hektoen & C.F. Perkins. Metode KLT-bioautografi juga digunakan oleh Zheng dkk. (2005: 204) untuk melakukan penapisan dan identifikasi senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh bakteri laut yang hidup berasosiasi dengan spons *Hymeniacidon perleve* (Montagu) terhadap *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *Agrobacterium tumifaciens* Smith & Townsend dan *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen. Senyawa antimikroba dari bakteri laut yang berhasil dipisahkan dengan KLT tersebut selanjutnya dibioautografi dan menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap mikroorganisme uji.



BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi dan Laboratorium *Center of Excellence for Indigenous Biological Resources-Genome Studies* (CoE IBR-GS), Depok mulai Februari hingga Mei 2011.

3.2. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf [Hirayama], oven [Heraeus], lemari pendingin [Gassio], kompor listrik [Sanyo], pemanas air [Sharp], timbangan digital [And EW-300 G], timbangan analitik [Sartorius], mikroskop cahaya [Boeco], mikroskop trinokular [Carl Zeiss], vorteks [Bio-Rad], *tube mixer* [Heidolph], bejana KLT, lampu UV (*handheld*), mikropipet [Gilson], tips mikropipet, tabung Eppendorf, tabung *polypropylene* [Iwaki], *transfer box*, erlenmeyer, gelas *beaker*, gelas ukur, jangka sorong, cawan Petri steril, tabung reaksi, rak tabung reaksi, jarum tanam tajam, jarum tanam bulat (ose), pipet, pinset, gunting, botol alkohol, dan pembakar spiritus.

3.3. Bahan

3.3.1. Sampel Tumbuhan

Sampel yang digunakan adalah daun tumbuhan *Broussonetia papyrifera* yang berasal dari Kota Bandung.

3.3.2. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah isolat-isolat kapang endofit dari daun *Broussonetia papyrifera* asal Desa Bejjong (Kota Mojokerto), berjumlah 3 isolat dengan kode ES1, ES2, dan ES3. Bakteri uji yang digunakan adalah *E. coli*

ATCC 25922 dan *B. subtilis* ATCC 6633, sedangkan khamir uji yang digunakan adalah *C. albicans* UICC Y-29.

3.3.3. Medium

Potato Dextrose Agar (PDA) digunakan untuk pertumbuhan dan pemeliharaan isolat kapang endofit. Medium *Nutrient Agar* (NA) digunakan untuk pertumbuhan dan medium uji untuk bakteri. Medium *Yeast Malt Agar* (YMA) digunakan untuk pertumbuhan dan medium uji untuk khamir. Medium *Plate Count Agar* (PCA) untuk purifikasi kapang endofit dan khamir uji.

3.3.4. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah NaOCl 1,78% [Bayclin], *lactophenol cotton blue* [Merck], tetrasiklin [Kimia Farma], kloramfenikol [Wako], nistatin [Pharos], alkohol 70% teknis, etanol 96% p.a. [Merck], aseton teknis, pelarut metanol 99,8% [Riedel-de Haën], pelarut n-heksana 99% [Merck], dan pelarut etil asetat 99,5% [Merck].

3.3.5. Bahan Habis Pakai

Bahan habis pakai yang digunakan adalah plastik tahan panas [Bell], masker, tissue gulung, kertas *Yellow Pages*, karet gelang, kertas saring, kertas cakram (*paper disk*) 6 mm [Fioroni], pelat KLT *Silica Gel* 60 F₂₅₄ [Merck].

3.4. Cara Kerja

Skema cara kerja penelitian terdapat pada lampiran 1--8.

3.4.1. Pembuatan Medium

3.4.1.1. *Potato Dextrose Agar (PDA)*

Pembuatan medium PDA berdasarkan instruksi pada kemasan. Medium PDA dibuat dengan melarutkan 39 g bubuk PDA dengan akuades hingga volume akhir mencapai 1 liter. Medium kemudian dipanaskan dengan penangas air hingga mendidih. Selanjutnya medium disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Medium yang telah steril disimpan pada suhu ruang hingga mengeras.

3.4.1.2. *Plate Count Agar (PCA)*

Pembuatan medium PCA berdasarkan instruksi pada kemasan. Medium PCA dibuat dengan melarutkan 23,5 g bubuk PCA dengan akuades hingga volume akhir mencapai 1 liter. Medium kemudian dipanaskan dengan penangas air hingga mendidih. Selanjutnya medium disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Medium yang telah steril disimpan pada suhu ruang hingga mengeras.

3.4.1.3. *Nutrient Agar (NA)*

Pembuatan medium NA berdasarkan instruksi pada kemasan. Medium NA dibuat dengan melarutkan 31 g bubuk NA dengan akuades hingga volume akhir mencapai 1 liter. Medium kemudian dipanaskan dengan penangas air hingga mendidih. Selanjutnya medium disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Medium yang telah steril disimpan pada suhu ruang hingga mengeras.

3.4.1.4. Yeast Malt Agar (YMA)

Pembuatan medium YMA berdasarkan Gandjar dkk. (1992: 83). Medium YMA dibuat dengan melarutkan *yeast extract* 3 g, *malt extract* 3 g, agar 15 g, pepton 5 g, glukosa 10 g, dengan akuades hingga volume akhir mencapai 1 liter. Medium kemudian dipanaskan dengan penangas air hingga mendidih. Selanjutnya medium disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Medium yang telah steril disimpan pada suhu ruang hingga mengeras.

3.4.2. Isolasi Kapang Endofit

Isolasi kapang endofit dari daun tanaman *B. papyrifera* menggunakan metode *surface sterilization* berdasarkan Wenny dan Dumroese (1987: 18--19). Tahap isolasi diawali dengan memotong sampel daun menjadi potongan-potongan kecil berukuran sekitar 1 cm² di dalam suatu cawan Petri steril. Selanjutnya potongan daun dimasukkan ke dalam tabung *polypropylene* steril dan ditambahkan 10 ml NaOCl 1,78% untuk kemudian divorteks selama 5 menit. Larutan NaOCl tersebut kemudian dibuang. Akuades steril ditambahkan ke dalam tabung *polypropylene* dan kembali divorteks selama 5 menit. Pembilasan dengan akuades steril tersebut diulang sebanyak 3 kali. Potongan daun ditiriskan di atas kertas saring untuk menyerap sisa air yang tertinggal, kemudian daun tersebut diletakkan di atas permukaan medium PCA dalam cawan petri. Cawan petri diinkubasi pada suhu ruang selama 4--7 hari hingga terdapat pertumbuhan koloni kapang endofit.

3.4.3. Pemurnian Mikroorganisme

Pemurnian biakan kapang, khamir, dan bakteri menggunakan metode *quadrant streak* berdasarkan Benson (2001: 85). Isolat dari *original culture* diinokulasi menggunakan jarum tanam tajam dengan cara digoreskan pada medium PCA (untuk kapang dan khamir), dan medium NA (untuk bakteri).

Biakan digoreskan pada empat kuadran medium. Jarum tanam tajam disterilkan menggunakan pembakar spiritus pada saat menggores dari satu kuadran ke kuadran lain. Medium-medium tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang dalam keadaan terbalik selama beberapa hari (untuk kapang hingga bersporulasi) dan diperoleh koloni tunggal yang representatif.

3.4.4. Pembuatan *Stock Culture* dan *Working Culture*

Pembuatan *stock culture* dan *working culture* dilakukan dengan menginokulasi koloni tunggal biakan kapang, khamir, dan bakteri hasil purifikasi ke dalam 4 tabung reaksi berisi medium agar miring. Medium yang digunakan adalah medium PDA untuk kapang, YMA untuk khamir, dan NA untuk bakteri. Inokulasi biakan kapang dengan metode *streak* menggunakan jarum tanam tajam. Inokulasi biakan khamir dan bakteri menggunakan jarum tanam bulat (ose). Keempat tabung reaksi berisi masing-masing biakan diinkubasi pada suhu ruang selama 4–7 hari untuk biakan kapang (hingga terjadi sporulasi), 48 jam untuk biakan khamir, dan 24 jam untuk biakan bakteri. Dua tabung biakan digunakan sebagai *working culture* dan disimpan pada suhu ruang, sedangkan dua tabung lainnya digunakan sebagai *stock culture* dan disimpan pada suhu 4°C dalam lemari pendingin.

3.4.5. Identifikasi Konvensional dengan Pengamatan Karakter Morfologi Kapang

Identifikasi kapang endofit dilakukan dengan pengamatan karakter morfologi kapang. Hal-hal yang perlu diamati pada pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik meliputi ada atau tidak, jenis, bentuk, dan ukuran spora seksual dan spora aseksual; struktur penghasil spora seksual dan spora aseksual; jenis hifa kapang, pigmentasi, dan pengukuran lebar hifa kapang; serta karakter lainnya. Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya atau mikroskop trinokular, diawali dari perbesaran terkecil hingga terbesar. Pengukuran dilakukan dengan mikrometer yang terdapat pada lensa okuler mikroskop cahaya,

atau dengan menggunakan program *Infinity Analyze* yang terhubung dengan mikroskop trinokular.

Pengamatan morfologi kapang secara makroskopik dilakukan sejak hari pertama penanaman pada medium PDA dalam cawan petri. Inokulasi kapang ke medium PDA dilakukan dengan teknik *stab*. Satu *stab* dilakukan pada pusat medium, sehingga akan dihasilkan satu koloni kapang. Pengamatan morfologi kapang secara makroskopik meliputi warna dan tekstur koloni, ada tidaknya tetes eksudat (*exudate drops*), sporulasi, zonasi, garis-garis radial (*radial furrow*), zona pertumbuhan (*growing zone*), serta pengamatan sebalik koloni (*reverse colony*). Hal-hal lain yang perlu dicatat dan diperhatikan adalah umur biakan, medium untuk pertumbuhan, dan suhu inkubasi.

Seluruh hasil pengamatan berupa deskripsi kapang selanjutnya dibandingkan dengan literatur atau monograf untuk mengetahui identitas kapang tersebut. Literatur yang digunakan antara lain: *Introduction of Food and Airborne-Fungi* oleh Samson dkk. (2004), *Practical laboratory mycology* oleh Koneman dan Roberts (1985), dan *Identification of common Aspergillus species* oleh Klich (2002).

3.4.6. Pengujian Aktivitas Antimikroba dengan Blok Agar

Isolat kapang endofit ditumbuhkan pada medium PDA dalam cawan Petri dan diinkubasi pada suhu ruang selama 4--7 hari (hingga sporulasi penuh). Selanjutnya medium agar yang ditumbuhi kapang endofit dipotong menjadi persegi empat berukuran 1 x 1 cm.

Sebanyak 0,2 ml kultur bakteri umur 24 jam atau khamir umur 48 jam dengan kepadatan 10^6 CFU/ml dicampurkan dengan 15 ml medium agar steril yang masih cair. Medium agar yang digunakan adalah medium NA untuk biakan bakteri dan YMA untuk biakan khamir. Selanjutnya campuran mikroorganisme dan medium dituang ke dalam cawan Petri dan dibiarkan mengeras.

Potongan agar berukuran 1 x 1 cm yang ditumbuhi kapang endofit segera diletakkan di atas medium NA atau YMA yang telah mengandung mikroorganisme uji. Selanjutnya cawan Petri diinkubasi pada suhu ruang selama

24 jam untuk bakteri dan 24--48 jam untuk khamir. Aktivitas antimikroba dari pengujian dengan blok agar ditandai dengan terbentuknya zona hambat disekitar potongan agar yang menunjukkan bahwa isolat kapang endofit tersebut memiliki aktivitas antimikroba.

3.4.7. Ekstraksi Senyawa Antimikroba dari Kapang Endofit

Ekstraksi senyawa antimikroba dilakukan berdasarkan Férron *dkk.* (2005: 125) dengan modifikasi. Modifikasi yang dilakukan adalah sebagai berikut: kapang endofit dengan aktivitas antimikroba hasil pengujian dengan blok agar ditanam pada seluruh permukaan medium PDA dalam cawan Petri dan diinkubasi selama 4--7 hari hingga bersporulasi. Kapang pada medium PDA dalam cawan Petri tersebut dipotong-potong dan dibagi menjadi tiga bagian sama banyak. Potongan agar kemudian dimasukkan ke dalam tiga tabung *polypropylene* dengan menggunakan spatula. Tiga mililiter pelarut (metanol, etil asetat, dan n-heksana) masing-masing dimasukkan ke dalam setiap tabung. Potongan agar yang mengandung kapang endofit kemudian dihaluskan dengan cara digerus menggunakan spatula. Selanjutnya ekstrak cair diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf. Ekstraksi diulang dengan menambahkan pelarut sebanyak 1 ml kedalam tabung *polypropylene* dan kembali dikocok menggunakan *tube mixer* selama 5 menit. Ekstrak cair kembali diambil sebanyak 0,5 ml ke dalam tabung Eppendorf. Selanjutnya tabung kembali dimasukkan pelarut 1 ml, dikocok dengan *tube mixer* selama 5 menit. Ekstrak cair diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf.

Ekstrak senyawa antimikroba kapang endofit tersebut kemudian didiamkan selama 2--3 jam sehingga terbentuk dua lapisan, yaitu ekstrak cair (pelarut yang mengandung senyawa antimikroba) dan lapisan padat yang berupa sisa biomassa. Ekstrak cair dipisahkan dari biomassa dengan memindahkannya ke dalam tabung Eppendorf baru.

3.4.7. Pengujian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kapang Endofit Terhadap Mikroorganisme Uji dengan Difusi Agar Cara Cakram

Pengujian aktivitas antimikroba menggunakan difusi agar cara cakram berdasarkan Benson (2001: 143). Mikroorganisme uji yang digunakan adalah bakteri Gram positif *B. subtilis*, bakteri Gram negatif *E. coli*, dan khamir *C. albicans*. Sebanyak 0,2 ml kultur bakteri atau khamir dengan kepadatan 10^6 CFU/ml dicampurkan dengan 15 ml medium agar steril. Medium yang digunakan adalah medium NA untuk biakan bakteri dan YMA untuk biakan khamir. Selanjutnya campuran mikroorganisme dan medium dimasukkan ke dalam cawan Petri dan dibiarkan mengeras. Medium agar kemudian dibagi menjadi 4 kuadran.

Paper disk steril berdiameter 6 mm dan berkapasitas 20 μ l dicelupkan ke dalam masing-masing ekstrak kapang endofit (ekstrak dalam metanol, etil asetat, dan n-heksana). Selanjutnya *paper disk* diletakkan secara aseptik pada kuadran 1 medium NA berisi bakteri uji atau medium YMA berisi khamir uji. Sebagai kontrol positif, pada kuadran 2 medium NA atau YMA diletakkan *paper disk* yang telah mengandung 20 μ l antibiotik tetrasiiklin 500 ppm untuk pengujian terhadap bakteri, atau nistatin 1.000 ppm untuk pengujian terhadap khamir. Sebagai kontrol negatif, pada kuadran 3 medium NA atau YMA diletakkan *paper disk* yang telah mengandung 20 μ l pelarut (metanol, etil asetat, atau n-heksana). Sebagai kontrol medium, pada kuadran 4 medium NA atau YMA diletakkan *paper disk* yang telah mengandung 20 μ l akuades steril. Pengulangan untuk setiap perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali. Inkubasi medium berisi mikroorganisme uji dilakukan pada suhu ruang (27°C) selama 24 jam untuk bakteri, atau 24–48 jam untuk khamir. Aktivitas antimikroba ditandai dengan terbentuknya zona hambat yang mengindikasikan terhambatnya pertumbuhan mikroorganisme oleh ekstrak kapang endofit tersebut. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur dengan jangka sorong. Indeks penghambatan dihitung berdasarkan Vilaseñor *dkk.* (2004):

$$\text{Indeks penghambatan} = \frac{\text{diameter zona hambat} - \text{diameter paper disk}}{\text{diameter paper disk}}$$

3.4.9. Pemisahan Senyawa Antimikroba dengan Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi senyawa antimikroba menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada pelat *silica gel* 60 F₂₅₄. Pelat KLT dipotong berukuran panjang 5 cm dan lebar 3 cm. Bagian bawah pelat ditandai dengan jarak 1 cm untuk batas bawah, dan 0,5 cm untuk batas atas dengan menggunakan pensil. Pada garis batas bawah ditandai sepanjang 1 cm sebagai tempat untuk menotolkan ekstrak sehingga terdapat tiga titik penotolan.

