

**SKRINING KAPANG ENDOFIT PENGHASIL ANTIMIKROBA
DAN ANTIOKSIDAN DARI RANTING DAN DAUN TANAMAN**

Garcinia mangostana

RENITA RACHMAYANI

0305250506



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
PROGRAM SARJANA EKSTENSI
DEPOK
2008**

**SKRINING KAPANG ENDOFIT PENGHASIL ANTIMIKROBA DAN
ANTIOKSIDAN DARI RANTING DAN DAUN TANAMAN**

Garcinia mangostana

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi

Oleh:
RENITA RACHMAYANI
0305250506



DEPOK
2008

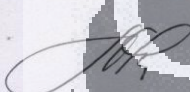
SKRIPSI : SKRINING KAPANG ENDOFIT PENGHASIL
ANTIMIKROBA DAN ANTIOKSIDAN DARI RANTING
DAN DAUN TANAMAN *Garcinia mangostana*

NAMA : RENITA RACHMAYANI

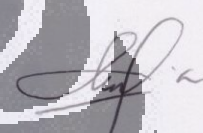
NPM : 0305250506

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2008



Dr. Atiek Soemiati, MS
PEMBIMBING I



Dr. Berna Elysa, MS
PEMBIMBING II

Tanggal lulus Ujian Sidang Sarjana :

Penguji I : Dr. Yahdiana H, MS

Penguji II : Dr. Maksim Radji, M Biomed

Penguji III : Dr. Abdul Mun'im, MS

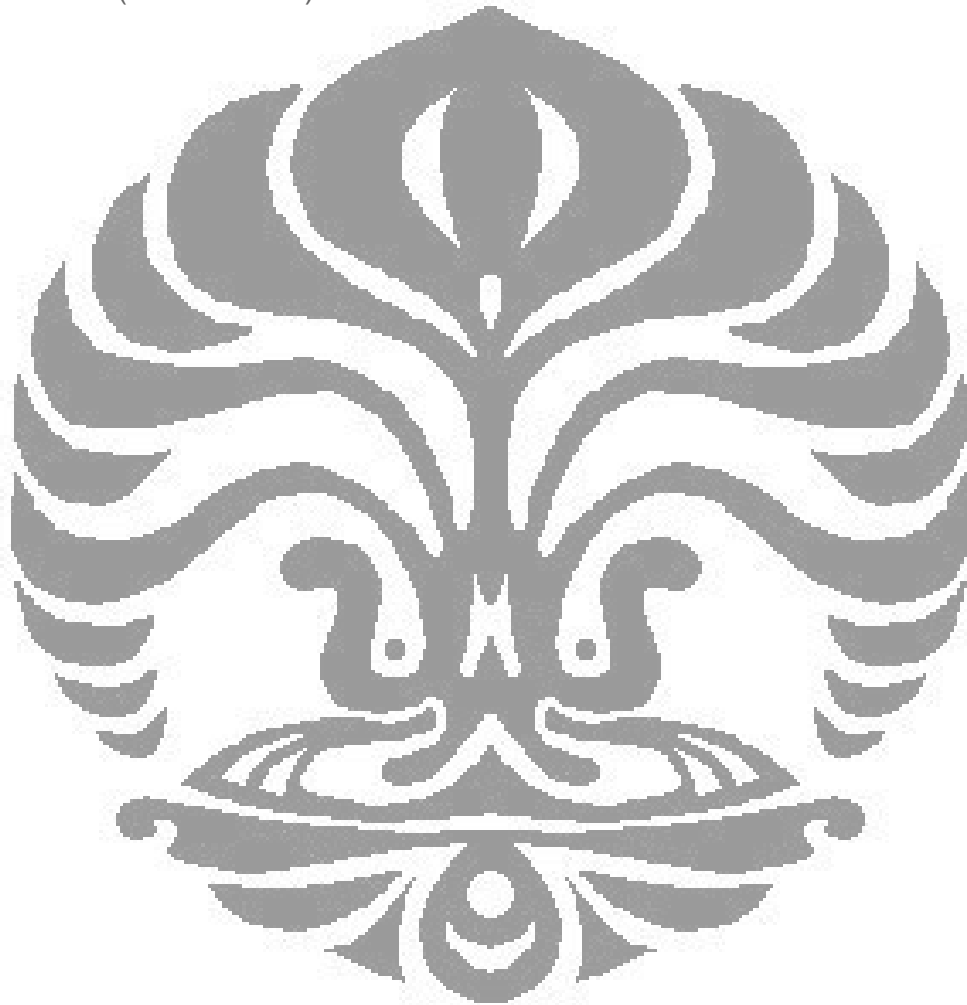
ABSTRAK

Endofit merupakan mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman dan merupakan hubungan simbiosis mutualisme. Senyawa metabolit hasil fermentasi kapang endofit dapat digunakan sebagai sistem pertahanan bagi tumbuhan terhadap bakteri dan jamur patogen. Beberapa senyawa bioaktif yang dihasilkannya juga berfungsi sebagai sumber potensial obat baru. Tujuan penelitian ini adalah untuk mencari sumber potensial antimikroba dan antioksidan kapang endofit yang diisolasi dari ranting dan daun tanaman *Garcinia mangostana*. Fermentasi dilakukan terhadap kapang endofit yang telah diisolasi. Hasil fermentasi kapang endofit diekstraksi dengan menggunakan pelarut organik etil asetat, *n*-butanol, dan methanol. Hasil ekstraksi yang diperoleh berupa fraksi-fraksi dari masing-masing pelarut organik. Ekstrak yang diperoleh diuji aktivitasnya sebagai antimikroba dan antioksidan. Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode cakram dan uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan radikal 1,1-difenilkrilhidrazil (DPPH). Uji aktivitas antimikroba dilakukan terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhosa*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, Khamir *Candida albicans*, dan kapang *Aspergillus niger*. Hasil menunjukkan zona hambat terbesar dihasilkan oleh ekstrak R2.M terhadap *Bacillus subtilis* (12,85 mm) dan terhadap *Staphylococcus aureus* (11,90 mm). Aktivitas antioksidan terbaik diperoleh dari ekstrak *n*-butanol R18.B dengan nilai IC_{50} 107,71 μ g/ml.

Kata kunci: Kapang endofit, antimikroba, antioksidan, *