Sebanyak 5 μ l ekstrak kapang endofit yang memiliki aktivitas antimikroba ditotolkan pada setiap titik menggunakan mikropipet. Variasi eluen yang digunakan adalah pelarut tunggal n-heksana (non polar), etil asetat (semipolar), metanol (polar), etil asetat:metanol (7:3; 3:7), metanol:etil asetat:n-heksana (1:1:1). Pelat kemudian dimasukkan ke dalam bejana KLT berisi eluen selama beberapa menit hingga eluen mencapai batas atas, kemudian dikeringkan dan diamati di bawah sinar UV 365 nm. Bercak pada pelat diamati, nilai R_f (*retention factor*) dihitung berdasarkan Sherma dan Fried (2003: 5) dengan rumus:

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh senyawa}}{\text{Jarak tempuh pelarut}}$$

3.4.10. Bioautografi

Pengujian bioautografi menggunakan metode kerik dan metode *agar overlay* berdasarkan Choma (2005: 1). Bioautografi dengan metode kerik dilakukan dengan mengerik bercak pada pelat hasil KLT secara hati-hati. Hasil kerikan tersebut kemudian ditempatkan di atas medium agar yang mengandung mikroorganisme uji. Bioautografi dengan metode *agar overlay* dilakukan dengan menempatkan pelat hasil KLT pada dasar cawan petri. Selanjutnya cawan petri tersebut diisi dengan medium agar yang telah mengandung mikroorganisme uji. Medium-medium tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam untuk biakan bakteri dan 24–48 jam untuk biakan khamir. Aktivitas antimikroba diindikasikan dengan terbentuknya zona hambat pada sekitar hasil kerikan pelat KLT atau pada sekitar bercak hasil KLT.

3.4.11. Pengolahan dan Analisis Data

Data hasil penelitian berupa data kualitatif dan kuantitatif, dan disusun dalam bentuk tabel dan gambar. Data kualitatif meliputi hasil identifikasi konvensional berdasarkan pengamatan karakter morfologi kapang endofit, hasil pengamatan pengujian aktivitas antimikroba dengan blok agar, hasil pengamatan pengujian aktivitas antimikroba dengan difusi agar cara cakram, hasil pengamatan visualisasi KLT, dan hasil pengamatan bioautografi. Data kualitatif dianalisis secara deskriptif. Data kuantitatif meliputi hasil perhitungan diameter zona hambat pengujian aktivitas antimikroba dengan difusi agar cara cakram. Data kuantitatif dianalisis dengan standar deviasi.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Isolasi Kapang Endofit dari Daun *Broussonetia papyrifera*

Isolasi kapang endofit dari daun tumbuhan *Broussonetia papyrifera* asal Kota Bandung menggunakan metode *surface sterilization* pada medium PCA menghasilkan koloni kapang yang tumbuh pada potongan daun. Koloni tersebut berwarna hijau lumut. Diperkirakan koloni tersebut merupakan koloni kapang endofit karena tumbuh pada potongan daun yang telah disterilkan permukaannya. Koloni tersebut diberi kode isolat ES4 dan selanjutnya diinokulasi ke medium agar lain untuk dilakukan pemurnian.



Gambar 4.1. Hasil isolasi kapang endofit dari daun tumbuhan *Broussonetia papyrifera* asal Kota Bandung

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Proses *surface sterilization* menggunakan natrium hipoklorit (NaOCl) 1,78% sebagai disinfektan bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme epifit dari permukaan sampel daun. Menurut Valera dkk. (2009: 557), natrium hipoklorit bekerja mengoksidasi enzim-enzim penting dalam proses metabolisme

sel mikroorganisme. Selain itu klorin juga bekerja dengan berikatan dengan komponen sitoplasma sel mikroorganisme, menghasilkan senyawa N-kloro yang bersifat toksik dan merusak sel mikroorganisme. Menurut Estrela *dkk.* (2002: 114), senyawa klorin dapat bereaksi dengan asam amino menghasilkan kloramin. Kloramin tersebut bersifat oksidatif dan dapat bersifat toksik sehingga menyebabkan kematian pada sel. Berdasarkan hal-hal tersebut, dapat diperkirakan bahwa penggunaan natrium hipoklorit telah menghilangkan mikroorganisme epifit dan koloni yang tumbuh pada permukaan medium agar di sekitar potongan daun memang merupakan koloni kapang endofit.

Penggunaan metode *surface sterilization* telah dilaporkan pada beberapa publikasi. Caruso *dkk.* (2000: 3) berhasil mengisolasi sebanyak 150 isolat kapang endofit dari tumbuhan *Taxus baccata* dan *Taxus brevifolia*. De Errasti *dkk.* (2010: 29) melaporkan penggunaan metode *surface sterilization* untuk mengisolasi kapang endofit dari batang tumbuhan *B. papyrifera* di Argentina dan berhasil memperoleh 75 strain kapang endofit.

4.2. Identifikasi Konvensional Berdasarkan Karakter Morfologi Kapang

Identifikasi konvensional kapang endofit dilakukan dengan pengamatan karakter morfologi. Berdasarkan hasil pengamatan karakter morfologi, terlihat bahwa empat kapang endofit yang diisolasi dari daun *B. papyrifera* asal Desa Beijijong (isolat ES1, ES2, dan ES3) dan Kota Bandung (isolat ES4) memiliki karakteristik yang berbeda-beda dan diidentifikasi sebagai kapang *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* (isolat ES1 dan ES4), *Fusarium equiseti* (isolat ES2), dan *Cladosporium macrocarpum* (isolat ES3). Hasil identifikasi berdasarkan karakter morfologi kapang endofit adalah sebagai berikut.

4.2.1. *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES1 dan ES4

Pengamatan karakter morfologi dilakukan pada isolat kapang endofit ES1 dan ES4 berumur 7 hari, pada medium PDA, di suhu ruang. Berdasarkan hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik kapang endofit ES1 dan ES4, struktur reproduksi seksual tidak ditemukan. Hal tersebut menunjukkan bahwa

kapang endofit ES1 dan ES4 berada pada fase anamorf. Selain itu ditemukan struktur spora aseksual (konidia), fialid, vesikel, konidiofor, dan hifa.

Berdasarkan hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik, koloni kapang endofit ES1 dan ES4 berwarna hijau *olive* dan bertekstur granular. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kapang endofit ES1 dan ES4 termasuk ke dalam genus *Aspergillus* sesuai dengan deskripsi karakter kapang *Aspergillus* oleh Samson *dkk.* (2004: 64) dalam *Introduction to Food and Airborne-Fungi*.

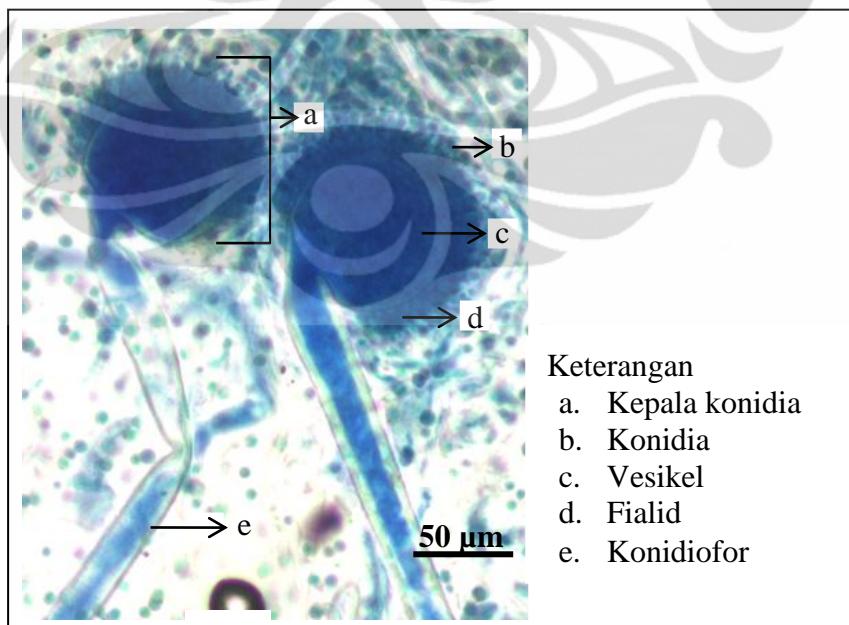
Menurut Samson *dkk.* (2004: 64), kapang *Aspergillus* berasal dari filum *Ascomycota*, memiliki spora aseksual atau konidia yang dihasilkan oleh sel konidiogenus (fialid). Fialid dapat melekat pada metula (sterigmata biseriat), atau langsung melekat pada bagian ujung dari konidiofor yang mengalami pembengkakan atau disebut vesikel (sterigmata uniseriat). Menurut Koneman dan Roberts (1985: 86), *Aspergillus* sp. memiliki variasi warna koloni dari kuning, hijau, kebiruan, putih, hingga hitam.

Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dari *Aspergillus* sp. ES1 berumur 7 hari, pada medium PDA, di suhu ruang, memperlihatkan struktur-struktur sebagai berikut: konidia berupa sel tunggal dan berbentuk bulat dengan ukuran diameter berkisar 4,41--9,64 μm . *Aspergillus* sp. ES1 memiliki konidia, fialid, dan vesikel sehingga tipe sterigmata adalah uniseriat. Kepala konidia berbentuk semibulat hingga bulat, *3/4 fertile*, dan berukuran (60,8--155,2)x(61,9--176,2) μm . Jenis hifa *Aspergillus* sp. ES1 adalah hifa *septate* atau hifa bersekat. Hifa tidak berwarna (hialin) atau apabila diberi *lactophenol cotton blue* akan berwarna biru. Ukuran lebar hifa berkisar 10,6--34,5 μm . Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik kapang endofit *Aspergillus* sp. ES1 dapat dilihat pada Tabel 4.2.1. dan Gambar 4.2.1.(1).

Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik dari *Aspergillus* sp. ES1 adalah sebagai berikut: warna koloni adalah hijau lumut 168 (standar warna pada lampiran 9) dan telah bersporulasi. Sebalik koloni tidak berwarna (hialin). Koloni bertekstur granular atau *granulose*. Terdapat zonasi, *growing zone*, dan *exudate drops*. Tidak terdapat *radial furrow*. Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik kapang endofit *Aspergillus* sp. ES1 dapat dilihat pada Tabel 4.2.1. dan Gambar 4.2.1.(2).

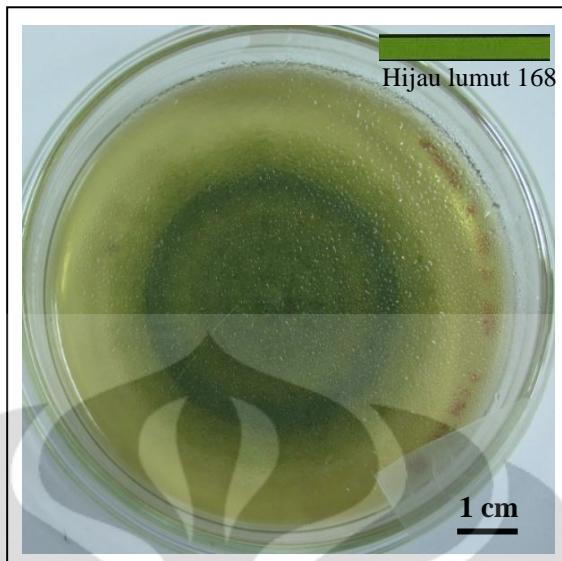
Tabel 4.2.1. Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dan makroskopik dari *Aspergillus* sp. ES1 dan *Aspergillus* sp. ES4 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang

Karakter Morfologi	Kapang Endofit	
	<i>Aspergillus</i> sp. ES1	<i>Aspergillus</i> sp. ES4
Mikroskopik		
a. Spora seksual	Tidak ada	Tidak ada
b. Bentuk kepala konidia	Semibulat hingga bulat (60,8--155,2)x	Semibulat hingga bulat (68,1--110,7)x
c. Ukuran kepala konidia	(61,9--176,2) μm	(68,58--114,3) μm
d. Sterigmata	Uniseriat	Uniseriat
e. Bentuk konidia	Bulat	Bulat
f. Diameter konidia	4,41--9,64 μm	5,44--10,03 μm
g. Jenis hifa	Bersekat (<i>septate</i>)	Bersekat (<i>septate</i>)
h. Lebar hifa	10,6--34,5 μm	3,0--35,7 μm
Makroskopik		
a. Warna koloni	Hijau lumut	Hijau <i>sap</i>
b. Tekstur koloni	Granular	Granular
c. Sporulasi	Ada	Ada
d. Zonasi	Ada	Ada
e. <i>Exudate drops</i>	Ada	Tidak ada
f. <i>Radial furrow</i>	Tidak ada	Tidak ada
g. <i>Growing zone</i>	Ada	Tidak ada
h. Warna sebalik koloni	Tidak berwarna (hialin)	Tidak berwarna (hialin)



Gambar 4.2.1.(1). Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dari *Aspergillus* sp. ES1 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

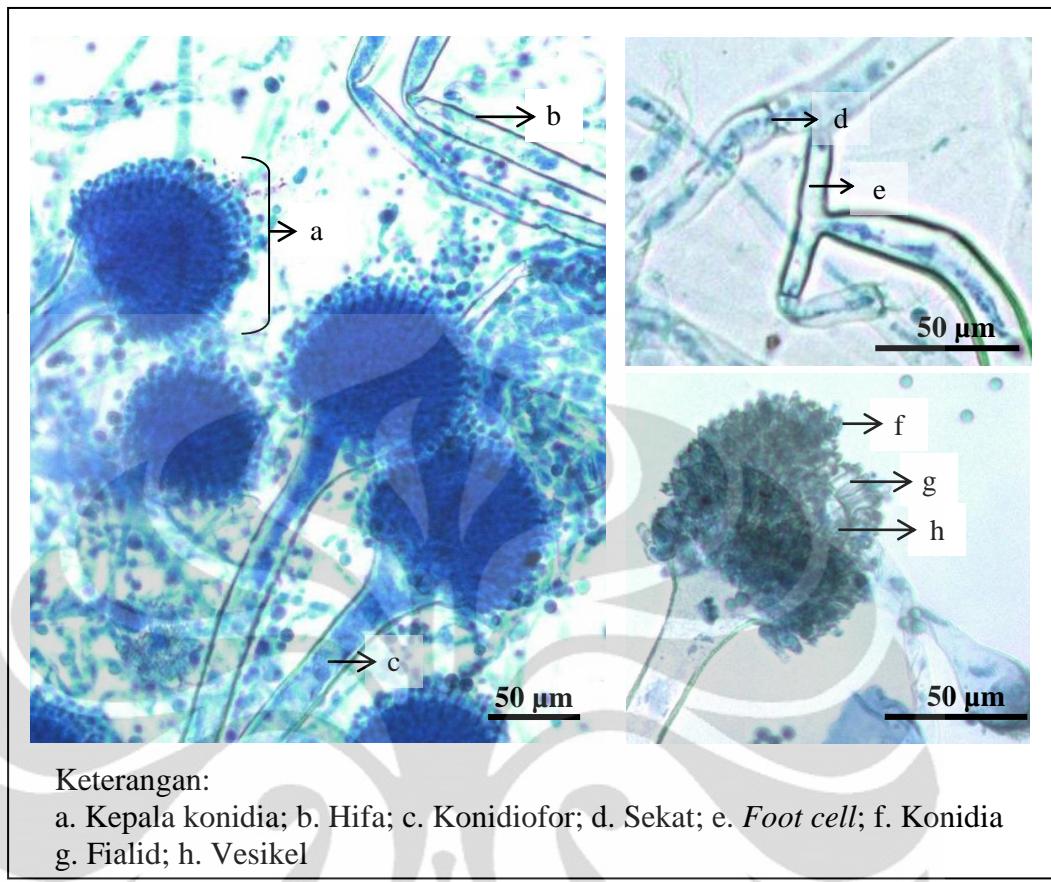


Gambar 4.2.1.(2). Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik dari *Aspergillus* sp. ES1 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dari *Aspergillus* sp. ES4 berumur 7 hari, pada medium PDA, di suhu ruang, memperlihatkan struktur-struktur sebagai berikut: konidia berupa sel tunggal dan berbentuk bulat dengan ukuran diameter berkisar 5,44--10,03 μm . *Aspergillus* sp. ES4 memiliki konidia, fialid, dan vesikel sehingga tipe sterigmata adalah uniseriat. Kepala konidia berbentuk semibulat hingga bulat, *3/4 fertile*, dan berukuran (68,58--114,3)x(68,1--110,7) μm . Hifa dari *Aspergillus* sp. ES4 memiliki sekat, tidak berwarna (hialin), dan berukuran lebar 3,0--35,7 μm . Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik *Aspergillus* sp. ES4 dapat dilihat pada Tabel 4.2.1 dan Gambar 4.2.1.(3).

Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik dari *Aspergillus* sp. ES4 adalah sebagai berikut: koloni berwarna hijau *sap* (standar warna pada Lampiran 9) dan telah bersporulasi. Sebalik koloni tidak berwarna. Koloni bertekstur granular atau *granulose*. Terdapat zonasi pada koloni dan sebalik koloni. Tidak terdapat *exudate drops*, *radial furrow*, dan *growing zone*. Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik kapang endofit *Aspergillus* sp. ES4 dapat dilihat pada Tabel 4.2.1 dan Gambar 4.2.1.(4).



Gambar 4.2.1.(3). Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dari *Aspergillus* sp. ES4 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.2.1.(4). Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik dari *Aspergillus* sp. ES4 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil identifikasi berdasarkan karakter morfologi, diduga *Aspergillus* sp. ES1 dan *Aspergillus* sp. ES4 mendekati karakter morfologi *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* seperti yang dideskripsikan oleh Klich (2002: 3–4) pada *Identification of Common Aspergillus Species*. Menurut Klich (2003: 5), *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* memiliki konidia yang umumnya berwarna hijau kekuningan hingga hijau *olive* kecokelatan; vesikel berbentuk bulat (*spherical*); dan memiliki tipe kepala konidia uniseriat atau biseriat.

Koneman dan Roberts (1985: 84) menyatakan kapang *Aspergillus* dapat ditemukan pada berbagai substrat, seperti permukaan biji-bijian permukaan tanah, dan permukaan daun. Verma dkk. (2010: 33) melaporkan bahwa ditemukan kapang endofit *Aspergillus clavatus* Desm. dari batang tumbuhan *Azadirachta indica* A. Juss. Kusari dkk. (2009: 1019) juga melaporkan bahwa ditemukan kapang endofit *Aspergillus fumigatus* dari tumbuhan *Juniperus communis* L.

4.2.2. *Cladosporium macrocarpum* ES3

Pengamatan karakter morfologi dilakukan pada isolat kapang endofit ES3 yang berumur 7 hari, pada medium PDA, di suhu ruang. Berdasarkan hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik kapang endofit ES3, struktur reproduksi seksual tidak ditemukan. Hal tersebut menunjukkan bahwa kapang endofit ES3 berada pada fase anamorf. Selain itu ditemukan struktur konidia, konidiofor, dan hifa. Secara makroskopik, koloni kapang endofit ES3 berwarna hitam dan bertekstur seperti beludru. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kapang endofit ES3 termasuk ke dalam genus *Cladosporium* sesuai dengan deskripsi karakter kapang *Cladosporium* oleh Samson dkk. (2004: 107) dalam *Introduction to Food and Airborne-Fungi*. Menurut Samson dkk. (2004: 107), kapang *Cladosporium* berasal dari filum *Ascomycota*. Secara mikroskopik *Cladosporium* memiliki konidia yang tersusun membentuk rantai dan dihasilkan oleh sel konidiogenus. Sebagian besar *Cladosporium* memiliki warna koloni gelap dan bertekstur *velvety*, *floccose*, atau *powdery*.

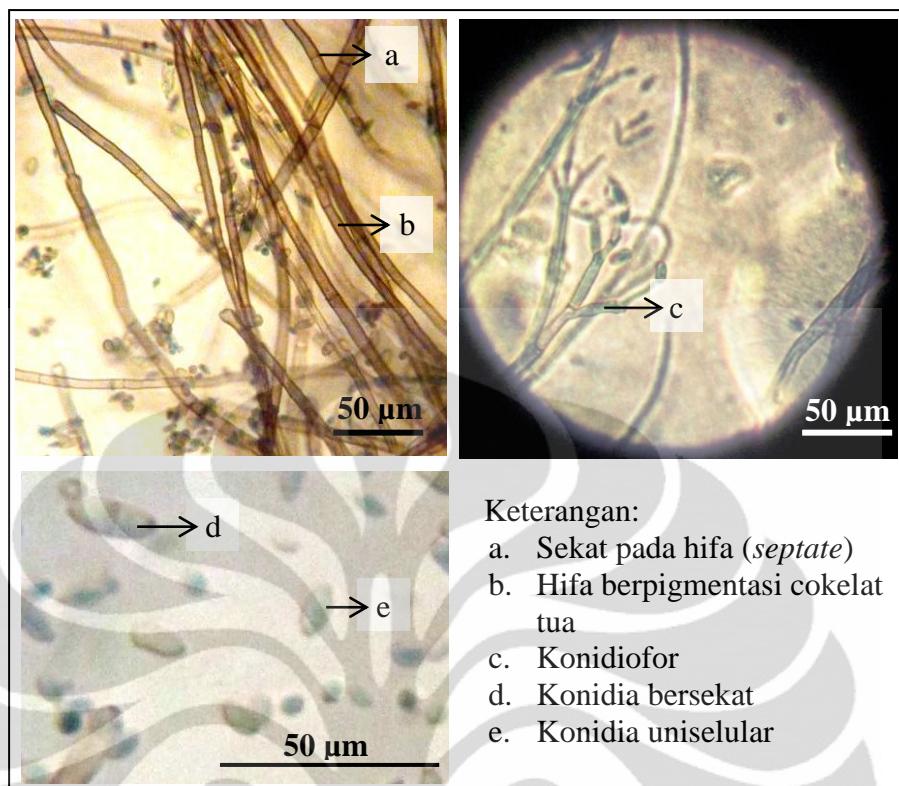
Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik *Cladosporium* sp. ES3 berumur 7 hari yang ditumbuhkan pada medium PDA dan diinkubasi

pada suhu ruang menunjukkan terdapat konidia uniselular, berbentuk elips, dan terdapat penebalan pada kedua polarnya. Konidia berukuran $(3,6--9,11)\times(8,60--22,7)$ μm . Selain konidia uniselular, ditemukan juga konidia yang memiliki septa dan berukuran lebih besar. Hifa *Cladosporium* sp. ES3 berwarna cokelat tua, bersekat (*septate*) dan berukuran lebar $3,32--14,64$ μm . Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik *Cladosporium* sp. ES3 dapat dilihat pada Tabel 4.2.2 dan Gambar 4.2.2.(1).

Berdasarkan hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik, koloni *Cladosporium* sp. ES3 berdiameter $2,6--2,8$ cm dan berwarna hitam 199 (standar warna pada Lampiran 9). Tekstur koloni yaitu *velvety* atau menyerupai beludru. Terdapat *growing zone* yang berwarna putih dan zonasi. *Exudate drops* tidak ditemukan. Sebalik koloni berwarna hitam 199 (standar warna pada Lampiran 9). *Radial furrow* terlihat pada sebalik koloni, namun tidak ada pada tampak depan koloni. Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik *Cladosporium* sp. ES3 dapat dilihat pada Tabel 4.2.2 dan Gambar 4.2.2.(2).

Tabel 4.2.2. Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dan makroskopik dari *Cladosporium* sp. ES3 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang

Karakter Morfologi	<i>Cladosporium</i> sp. ES3
Mikroskopik	
a. Spora seksual	Tidak ditemukan
b. Bentuk konidia	Elips, uniselular, terdapat penebalan di kedua polar; terdapat konidia bersekat $(3,6--9,11)\times(8,60--22,7)$ μm
c. Ukuran konidia	
d. Jenis hifa	Bersekat (<i>septate</i>)
e. Lebar hifa	$3,35--12,39$ μm
f. Pigmentasi hifa	Cokelat tua (gelap)
g. Karakter lain	Konidiofor
Makroskopik	
a. Warna koloni	Hitam
b. Tekstur koloni	<i>Velvety</i>
c. Sporulasi	Ada
d. Zonasi	Ada
e. <i>Exudate drops</i>	Tidak ada
f. <i>Radial furrow</i>	Ada (Sebalik koloni)
g. <i>Growing zone</i>	Ada
h. Warna sebalik koloni	Hitam

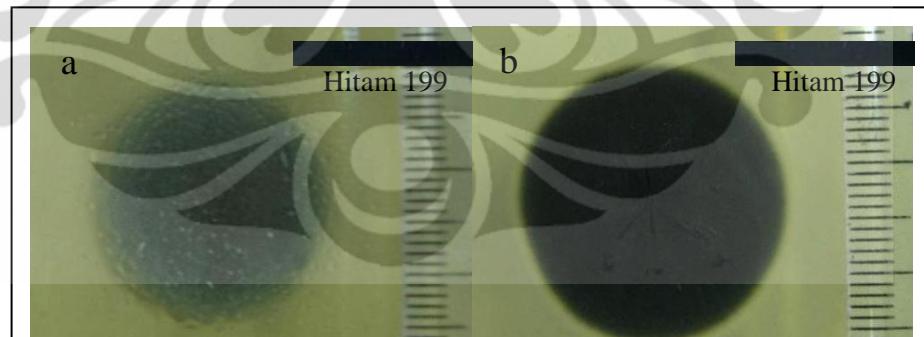


Gambar 4.2.2.(1). Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dari *Cladosporium* sp. ES3 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Keterangan:

- a. Sekat pada hifa (*septate*)
- b. Hifa berpigmentasi cokelat tua
- c. Konidiofor
- d. Konidia bersekat
- e. Konidia uniselular



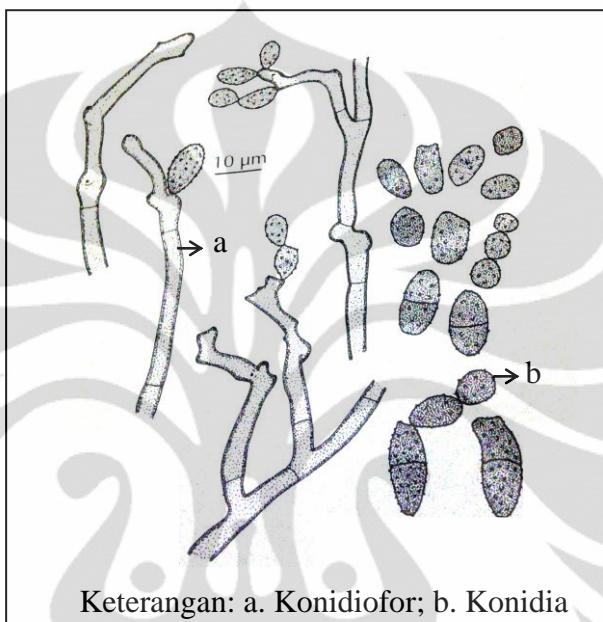
Keterangan: a. Tampak depan koloni; b. Sebalik koloni

Gambar 4.2.2.(2). Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik *Cladosporium* sp. ES3 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Berdasarkan hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dan makroskopik yang diperoleh, diduga karakter morfologi kapang endofit *Cladosporium* sp. ES3 mendekati karakter morfologi spesies *Cladosporium*

macrocarpum Preuss seperti yang dideskripsikan oleh Samson dkk. (2004: 112). Berdasarkan Samson dkk. (2004: 112), *Cladosporium macrocarpum* memiliki konidiofor yang bercabang simpodial; konidiofor dan hifa berwarna cokelat; konidia dapat membentuk rantai, berbentuk elips, memiliki 0–3 septa, namun yang banyak ditemukan berupa sel tunggal.



Gambar 4.2.2.(3). Struktur *Cladosporium macrocarpum*

[Sumber: Samson dkk. 2004: 112. Dengan modifikasi.]

Kapang *Cladosporium* umum ditemukan sebagai patogen atau saprofit pada tanaman. Devarajan dan Suryanarayanan (2002: 74) melaporkan bahwa ditemukan kapang endofit *Cladosporium cladosporioides* dari rumput laut *Halophila ovalis*. Zhang dkk. (2009: 227) melaporkan bahwa ditemukan kapang endofit *Cladosporium cladosporioides* dari tumbuhan *Taxus* spp.

4.2.3. *Fusarium equiseti* ES2

Pengamatan karakter morfologi dilakukan pada kapang endofit ES2 berumur 13 hari, pada medium PDA, di suhu ruang. Berdasarkan hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik kapang endofit ES2, struktur reproduksi seksual tidak ditemukan. Hal tersebut menunjukkan bahwa kapang

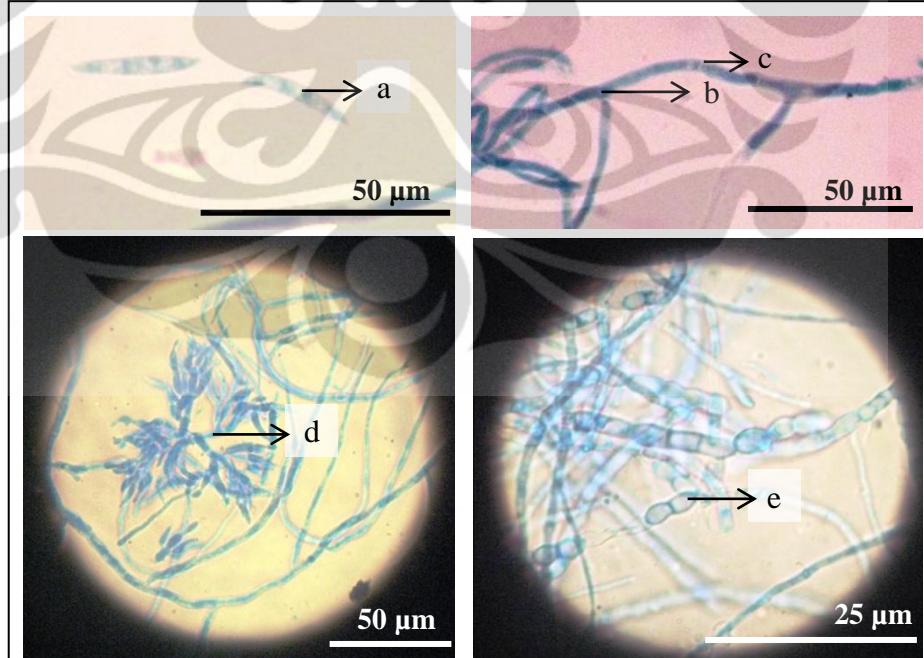
endofit ES3 berada pada fase anamorf. Selain itu ditemukan struktur makrokonidia, konidiofor, hifa, dan klamidospora. Secara makroskopik, koloni kapang endofit ES2 berwarna putih dan bertekstur seperti kapas. Hasil yang diperoleh menunjukkan kapang endofit ES2 termasuk ke dalam genus *Fusarium*. Karakter morfologi *Fusarium* sp. ES2 sesuai dengan deskripsi kapang *Fusarium* oleh Samson dkk. (2004: 120) dalam *Introduction to Food and Airborne-Fungi*. Menurut Samson dkk. (2004: 120) kapang *Fusarium* berasal dari filum *Ascomycota*. *Fusarium* memiliki makrokonidia multiselular (bersekat); dan berbentuk lurus atau melengkung menyerupai bentuk bulan sabit. Beberapa spesies *Fusarium* dapat menghasilkan struktur klamidospora. Menurut Gandjar dkk. (2006: 12), klamidospora merupakan jenis spora aseksual yang terbentuk dari suatu kompartemen hifa yang menerima nutrien berlebih dan membentuk dinding sel yang tebal. Menurut Samson dkk. (2004: 120), koloni *Fusarium* pada medium PDA berstruktur seperti kapas berwarna putih, krem, kekuningan, kecokelatan, atau kemerah.

Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik *Fusarium* sp. ES2 umur 13 hari, pada medium PDA, di suhu ruang menunjukkan *Fusarium* sp. ES2 memiliki konidia bersekat (multiselular) dan berukuran (4,40--9,21)x(26,4--50,17) μm . Jenis hifa *septate* atau bersekat, tidak berwarna (hialin), dan berukuran lebar 3,35--12,39 μm . Hifa dan konidiofor bercabang. Terdapat klamidospora yang tidak berwarna (hialin). Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik *Fusarium* sp. ES2 dapat dilihat pada Tabel 4.2.3 dan Gambar 4.2.3.(1).

Berdasarkan hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik, koloni *Fusarium* sp. ES2 berwarna putih 101 (standar warna pada Lampiran 9); bertekstur *woolly* atau menyerupai kapas. Koloni tersebut memiliki diameter sebesar 5,0--5,2 cm; sudah bersporulasi penuh; memiliki *growing zone*; dan terdapat *exudate drops* yang menyerupai kristal-kristal kecil. *Radial furrow* dan zonasi tidak tampak pada koloni. Sebalik koloni berwarna cokelat 182 (standar warna pada Lampiran 9). Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik *Fusarium* sp. ES2 dapat dilihat pada Tabel 4.2.3 dan Gambar 4.2.3.(2).

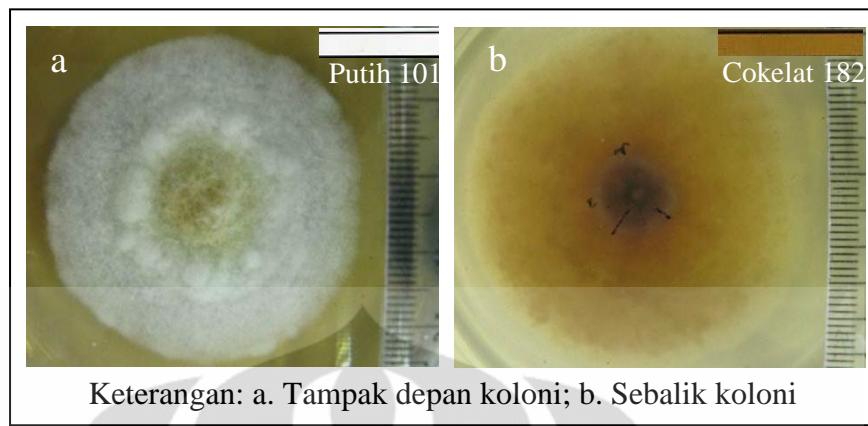
Tabel 4.2.3. Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dan makroskopik *Fusarium* sp. ES2 umur 13 hari pada medium PDA di suhu ruang

Karakter Morfologi	<i>Fusarium</i> sp. ES2
Mikroskopik	
a. Spora seksual	Tidak ditemukan
b. Bentuk konidia	Lurus atau sedikit melengkung, multiselular, dan bersekat
c. Ukuran konidia	(4,40--9,21)x(26,4--50,17) µm
d. Jenis hifa	Bersekat (<i>septate</i>), bercabang
e. Lebar hifa	3,35--12,39 µm
f. Pigmentasi hifa	Tidak berwarna (hialin)
g. Karakter lain	Klamidospora, konidiofor
Makroskopik	
a. Warna koloni	Putih
b. Tekstur koloni	Wooly
c. Sporulasi	Ada
d. Zonasi	Tidak ada
e. Exudate drops	Ada
f. Radial furrow	Tidak ada
g. Growing zone	Ada
h. Warna sebalik koloni	Cokelatan



Gambar 4.2.3.(1). Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dari *Fusarium* sp. ES2 umur 13 hari medium PDA di suhu ruang

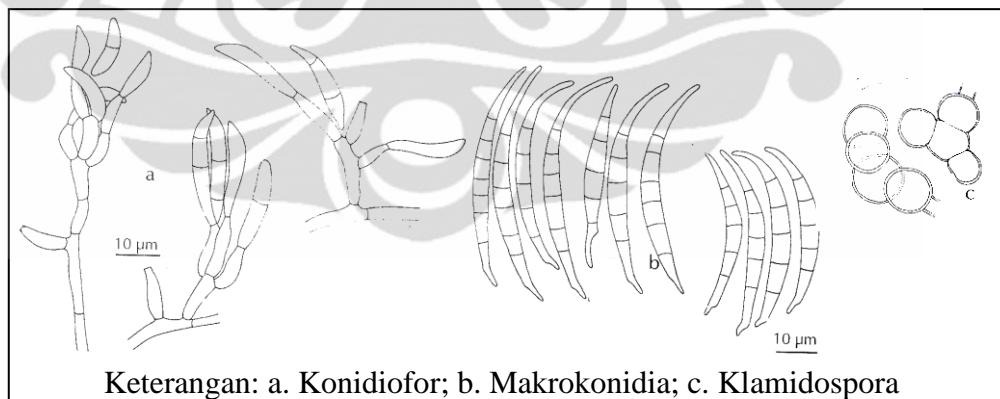
[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.2.3.(2). Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik *Fusarium* sp. ES2 umur 13 hari pada medium PDA di suhu ruang.

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Hasil identifikasi berdasarkan karakter morfologi, diduga *Fusarium* sp. ES2 memiliki/mendekati karakter morfologi spesies *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. seperti yang dideskripsikan oleh Samson dkk. (2004: 134). Berdasarkan Samson dkk. (2004: 134), *Fusarium equiseti* memiliki konidiofor yang bercabang; mikrokonidia tidak atau jarang ditemukan; makrokonidia berbentuk seperti bulan sabit, memiliki 3, 5, atau 7 sekat; dan memiliki klamidospora.



Gambar 4.2.3.(3). Struktur *Fusarium equiseti*

[Sumber: Samson dkk. 2004: 134. Dengan modifikasi.]

Menurut Samson dkk. (2004: 107), kapang *Fusarium* umum ditemukan sebagai patogen pada tanaman. Barik dkk. (2010: 8) melaporkan bahwa ditemukan spesies kapang *Fusarium oxysporum* yang diisolasi dari tumbuhan obat

Acorus calamus. Mwaura dkk. (2009: 1130) melaporkan bahwa kapang endofit *Fusarium oxysporum* diisolasi dari tumbuhan *Musa* spp. De Errasti dkk. (2010: 32) melaporkan bahwa ditemukan spesies kapang *Fusarium lateritium* yang diisolasi dari batang tumbuhan *Broussonetia papyrifera*.

4.3. Pengujian Aktivitas Antimikroba dengan Blok Agar

Pengujian menggunakan blok agar dilakukan untuk mengetahui kapang-kapang endofit yang memiliki aktivitas antimikroba. Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan pada blok agar *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES1 dan ES4, *Cladosporium macrocarpum* ES3, dan *Fusarium equiseti* ES2 yang telah bersporulasi terhadap mikroorganisme uji (*E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633, dan *C. albicans* UICC Y-29).

Hasil pengujian dengan blok agar (Tabel 4.3) menunjukkan dua dari total empat kapang endofit memiliki aktivitas antimikroba dan mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji, yaitu *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 dan *F. equiseti* ES2. *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap khamir *C. albicans* UICC Y-29, *F. equiseti* ES2 menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *B. subtilis* ATCC 6633, dan tidak ada kapang endofit yang menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri *E. coli* ATCC 25922. Aktivitas antimikroba ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar potongan agar.

Tabel 4.3. Hasil pengujian aktivitas antimikroba menggunakan blok agar terhadap mikroorganisme uji, inkubasi selama 24 jam di suhu ruang

Kapang Endofit	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> UICC Y-29
<i>Aspergillus</i> subgenus <i>Circumdati section Flavi</i> ES1	-	-	-
<i>Aspergillus</i> subgenus <i>Circumdati section Flavi</i> ES4	-	-	+ (P)
<i>Cladosporium macrocarpum</i> ES3	-	-	-
<i>Fusarium equiseti</i> ES2	-	+ (T)	-

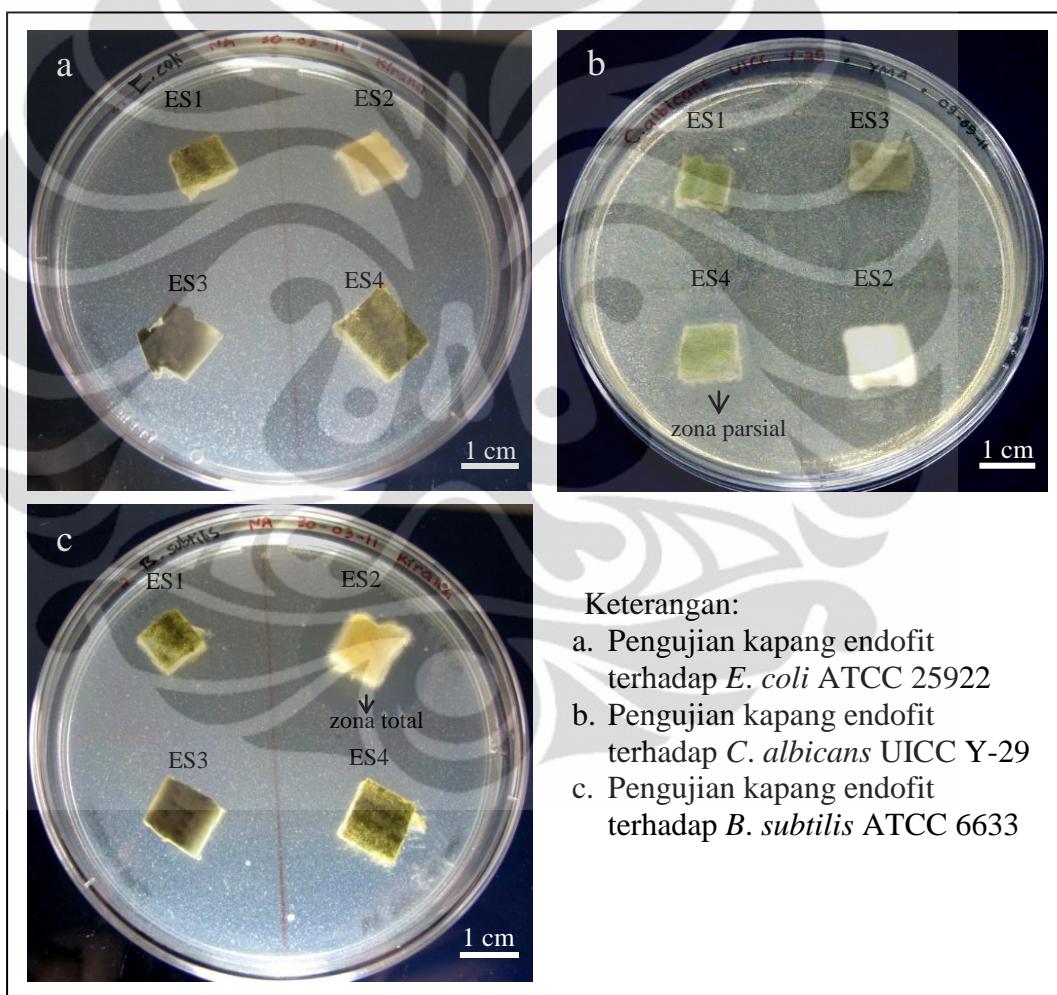
Keterangan:

+	= Terbentuk zona hambat	(T)	= Zona hambat total
-	= Tidak terbentuk zona hambat	(P)	= Zona hambat parsial

Zona hambat yang terbentuk disebabkan *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 dan *F. equiseti* ES2 yang telah bersporulasi mengindikasikan bahwa kapang tersebut menghasilkan metabolit sekunder secara ekstraselular melalui hifa berupa senyawa antimikroba yang berdifusi ke dalam medium agar dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji yang terkandung di dalamnya. Kapang endofit selama diinkubasi 7 hari pada suhu ruang, melakukan proses metabolisme untuk pertumbuhan. Kapang endofit selama fase pertumbuhan (fase log) melakukan proses metabolisme primer, memanfaatkan nutrien yang terkandung di dalam substrat, yaitu medium PDA untuk menghasilkan metabolit primer berupa karbohidrat, protein, lipid, dan asam nukleat yang dibutuhkan sebagai *building block*. Selanjutnya, saat memasuki fase stasioner kapang melakukan metabolisme sekunder dan menghasilkan metabolit sekunder. Menurut Carlile dkk. (2001: 513), kapang yang telah bersporulasi mengindikasikan bahwa kapang tersebut telah memasuki fase stasioner dan diperkirakan telah menghasilkan metabolit sekunder. Menurut Bérdy (2005: 1), berbagai metabolit sekunder yang dihasilkan kapang bersifat bioaktif, salah satunya dapat berupa senyawa antimikroba. Xu dkk. (2010: 811), melaporkan spesies kapang endofit *Fusarium redolens* Wollenw. dari tumbuhan *Dioscorea zingiberensis* menghasilkan metabolit sekunder berupa senyawa antimikroba beauvericin. Maria dkk. (2005: 73) melaporkan bahwa kapang endofit *Aspergillus* sp. dari tumbuhan *Acanthus ilicifolius* L. menunjukkan aktivitas antifungi terhadap *C. albicans*.

Zona hambat dari *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 terhadap *C. albicans* UICC Y-29 adalah zona parsial (Gambar 4.3.b). Zona hambat parsial menunjukkan masih terdapat pertumbuhan *C. albicans* UICC Y-29 namun dalam jumlah yang lebih sedikit dibandingkan daerah yang tidak berada di sekitar cakram. Hal tersebut mengindikasikan bahwa *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 yang berusia 7 hari menghasilkan senyawa antifungi yang bersifat fungistatik, atau tidak memiliki kemampuan membunuh, namun hanya menghambat pertumbuhan *C. albicans* UICC Y-29. Zona hambat dari *F. equiseti* ES2 terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 adalah zona hambat total (Gambar 4.3.c) yang ditunjukkan sebagai zona hambat bening sempurna dan

diduga tidak ada pertumbuhan bakteri di sekitar potongan agar. Hal tersebut mengindikasikan bahwa *F. equiseti* ES2 menghasilkan senyawa antibakteri yang bersifat bakterisidal. Menurut Poeloengan (2009: 65–66), zona total yang ditandai dengan zona hambat bening sempurna menunjukkan bahwa senyawa antimikroba yang diuji mampu membunuh mikroorganisme sehingga tidak terdapat lagi pertumbuhan sel, sedangkan zona parsial yang ditandai dengan zona hambat tidak bening sempurna menunjukkan bahwa senyawa antimikroba hanya menghambat pertumbuhan mikroorganisme, dan tidak membunuhnya.



Gambar 4.2. Hasil pengujian aktivitas antimikroba kapang endofit dengan blok agar terhadap mikroorganisme uji, inkubasi selama 24 jam di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Zona hambat dari *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 terhadap *C. albicans* UICC Y-29 dapat mengindikasikan bahwa *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 menghasilkan senyawa yang memiliki aktivitas antifungi terhadap *C. albicans* UICC Y-29. Mekanisme penghambatan yang dilakukan oleh senyawa antifungi yang dihasilkan belum dapat diketahui, namun dapat diperkirakan mekanisme penghambatan yang terjadi hampir serupa dengan mekanisme penghambatan oleh agen antifungi yang dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan *C. albicans*. Menurut Deacon (2006: 352), agen antifungi yang berasal dari kelompok azole (*imidazole, triazole*) dapat digunakan untuk mengobati penyakit infeksi yang disebabkan oleh *C. albicans*. Senyawa antifungi dari kelompok azole tersebut bekerja menghambat sintesis ergosterol, yaitu dengan menghambat pembentukan lanosterol menjadi ergosterol. Menurut Carlile *dkk.* (2001: 178--179), ergosterol merupakan komponen penting penyusun membran sel dari fungi, sehingga apabila sintesis ergosterol terhambat maka fungsi membran sel akan terganggu, dan pertumbuhan sel menjadi terhambat.

Zona hambat dari *F. equiseti* ES2 terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 dapat mengindikasikan bahwa *F. equiseti* ES2 menghasilkan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif (*B. subtilis*) namun tidak menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram negatif (*E. coli*). Menurut Madigan *dkk.* (2000: 759), bakteri Gram positif memiliki sensitivitas lebih tinggi terhadap senyawa antibakteri dibandingkan bakteri Gram negatif. Salah satu mekanisme kerja dari suatu senyawa antibakteri adalah dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri yaitu dengan berikatan pada enzim transpeptidase. Menurut Hogg (2005: 358--359), enzim transpeptidase dibutuhkan dalam proses sintesis peptidoglikan yang merupakan komposisi utama dinding sel bakteri Gram positif. Sehingga apabila enzim transpeptidase terikat pada senyawa antibakteri, maka sintesis peptidoglikan akan terhambat. Hal tersebut mengakibatkan dinding sel menjadi lemah, membuat sel bakteri lisis, dan sel mengalami kematian.

Berdasarkan hasil pengujian, diketahui hanya satu dari dua *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* yang memiliki aktivitas antimikroba, yaitu *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4. Hal tersebut diperkirakan

karena kedua isolat *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* tersebut diisolasi dari daun tumbuhan *B. papyrifera* yang berasal dari daerah berbeda, *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES1 berasal dari Desa Bejjong sedangkan *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 berasal dari Kota Bandung. Perbedaan habitat asal diduga menjadi faktor yang menyebabkan *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES1 dan ES4 memiliki perbedaan kemampuan aktivitas antimikroba. Hal serupa dilaporkan oleh Maria dkk. (2005: 69--73) yang mengisolasi tiga kapang *Aspergillus* sp. dari tumbuhan mangrove di India, namun berasal dari lokasi yang berbeda. Hasil pengujian menunjukkan hanya satu kapang *Aspergillus* yang memiliki aktivitas antimikroba.

4.4. Ekstraksi Senyawa Antimikroba dari Kapang Endofit

Ekstraksi senyawa antimikroba dilakukan pada dua kapang endofit yang menunjukkan aktivitas antimikroba pada pengujian menggunakan blok agar, yaitu *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 dan *F. equiseti* ES2. Proses ekstraksi dalam penelitian ini menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda kepolarannya, yaitu metanol yang bersifat polar, etil asetat yang bersifat semipolar, dan n-heksana yang bersifat nonpolar. Hasil ekstraksi berupa ekstrak cair. Pemilihan pelarut yang berbeda kepolarannya disebabkan sifat kepolaran dari senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh kapang endofit *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 dan *F. equiseti* ES2 belum diketahui. Diketahui bahwa untuk melarutkan senyawa antimikroba tersebut dibutuhkan pelarut dengan sifat kepolaran yang sesuai. Menurut Brooks (1974: 117), senyawa yang bersifat polar akan terlarut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa yang bersifat nonpolar akan terlarut dalam pelarut nonpolar. Nithya dan Muthumary (2011: 45) melakukan ekstraksi senyawa antimikroba kapang endofit *Phomopsis* sp. dari *Allamanda cathartica* Linn. menggunakan pelarut etil asetat dan metanol. Senyawa antimikroba tersebut teridentifikasi sebagai golongan senyawa terpene.

4.5. Pengujian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kapang Endofit Terhadap Mikroorganisme Uji Dengan Difusi Agar Cara Cakram

Pengujian aktivitas antimikroba ekstrak senyawa antimikroba kapang endofit dilakukan dengan metode difusi agar cara cakram. Pengujian dilakukan pada ekstrak senyawa antimikroba kapang endofit yang menunjukkan aktivitas antimikroba pada pengujian dengan blok agar, yaitu *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 terhadap *C. albicans* UICC Y-29 dan *F. equiseti* ES2 terhadap *B. subtilis* ATCC 6633. Sebelum diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang, cawan petri berisi *B. subtilis* ATCC 6633 dan *C. albicans* UICC Y-29 disimpan pada suhu 4°C dalam lemari pendingin selama 14--18 jam. Hal tersebut bertujuan menahan pertumbuhan mikroorganisme uji sehingga senyawa antimikroba dari ekstrak kapang endofit terlebih dahulu berdifusi ke dalam medium agar sebelum terjadi pertumbuhan mikroorganisme uji.

Hasil pengujian menunjukkan ekstrak senyawa antimikroba dari *F. equiseti* ES2 dalam etil asetat dan dalam metanol memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633, sedangkan hasil pengujian ekstrak senyawa antimikroba dari *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 tidak menunjukkan adanya aktivitas antifungi terhadap *C. albicans* UICC Y-29. Hasil pengamatan uji aktivitas antimikroba dapat dilihat pada Tabel 4.5.(1).

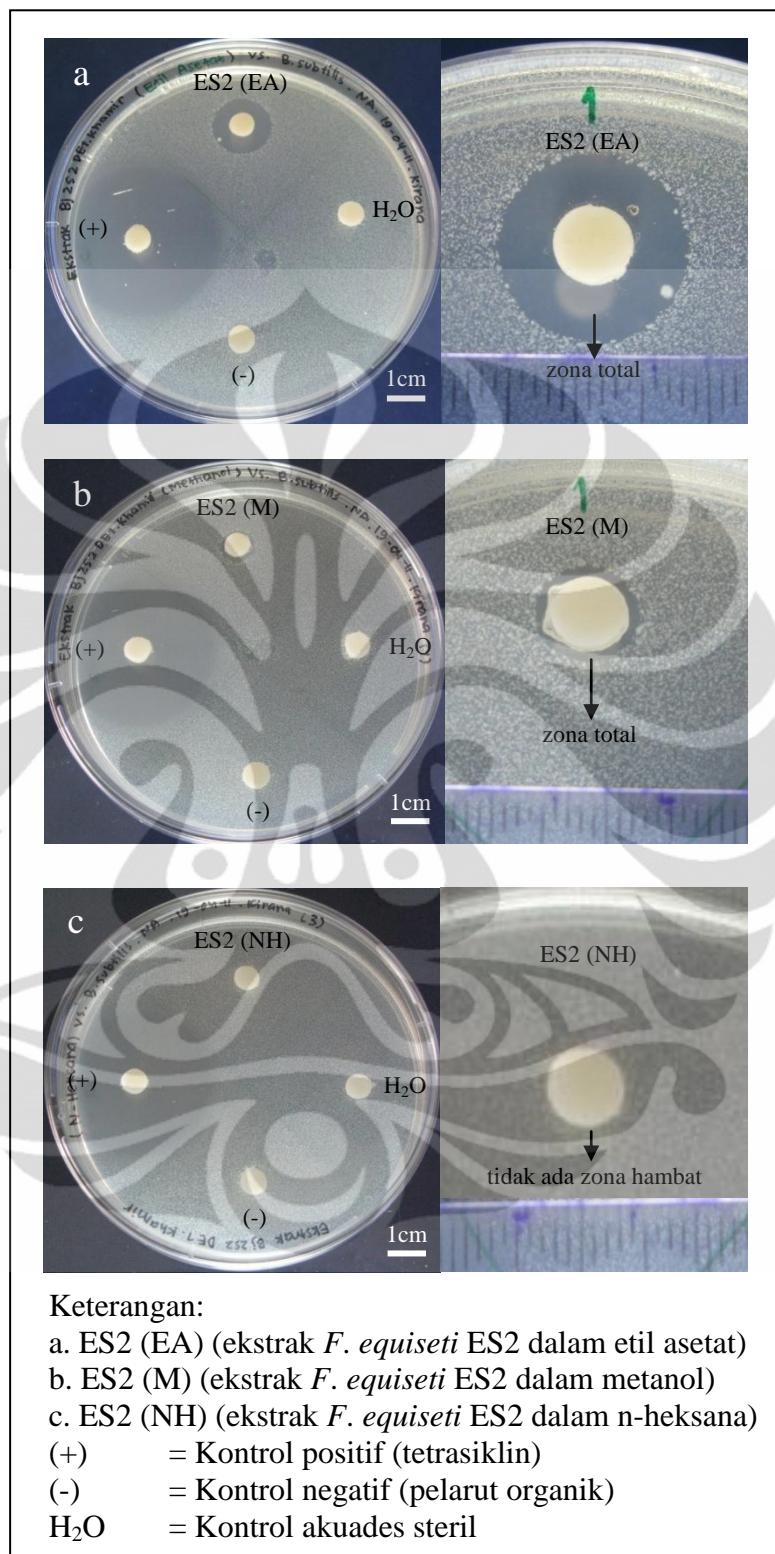
Aktivitas antimikroba dari pengujian ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekeliling kertas cakram yang mengandung ekstrak senyawa antimikroba dari *F. equiseti* ES2 dalam metanol dan etil asetat. Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antimikroba dari *F. equiseti* ES2, diduga senyawa antibakteri yang diperoleh bersifat polar karena dapat terlarut dalam metanol yang bersifat polar dan bersifat semipolar karena dapat terlarut dalam etil asetat yang bersifat semipolar. Menurut Brooks (1974: 117), senyawa kimia secara umum akan terlarut dalam pelarut yang memiliki sifat kepolaran yang sesuai dengan senyawa tersebut. Menurut Logrieco dkk. (1998: 3084), salah satu contoh senyawa antifungi yang dihasilkan oleh spesies kapang *Fusarium* adalah beauvericin. Beauvericin diketahui bersifat aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan mikobakteria.

Tabel 4.5.(1). Hasil pengujian aktivitas antimikroba ekstrak kapang endofit dengan difusi agar cara cakram terhadap mikroorganisme uji, inkubasi selama 24 jam di suhu ruang

Kapang Endofit	Ekstrak	n-	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633			<i>C. albicans</i> UICC Y-29		
			+/-	d (mm)	rata- rata	IP	+/-	d (mm)
<i>F. equiseti</i> ES2	Metanol	1	+	(T)	9,89	9,51	0,64	-
		2	+	(T)	9,5	±	0,58	-
		3	+	(T)	9,15	0,25	0,53	-
	Etil asetat	1	+	(T)	16,24	16,7	1,71	-
		2	+	(T)	16,14	±	1,69	-
		3	+	(T)	17,87	0,74	1,98	-
	n- heksana	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i> subgenus <i>Circumdati</i> <i>section</i>	Metanol	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-
	Etil asetat	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-
	Flavi ES4	1	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	-

Keterangan:

- [Grey Box] = Hasil negatif pada pengujian dengan blok agar (tidak dilakukan uji)
- n- = Pengulangan ke-
- + = Terbentuk zona hambat
- = Tidak terbentuk zona hambat
- d (mm) = diameter zona hambat dalam milimeter
- rata-rata = diameter zona hambat rata-rata dalam milimeter
- IP = Indeks Penghambatan



Gambar 4.5.(1). Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak *F. equiseti* ES2 dengan difusi agar cara cakram terhadap *B. subtilis* ATCC 6633, inkubasi selama 24 jam di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Kontrol positif yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 adalah antibiotik tetrasiklin dengan konsentrasi 500 ppm (b/v). Diameter zona hambat rata-rata tetrasiklin terhadap pertumbuhan *B. subtilis* ATCC 6633 lebih besar jika dibandingkan dengan ekstrak *Fusarium* ES2 dalam metanol dan etil asetat, yaitu berukuran $39,0 \pm 0,35$ mm. Menurut Hogg (2005: 363), tetrasiklin termasuk kelompok antibiotik dengan spektrum luas dan bersifat bakteristatik.

Diameter zona hambat rata-rata ekstrak *F. equiseti* ES2 dalam metanol adalah $9,51 \pm 0,25$ mm. Aktivitas antibakteri dari ekstrak *F. equiseti* ES2 dalam metanol setara dengan aktivitas antimikroba dari antibiotik tetrasiklin dengan konsentrasi 121,9 ppm. Diameter zona hambat rata-rata ekstrak *F. equiseti* ES2 dalam etil asetat adalah sebesar $16,7 \pm 0,74$ mm. Aktivitas antibakteri dari ekstrak *F. equiseti* ES2 dalam etil asetat setara dengan aktivitas antimikroba dari antibiotik tetrasiklin dengan konsentrasi 214,1 ppm. Berdasarkan ukuran diameter zona hambat yang terbentuk, ekstrak *F. equiseti* ES2 dalam etil asetat memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menghambat pertumbuhan *B. subtilis* ATCC 6633 dibandingkan ekstrak *F. equiseti* ES2 dalam metanol.

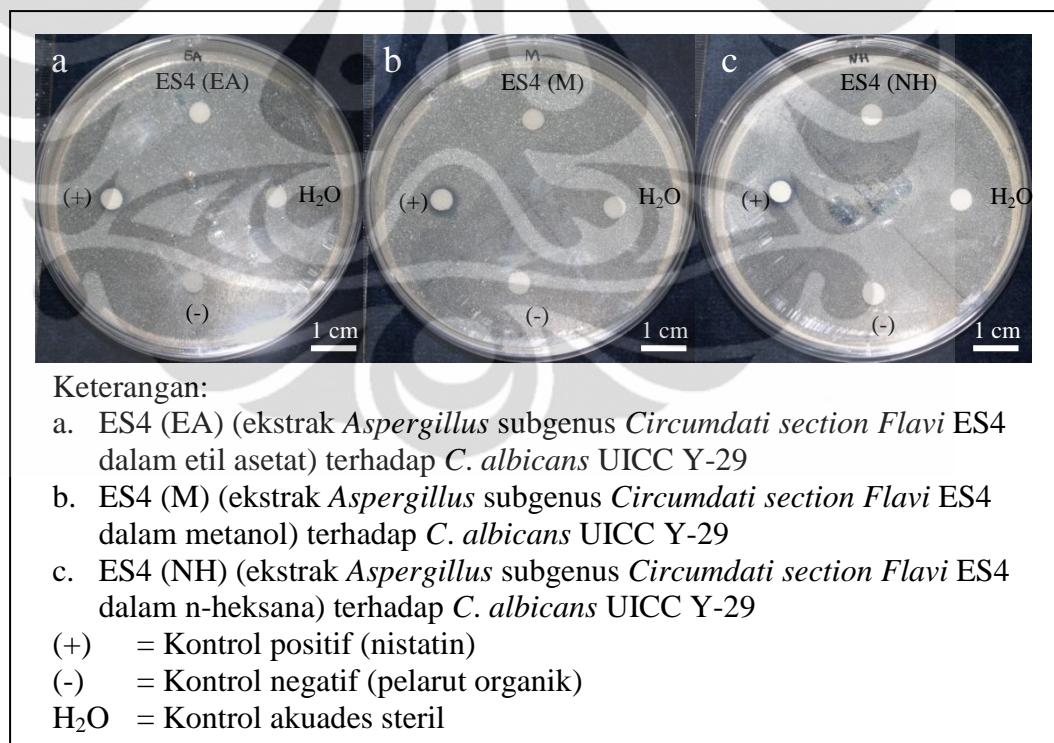
Tabel 4.5.(2). Konsentrasi ekstrak *F. equiseti* ES2 yang disetarakan dengan konsentrasi antibiotik tetrasiklin berdasarkan perbandingan diameter zona hambat

	n-	d (mm)	rata-rata d (mm)	Konsentrasi
Tetrasiklin	1	39,52		
	2	38,43	$39,0 \pm 0,38$	500 ppm
	3	39,07		
Ekstrak <i>F. equiseti</i> ES2 dalam metanol	1	9,89		
	2	9,5	$9,51 \pm 0,25$	121,9 ppm
	3	9,15		
Ekstrak <i>F. equiseti</i> ES2 dalam etil asetat	1	16,24		
	2	16,14	$16,7 \pm 0,74$	214,1 ppm
	3	17,87		

Hasil pengujian ekstrak senyawa antimikroba dari *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 tidak menunjukkan aktivitas antifungi terhadap khamir *C. albicans* UICC Y-29. Hal tersebut terlihat dari tidak terbentuknya zona

hambat di sekitar kertas cakram dan mengindikasikan bahwa ekstrak *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 tidak memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan maupun membunuh mikroorganisme uji yaitu khamir *C. albicans* UICC Y-29. Aktivitas antimikroba hanya terlihat pada daerah di sekitar kertas cakram yang mengandung nistatin 1.000 ppm (v/v) (kontrol positif).

Pengujian aktivitas antifungi ekstrak senyawa antimikroba dari *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 dengan metode difusi agar cara cakram tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan seperti yang ditunjukkan pada pengujian aktivitas antifungi dengan blok agar. Diduga senyawa antifungi dari *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 tidak mampu dilarutkan dengan baik oleh pelarut organik yang digunakan pada saat proses ekstraksi. Pelarut organik tidak mampu melarutkan senyawa antimikroba karena diduga terdapat perbedaan interaksi yaitu perbedaan tingkat kepolaran dengan senyawa antimikroba tersebut.



Gambar 4.5.(2). Hasil pengujian aktivitas antifungi ekstrak *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 dengan difusi agar cara cakram terhadap *C. albicans* UICC Y-29, inkubasi selama 24 jam di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Kemungkinan lain adalah konsentrasi senyawa antimikroba *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 yang berhasil diekstraksi sangat rendah. Salah satu alternatif untuk memperoleh senyawa antimikroba dalam jumlah yang lebih banyak adalah dilakukan fermentasi pada medium cair. Pada penelitian ini *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 hanya ditumbuhkan pada medium padat (PDA) sebelum dilakukan ekstraksi. Apabila kapang ditumbuhkan pada medium padat, kontak antara kapang dengan nutrien hanya terjadi pada permukaan medium, sehingga penyerapan nutrien oleh kapang menjadi terbatas. Apabila dilakukan fermentasi pada medium cair, kontak antara kapang dengan nutrien terjadi lebih optimal karena seluruh bagian dari kapang berada di dalam medium tersebut. Penyerapan nutrien yang lebih banyak akan membuat kapang lebih banyak menghasilkan metabolit sekunder yang dikeluarkan secara ekstraselular. Oleh karena itu, fermentasi dengan medium cair diperkirakan akan menghasilkan lebih banyak metabolit sekunder dibandingkan dengan medium padat. Sunkar dan Nachiyar (2011: 1136) melakukan proses fermentasi kapang endofit *Aspergillus* sp. dalam medium cair PDB selama 7 hari sebelum dilakukan ekstrasi senyawa antimikroba. Hasil pengujian menunjukkan ekstrak senyawa antimikroba mampu menghambat pertumbuhan *B. subtilis*.

4.6. Pemisahan Senyawa Antimikroba

Pemisahan golongan senyawa antimikroba dari ekstrak senyawa kapang endofit dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Ekstrak senyawa kapang endofit yang dipisahkan komponennya adalah ekstrak senyawa *F. equiseti* ES2 dalam etil asetat dan metanol. *F. equiseti* ES2 menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri *B. subtilis* ATCC 6633 pada saat pengujian dengan blok agar dan pengujian dengan difusi agar cara cakram, sehingga dapat diasumsikan bahwa ekstrak *F. equiseti* ES2 mengandung senyawa antibakteri. Hasil pengamatan KLT dan nilai Rf dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Pemisahan ekstrak senyawa antimikroba dari *F. equiseti* ES2 dalam etil asetat dengan eluen etil asetat:metanol (7:3) menghasilkan dua bercak. Pemisahan ekstrak senyawa antimikroba dari *F. equiseti* ES2 dalam metanol dengan eluen

etil asetat:metanol (7:3) menghasilkan satu bercak. Pemisahan kedua ekstrak dengan menggunakan etil asetat:metanol (3:7) dan eluen metanol:etil asetat:n-heksana (1:1:1) menghasilkan masing-masing satu bercak. Diduga komponen senyawa antimikroba tersebut tidak berhasil terpisah dengan baik oleh eluen sehingga hanya dapat menarik satu bercak. Diperkirakan antara eluen dengan senyawa antimikroba tidak sesuai sifat kepolarannya. Menurut Sharma dkk.(2009: 24), komponen-komponen dari suatu senyawa dapat terpisahkan berdasarkan kepolaran antara senyawa dengan eluen yang digunakan dan berdasarkan perbedaan berat molekul.

Tabel 4.6. Hasil KLT untuk memisahkan senyawa antimikroba ekstrak *F. equiseti* ES2 divisualisasikan dengan sinar UV 365 nm

Ekstrak <i>F. equiseti</i> ES2	Nilai Rf		
	EA:M (7:3)	EA:M (3:7)	M:EA:NH (1:1:1)
Ekstrak dalam etil asetat	0,57 0,97	0,80	0,92
Ekstrak dalam methanol	0,56	0,3	0,73
Keterangan:	Rf = <i>Retention factor</i> EA = Etil asetat		
	M = Metanol NH = n-heksana		

Pemisahan komponen senyawa dengan KLT menggunakan eluen etil asetat:metanol (7:3) menghasilkan bercak dari ekstrak dalam etil asetat dan metanol. Nilai Rf yang diperoleh hampir serupa, yaitu 0,57 dan 0,56. Nilai Rf yang hampir sama dapat mengindikasikan bahwa bercak-bercak tersebut merupakan komponen yang sama. Menurut Margino (2008: 92), apabila dua bercak memiliki nilai Rf yang hampir sama, maka kemungkinan besar komponen tersebut berasal dari kelompok senyawa yang sama.

4.7. Bioautografi

Bioautografi dilakukan pada pelat KLT yang mengandung ekstrak senyawa antimikroba dari *F. equiseti* ES2 (ekstrak dalam etil asetat dan metanol) yang telah dipisahkan. Hasil yang diperoleh adalah bercak hasil pemisahan ekstrak senyawa *F. equiseti* ES2 (ekstrak dalam etil asetat dan metanol) tidak

menunjukkan aktivitas antimikroba, baik pada bioautografi kerik maupun *agar overlay*. Hal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa antimikroba yang telah dipisahkan berupa bercak hasil KLT tidak mampu menghambat pertumbuhan *B. subtilis* ATCC 6633. Tidak adanya aktivitas antimikroba terlihat dari tidak terbentuknya zona hambat di sekitar hasil kerikan dan di sekitar bercak pada pelat KLT.

Pengujian bioautografi tidak menunjukkan adanya aktivitas antimikroba seperti yang ditunjukkan pada pengujian dengan blok agar dan dengan difusi agar cara cakram. Hal tersebut diduga karena konsentrasi komponen aktif pada bercak pelat KLT sangat rendah, sehingga tidak mampu menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis* ATCC 6633. Kemungkinan lain adalah bercak pada pelat KLT tersebut bukan merupakan komponen aktif dari senyawa antimikroba, sehingga ketika diujikan pada bioautografi hasil yang diperoleh tidak menunjukkan adanya aktivitas antimikroba. Menurut Sudirman (2005: 67), senyawa antimikroba terdiri dari komponen aktif dan komponen tidak aktif. Berdasarkan hal tersebut dapat diasumsikan bahwa KLT yang dilakukan belum berhasil membuat komponen aktif senyawa antimikroba berdifusi pada kromatogram, sehingga pada uji bioautografi tidak terlihat adanya aktivitas antimikroba.

Penelitian ini berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi kapang endofit dari daun *Broussonetia papyrifera*. Kapang endofit *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 dan *Fusarium equiseti* ES2 berpotensi sebagai penghasil senyawa antimikroba.

BAB 5 **KESIMPULAN DAN SARAN**

5.1. Kesimpulan

1. Diperoleh satu isolat kapang endofit dari daun *B. papyrifera* asal Kota Bandung dan diberi kode isolat ES4.
2. Hasil identifikasi berdasarkan karakter morfologi diduga bahwa isolat kapang endofit ES1 dan ES4 merupakan *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi*; isolat kapang endofit ES3 merupakan *Cladosporium macrocarpum*; dan isolat kapang endofit ES2 merupakan *Fusarium equiseti*.
3. *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 memiliki aktivitas antifungi terhadap *C. albicans* UICC Y-29, dan *Fusarium equiseti* ES2 memiliki aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 pada pengujian dengan blok agar.
4. Diperkirakan sifat kepolaran senyawa antimikroba dari ekstrak *F. equiseti* ES2 adalah polar karena dapat terlarut dalam pelarut organik metanol yang bersifat polar dan semipolar karena dapat terlarut dalam etil asetat yang bersifat semipolar.
5. Ekstrak senyawa antimikroba dari *F. equiseti* ES2 dalam metanol menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 dengan diameter zona hambat rata-rata sebesar $9,51 \pm 0,25$ mm (setara dengan aktivitas antimikroba tetrasiklin 121,9 ppm), sedangkan ekstrak dalam etil asetat menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 dengan diameter zona hambat rata-rata sebesar $16,7 \pm 0,74$ mm (setara dengan aktivitas antimikroba tetrasiklin 214,1 ppm).
6. Bioautografi dari bercak hasil KLT ekstrak *F. equiseti* ES2 terhadap *B. subtilis* ATCC 6633 tidak menunjukkan aktivitas antimikroba.

5.2. Saran

1. Perlu dilakukan identifikasi kapang-kapang endofit *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES1 dan ES4, *Cladosporium macrocarpum* ES3, dan

Fusarium equiseti ES2 secara molekular untuk mendapatkan hasil identifikasi yang lebih akurat.

2. Perlu dilakukan fermentasi *Aspergillus* subgenus *Circumdati section Flavi* ES4 dalam medium cair, untuk mendapatkan senyawa antimikroba dalam konsentrasi yang lebih banyak.
3. Perlu dilakukan pemilihan eluen KLT lain untuk pemisahan komponen senyawa antimikroba yang lebih baik.



DAFTAR REFERENSI

- Agusta, A. 2009. *Biologi dan kimia jamur endofit*. Penerbit ITB, Bandung: vii + 110 hlm.
- Ando, K., C. Nakashima, J.Y. Park, & M. Otoguro. 2003. Workshop on isolation methods of microbes. Research and Development Center for *Biotechnology Indonesia Institute of Science*: 44 hlm.
- Atlas, R.M. 2010. *Handbook of microbiological media*. CRC Press Inc., Florida: vi + 2036 hlm.
- Backer, C.A. & R.C.B. Bakhuizen van Den Brink Jr. 1965. *Flora of Java (Spermatophytes only)*. Vol II. Wolters-Noordhoff. N. V., Groningen: (72) + 641 hlm.
- Barik, B.P., K. Tayung, P.N. Jagadev, & S.K. Dutta. 2010. Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity. *EJBS* 2(1): 8--16.
- Barnett, H.L. & B.B. Hunter. 2003. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4th ed. Prentice Hall, Inc., U.S.A: xxi + 218 hlm.
- Barnett, J.A., R.W. Payne, D. Yarrow, & L. Barnett. 2000. *Yeast: Characteristics and identification*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge: 1150 hlm.
- Barrow, G.I. & R.K.A. Feltham. 1993. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge: xvii + 330 hlm.
- Benson, H.J. 2001. *Microbiological application: Laboratory manual in general microbiology*. The McGraw-Hills Company, Inc., New York: xi + 478 hlm.
- Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* 58 (1): 1--26.
- Bishop, C.B., M.B. Bishop, K.W. Whitten dan K.D. Gailey. *Experimental in general chemistry*. 2nd ed. Saunders College Publishing, Forth: xii + 966 hlm.

- Black, G.J. 1999. *Microbiology: Principles and exploration*. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc., Chichester: xxiv + 786 hlm.
- Brooks, D. 1974. *Student's guide to chemistry, a modern introduction*. W.B. Saunders Company, Philadelphia: xvii + 233 hlm.
- Buchanan, R.E., & N.E. Gibbons. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore: xxvi + 1268 hlm.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, L.G. Mitchell. 2003. *Biologi Jilid 2*. Terj. dari *Biology*; oleh Manalu, W. Erlangga, Jakarta: xxii + 404 hlm.
- Cappuccino, J.G. & N. Sherman. 1996. *Microbiology: a laboratory manual*. The Benjamin/Cummings Publishing Inc., California: xvii + 477 hlm.
- Carlile, M.J., S.C. Watkinson, & G.W. Gooday. 2001. *The fungi*. Academic Press, California: xix + 588 hlm.
- Caruso, M., A.L. Colombo, L. Fedeli, A. Pavesi, S. Quaroni, M. Saracchi, & G. Ventrella. 2000. Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. *Annals of Microbiology* **50**: 3--13.
- Choma, I. 2005. The use of thin-layer chromatography with direct bioautography for antimicrobial analysis. *LGC Europe* **18**(9): 1--7.
- Collins, C.H., P. M. Lyne, J. M. Grange, & J. O. Falkinham III. 2004. *Collins and Lyne's microbiological methods*. 8th ed. Arnold Publisher, London: viii + 445 hlm.
- de Errasti, A., C.C. Carmaran, & M.V. Novas. 2010. Diversity and significance of fungal endophytes from living stems of naturalized trees from Argentina. *Fungal Diversity* **41**: 29--40.
- Deacon, J.W. 2006. *Fungal biology*. Blackwell publishing, Cornwall: iv + 371 hlm.
- Devarajan, P.T. & T.S. Suryanarayanan. 2002. Endophytic fungi associated with the tropical grass *Halophila ovagris* (Hydrocharitaceae). *Indian Journal of Marine Science* **31**(1): 73--74.
- Devaraju, R. & S. Satish. 2011. Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium* sp. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* **2**(1): 75--79

- Ding, G., S.C. Liu, L.D. Guo, Y.G. Zhou, & Y.S. Che. 2007. Antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis foedan*. *J. Nat. Prod.* **71**: 615--618.
- Estrela, C., C.R.A. Estrela, E.L. Barbin, J.C.E. Spano, M.A. Marchesan, & J.D. Pecora. 2002. Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. *Braz. Dent. J.* **13**(2): 113--117.
- Ferrón, M.A., J.L. López, J.A. Pérez, J.M. Sevilla, & Y. Chisty. 2005. Rapid screening of *Aspergillus terreus* mutants for overproduction of lovastatin. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 123--125.
- Gandjar, I., I.R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo, & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. Jurusan Biologi FMIPA UI, Depok: vii + 79 hlm.
- Gandjar, I., R.A. Samson, K. van den Tweel-Vermeulen, A. Oetari, & I. Santoso. 1999. *Pengenalan kapang tropik umum*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta: xiii + 136 hlm.
- Gandjar, I., W. Sjamsuridzal, A. Oetari. 2006. *Mikologi dasar dan terapan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: xi + 236 hlm.
- Gehlot, P., I.H. Attitalla, & B. Salleh. 2010. Anamorphic fungi: an overview. *Middle East Journal of Scientific Research* **6**(3): 201--208
- Giguère, S., J.F. Prescott, J.D. Baggot, R.D. Walker, & P.M. Dowling. 2006. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 4th ed.* Blackwell Publishing, Iowa: xviii + 626 hlm.
- Hanson, J.R. 2008. *The chemistry of fungi*. RSC Publishing, Cambridge: xi + 221 hlm.
- Hogg, S. 2005. *Essential microbiology*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex: x + 468 hlm.
- Kavanagh, K. 2005. *Fungi, biology and applications*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex: xi + 267 hlm.
- Khan, R., S. Shahzad, M.I. Choudhary, S.A. Khan, & A. Ahmad. 2007. Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (ait.) R. Br. *Pak. J. Bot.* **39** (6): 2233--2239.

- Kinghorn, A.D., J.M. Pezzuto, L. Dongho, & K.P.L. Bhat. 2004. Aromatase inhibitors from *Broussonetia papyrifera*. *United States Patent*: 1--19.
- Klich, M.A. 2002. *Identification of common Aspergillus Species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures., Netherlands: v + 116 hlm.
- Koneman, E.W. & G.D. Roberts. 1985. *Practical laboratory mycology*. 3rd ed. Williams and Wilkins Publisher, Baltimore: vii + 211 hlm.
- Kumala, S. & E.B. Siswanto. 2007. Isolation and screening of endophytic microbes from *Morinda citrifolia* and their ability to produce antimicrobial substances. *Microbiology Indonesia* **1**(3): 145--148.
- Kumala, S., Syarmalina, & A.R. Handayani. 2006. Isolasi dan uji antimikroba substansi bioaktif mikroba endofit ranting tanaman Johar (*Cassia siamea* Lamk.). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* **4**(1): 8--14.
- Kusari, S., M. Lamshöft, & M. Spiteller. 2009. *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. Horstmann as a novel source of the anticancer pro-drug deoxypodophyllotoxin. *J. Appl. Microbiol.* **107**(3): 1019--1030.
- Kusumaningtyas, E., E. Astuti, & Darmono. 2008. Sensitivitas metode bioautografi kontak dan agar overlay dalam penentuan senyawa antikapang. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* **6**(2): 75--79.
- Larran, S., C. Mónaco, & H.E. Alippi. 2001. Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 181--184.
- Lengeler, J.W., G. Drews. & H.G. Schlegel. 1999. *Biology of prokaryotes*. George Thieme Verlag, Stuttgart: xxvii + 995 hlm.
- Nithya, K. & J. Muthumary. 2011. Bioactive metabolite produced by *Phomopsis* sp. an endophytic fungus in *Allamanda cathartica*. *Linn. Rec. Res. Sci. Tech.* **3**(3): 44--48
- Madigan 2000, M.T., J.M. Martinko, & J. Parker. 2000. *Brock: Biology of microorganisms*. 9th ed. Prentice Hall, New Jersey: xix + 991 hlm.
- Mann, J. 1995. *Secondary metabolism*. 2nd ed. Oxford University Press Inc., New York: xv + 347 hlm.
- Margino, S. 2008. Produksi metabolit sekunder (antibiotik) oleh isolat jamur endofit Indonesia. *Majalah Farmasi Indonesia* **19**(2): 86--94.

- Maria, G.L., K.R. Sridhar, & N.S. Raviraja. 2005. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *J. Agr. Tech.* **1**: 67--80.
- Masoko, P., & J.N. Eloff. 2006. Bioautography indicates the multiplicity of antifungal compounds from twenty-four southern African *Combretum* species (*Combretaceae*). *Afr. J. Biotechnol.* **5** (18):1625—1647.
- McCreath, K.J., C. A. Specht, & P. W. Robbins. 1994. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Candida albicans*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **92**: 2544—2548
- McDonnell, G. & A.D. Russell. 1999. Antiseptic and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Review* **12**(1): 147--179
- Mitchell, A.M., G.A. Strobel, E. Moore, R. Robinson, & J. Sears. 2010. Volatile antimicrobial from *Muscodor crispan*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* **156**: 270--277.
- Mueller, J.M., J.F. Bills, & M.S. Foster. 2004. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring method*. Elsevier Academic Press Inc., Amsterdam: xviii + 777 hlm.
- Muliana, D. 2007. Penapisan isolat kapang dari serasah penghasil senyawa antimikroba terhadap bakteri dan fungi uji. Skripsi S1 Departemen Biologi FMIPA UI, Depok: vii + 107 hlm.
- Mwaura, P., T. Dubois, T. Losenge, D. Coyne, & E. Kahangi. 2010. Effect of endophytic *Fusarium oxysporum* on paralysis and mortality of *Pratylenchus goodeyi*. *African Journal of Biotechnology* **9**(8): 1130--1134.
- Pankey, G.A. & L.D. Sabath. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infection. *Oxford Journal* **38**: 864--870.
- Permadi, T. 2005a. *Konservasi tradisi pembuatan daluang sebagai salah satu upaya penyelamatan teknologi tradisional nusantara*. Disampaikan pada Diskusi Pakar dengan tema “Pemenuhan Hak Atas Ilmu Pengetahuan dan Teknologi, Budaya dan Seni” di Permata Bidakara Bandung Hotel, 28--29 November 2005.

- Permadi, T. 2005b. *Asal-usul pemanfaatan dan karakteristik daluang-Bahan naskah dalam tradisi tulis nusantara*. Disampaikan pada Diskusi Pakar dengan tema “Pemenuhan Hak Atas Ilmu Pengetahuan dan Teknologi, Budaya dan Seni” di Permata Bidakara Bandung Hotel, 28--29 November 2005.
- Photita, W., S. Lumyong, P. Lumyong, E.H.C. McKenzie, & K.D. Hyde. 2004. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens?. *Fungal Diversity* **16**: 131--140.
- Poeloengan, M. 2009. Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun miana (*Coleus seutellarioides* (L.) Benth) terhadap bakteri *Salmonella enteritidis* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Biotika* **7**(2): 61--68
- Praptiwi, Y., S. Jamal, A. Fathoni, & A. Agusta. 2009. Antimicrobial metabolite from the culture of endophytic fungus AFK-8 isolated from kayu kuning (*Archangelisia flava* (L.) Merr.). *International Seminar Biotechnology*: 1--9.
- Radji, M. 2005. Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian* **2**(3): 113--126.
- Rao, S. 2008. Sterilization and disinfection. Juni 2008: 10 hlm.
www.microrao.com/micronotes/sterilization.pdf. 1 April 2009. pk. 18:23.
- Rubini, M.R., R.T. Silva-Ribeiro, A.W.V. Pomella, C.S. Maki, W.L. Araujo, D.R. dos Santos, & J.L. Azevedo. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int. J. Bio. Sci.* **1**: 24—33.
- Ryan, K. J. & C. J. Ray. 2004. *Sherris Medical microbiology: An introduction to infectious diseases*. 4th ed. The McGraw Hills Companies, Inc.: xii + 937 hlm.
- Rydberg, J. 2004. *Solvent extraction principles and practice*. 2nd ed. CRC, New York: 750 hlm.
- Sadava, D., W.K. Purves, C. Heller, & G.H. Orians. 2004. *Life - The science of biology*. 7th ed. W.H.Freeman & Co Ltd, Virginia: 1121 hlm.

- Salle, A.J. 1954. *Fundamental principles of bacteriology. 4th ed.* McGraw-Hill Book Company, Inc., New York: vii + 782 hlm.
- Samson, R.A., E.S. Hoekstra, & J.C. Frisvad. 2004. *Introduction to food and airborne fungi.* Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht: 383 hlm.
- Sati, S.C., M. Belwal, & N. Pargaien. 2008. Diversity of water borne conidial fungi as root endophyte in temperate forest of western Himalaya. *Nature and Science* **6**: 59-69.
- Sharma, A., V.K. Patel, & P. Ramteke. 2009. Identification of vibiocidal compound from medical plant. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 19--25.
- Sherma, J. & B. Fried. 2003. *Handbook of thin-layer chromatography.* 3rd ed. Marcel Dekker, Inc., New York: xv + 997 hlm.
- Schüßler, A., D. Schwarzott, & C. Walker 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* **105**(12): 1413—1421.
- Siddiquee, S., U.K. Yusuf, & N.A. Zainudin. 2010. Morphological and molecular detection of *Fusarium chlamydosporum* from root endophytes of *Dendrobium crumenatum*. *Afr. J. Biotechnol.* **9**(26): 4081--4090.
- Simarmata, R., S. Lekatompessy, & H. Sukiman. 2007. Isolasi mikroba endofitik dari tanaman obat sambung nyawa (*Gynura procumbens*) dan analisis potensinya sebagai antimikroba. *Berk. Penel. Hayati* **13**: 85--90.
- Srimathi, S., K.S.D. Narayani, & J. Muthumary. 2011. Studies on antimicrobial activities of *Chaetomium atrobrunneum* Ames against selected microorganisms. *J. Exp. Sci.* **2**(5): 13--18.
- Spencer, J.F.T. & D.M. Spencer. 1997. *Yeast in natural and artificial habitats.* Springer, Berlin: 381 hlm.
- Strobel, G. & B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *American Society of Microbiology* **67**(4): 491--502.
- Strobel, G., R.V. Miller, C. Miller, M. Condron, D.B. Teplow, & W.M. Hess. 1999. Cryptocandin, a potent antimycotic from endophytic fungus *Cryptosporipsis quercina*. *Microbiology* **145**: 1919--1926
- Sudirman, L.I. 2005. Deteksi senyawa antimikroba yang diisolasi dari beberapa *Lentinus* tropis dengan metode bioautografi. *Hayati* **12**(2): 67--72.

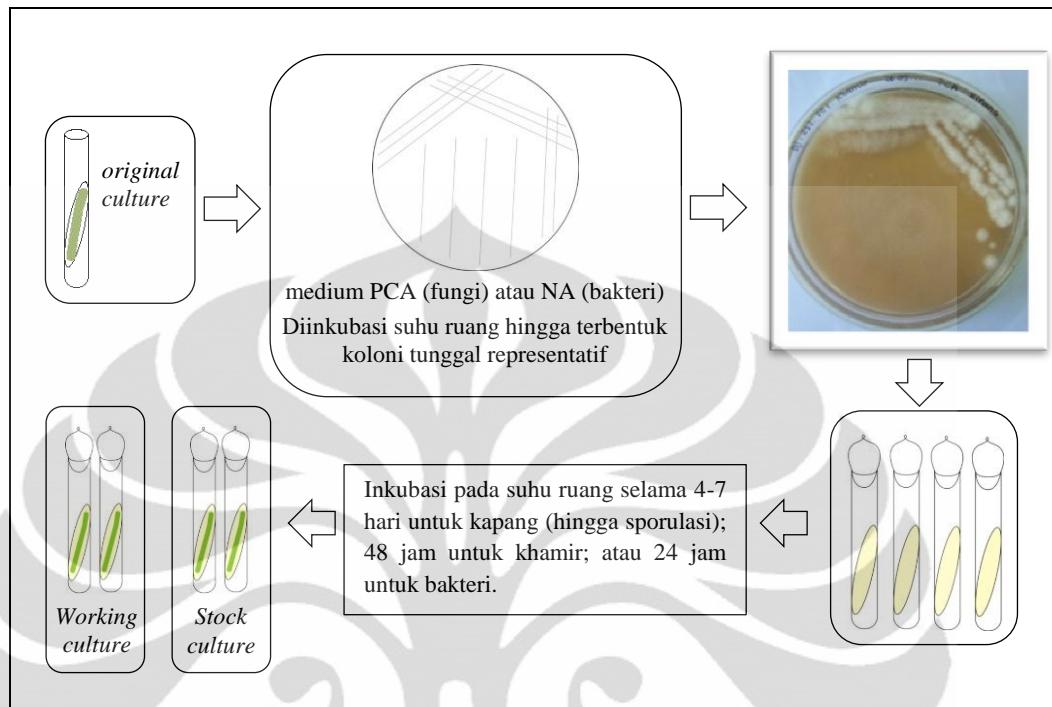
- Sunkar, S. & C.V. Nachiyar. 2011. Isolation and characterization of antimicrobial compounds produced by endophytic fungus *Aspergillus* sp. isolated from *Writhia tinctoria*. *J. Pharm. Res.* **4**(4): 1136--1137.
- Suryanarayanan, T.S., N. Thirunavukkarasu, M.B. Govindarajulu, F. Sasse, R. Jansen, & T.S. Murali. 2009. Fungal Endophytes and Bioprospecting: An appeal for a concerted effort. *Fungal Biology Reviews* **23** (1--2): 9--19.
- Tan, R.X. & W.X. Zou. 2001. Endophyte: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep* **18**: 448--459.
- Tanaka, M., H. Sukiman, M. Takebayashi, K. Saito, M. Suto, T.K. Prana, M.S. Prana, & F. Tomita. 1999. Isolation, screening, and phylogenetic identification of endophytes from plants in Hokkaido Japan and Java Indonesia. *Microbes and Environments* **14** (4): 237--241.
- Taqwim, F.S. 2007. Uji toksisitas dan uji antibakteri metabolit sekunder kapang endofit *Garcinia forbesii* King dan *Garcinia porrecta* Wall terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Skripsi S1 Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok: xvi + 109 hlm.
- Tong, W.Y., I. Darah, & Z. Latiffah. 2011. Antimicrobial activities of endophytic fungal isolated from medicinal herb *Ortosiphon stamineus* Benth. *J. Med. Plant Res.* **5**(5): 831--836.
- Tortora, G.J., B.R. Funke, & C.L. Case. 2010. *Microbiology, an introduction*. 10th ed. Pearson Education Inc., San Francisco: xxxi + 812 hlm.
- Valera, M.C., K. da Silva, L.E. Maekawa, C. Carvalho, C.Y. Koga-Ito, C.H. Camargo, & R.S. Lima. 2009. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J. Appl. Oral Sci.* **17**(6): 555--559.
- Vaz, A.B., R.C. Mota, M.R. Bomfim, M.L. Vieira, C.L. Zani, C.A. Rosa, & L.H. Rosa. 2009. Antimicrobial activity from endophytic fungi associated with *Orchidaceae* in Brazil. *Can. J. Microbiol.* **55**(12): 1381--1391.

- Verma, V.C., R.N. Kharwar, & A.C. Grange. 2010. Biosynthesis of antimicrobial silver nanoparticles by the endophytic fungus *Aspergillus clavatus*. *Nanomedicine (Lond)*. **5**(1): 33--40.
- Villaseñor, I.M., A.P. Canlas, K.M. Faustino, & K.G. Plana. 2004. Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. *J. Ethnopharmacol.* **92**: 53--56.
- Webster, J. & R.W.S. Weber. 2007. *Introduction to fungi*. 3rd ed. Cambridge University Press, New York: xix + 841 hlm.
- Wenny, D.L. & R.K. Dumroese. 1987. Germination of conifer seeds surface-sterilized with bleach. *Tree Planters Notes*: 18--21.
- Whistler, W.A. & C.R. Elevitch. 2006. *Broussonetia papyrifera* (paper mulberry). *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*: 1--13.
- Wilson, M. 2005. *Microbial inhabitants of human: their ecology and role in health and disease*. Cambridge University Press, Cambridge: xix + 455 hlm.
- Xu, L., J. Wang, J. Zhao, P. Li, T. Shan, X. Li, & L. Zhou. 2010. Beauvericin from endophytic fungus, *Fusarium redolens*, isolated from *Dioscorea zingiberensis* and its antibacterial activity. *Nat. Prod. Commun.* **5**(5): 811--814.
- Yu, H., L. Zhang, L. Li, C. Zheng, L. Guo, W. Li, P. Sun, & L. Qin. 2010. Recent development and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol. Res.* **165**(6): 437--449.
- Yulia, P.R. 2007. Isolasi dan seleksi kapang endofit penghasil antimikroba pada beberapa tanaman obat tradisional Indonesia. Sripsi S1 Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok: xi + 127 hlm.
- Zhao, K., W. Ping, Q. Li, S. Hao, L. Zhao, T. Gao, & D. Zhou. 2009. *Aspergillus niger* var. *taxis*, a new species variant of taxol-producing fungus isolated from *Taxus cuspidata* in China. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 1202--1207.
- Zhang, P., P. Zhou, & L.J. Yu. 2009. An endophytic taxol producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Curr. microbial.* **59**(3): 227--232.

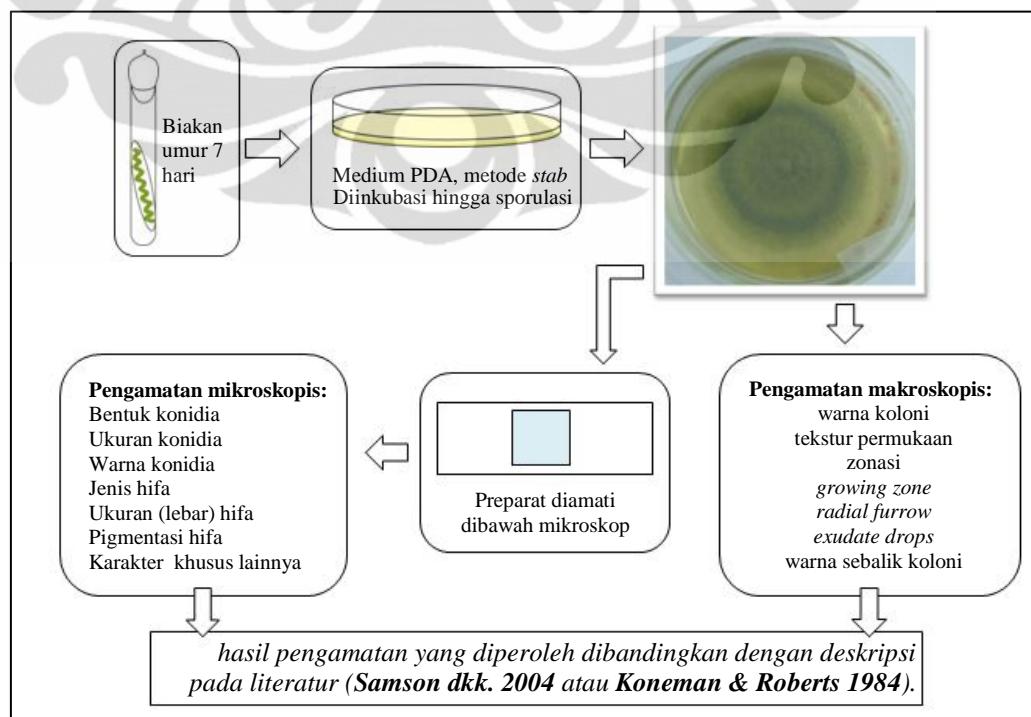
Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian



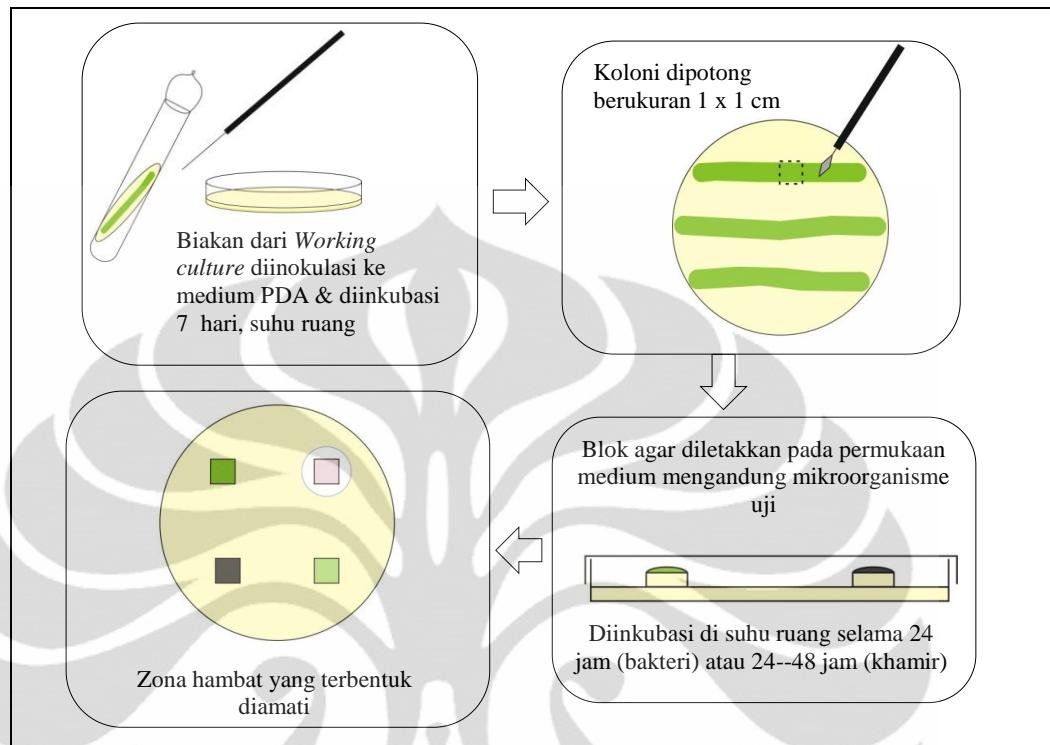
Lampiran 2. Skema Cara Kerja Purifikasi Mikroorganisme Serta Pembuatan *Stock Culture* dan *Working Culture*



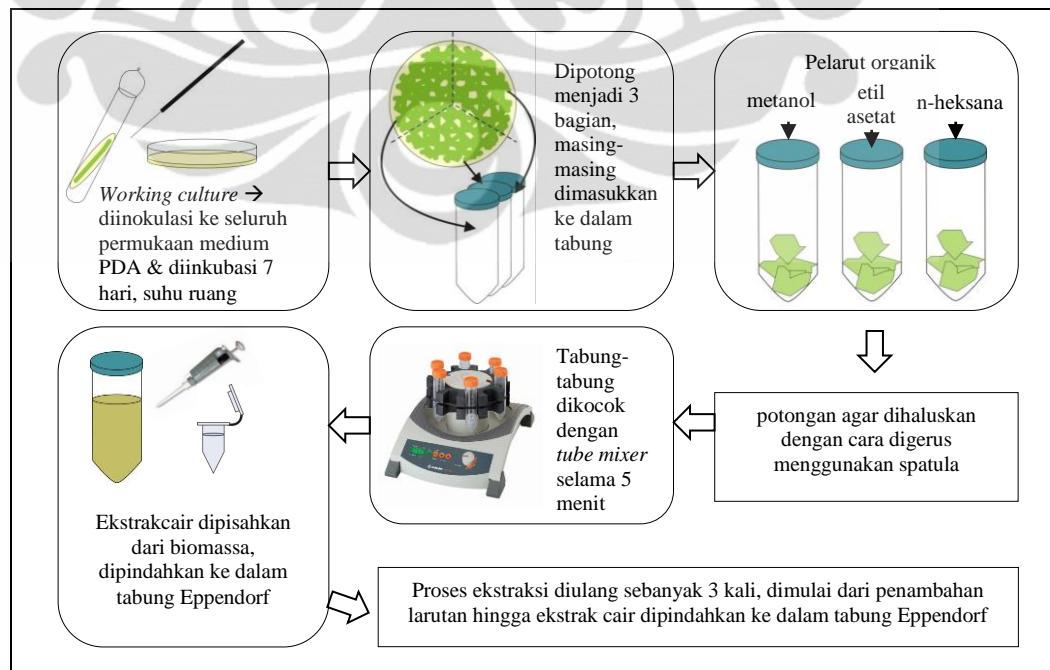
Lampiran 3. Skema Cara Kerja Identifikasi Konvensional Berdasarkan Karakter Morfologi Kapang Endofit



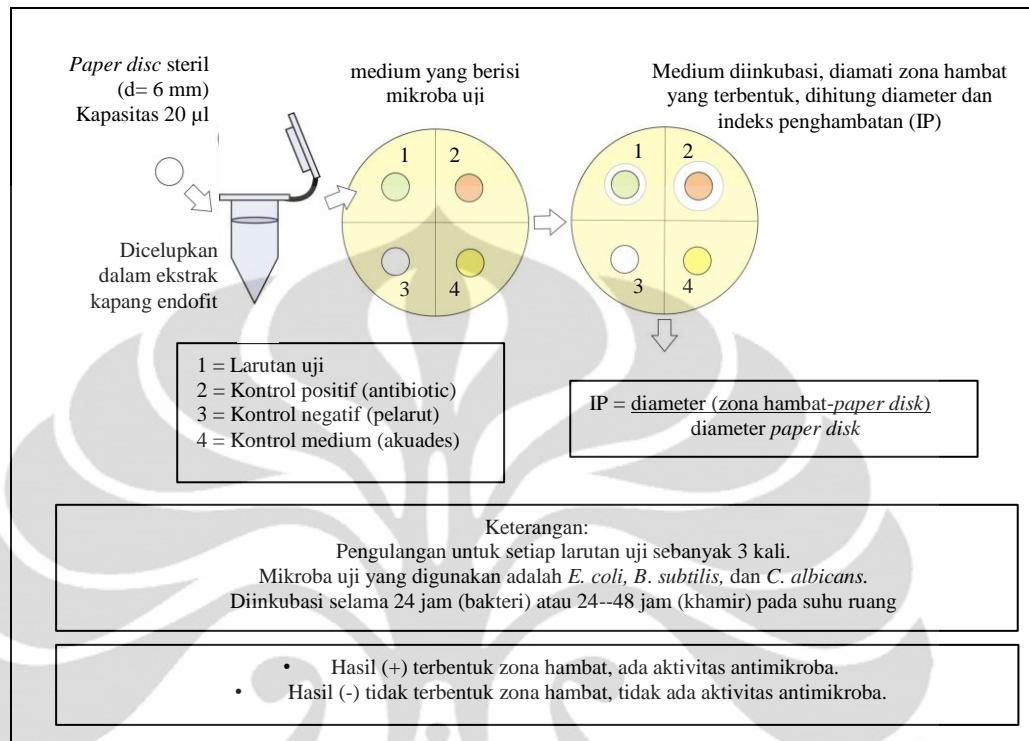
Lampiran 4. Skema Cara Kerja Pengujian Aktivitas Antimikroba Dari Kapang Endofit Dengan Blok Agar



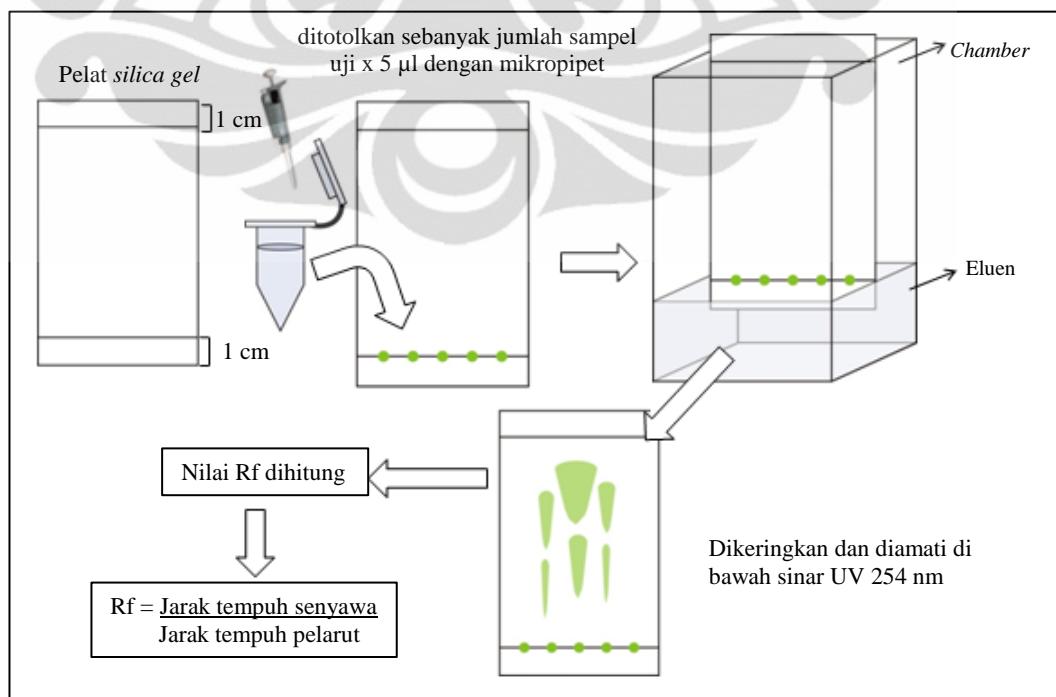
Lampiran 5. Skema Cara Kerja Ekstraksi Senyawa Antimikroba Dari Kapang Endofit



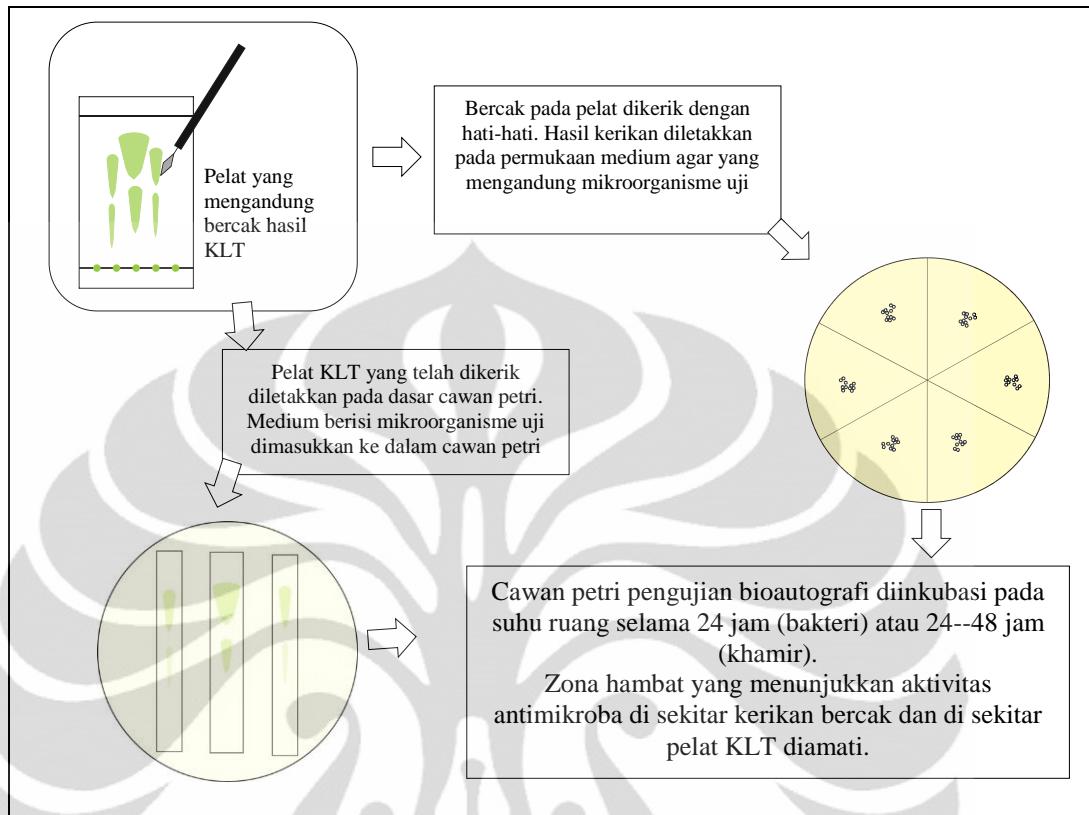
Lampiran 6. Skema Cara Kerja Pengujian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kapang Endofit Terhadap Dengan Difusi Agar Cara Cakram



Lampiran 7. Skema Cara Kerja Kromatografi Lapis Tipis



Lampiran 8. Skema Cara Kerja Bioautografi



Lampiran 9. Standar Warna Faber Castell

101	white	166	grass green
103	ivory	171	light green
102	cream	170	apple green
104	zinc yellow	168	moss green
105	lemon cadmium	167	sap green
106	light chrome	158	sea green
107	lemon	159	Hooker's green
108	canary yellow	165	juniper green
109	orange yellow	172	grey green
111	tangerine	174	cedar green
113	light orange	173	olive green
115	dark orange	175	dark sepia
117	vermilion	177	sepia light
118	scarlet lake	176	van Dyck brown
121	pale geranium lake	178	nougat
126	dark carmine	180	raw umber
127	light carmine	179	bistre
123	fuchsia	182	brown ochre
133	wine red	183	gold ochre
125	dark magenta	185	light ochre
142	madder	184	ochre
128	rose madder lake	186	terracotta
129	pink madder lake	191	Pompeian red
119	light magenta	188	sanguine
134	magenta	187	burnt ochre
135	red violet	189	cinnamon
136	dark violet	190	Venetian red
138	violet	192	Indian red
139	light violet	193	burnt carmine
140	light ultramarine	169	caput mortuum
160	manganese violet	194	purple
137	blue violet	124	rose carmine
141	Delft blue	130	dark flesh
157	dark indigo	131	medium flesh
144	light cobalt blue	132	light flesh
120	ultramarine	270	warm grey I
143	deep cobalt	271	warm grey II
146	sky blue	272	warm grey III
147	light blue	273	warm grey IV
145	light phthalo blue	274	warm grey V
152	dark phthalo blue	275	warm grey VI
110	zinc blue	230	cold grey I
151	Prussian blue	231	cold grey II
149	oriental blue	232	cold grey III
155	night green	233	cold grey IV
153	peacock blue	234	cold grey V
154	aquamarine	235	cold grey VI
156	blue green	181	Payne's grey
161	viridian	199	black
163	emerald green	099	soft black
162	true green	250	gold
112	leaf green	251	silver
		252	copper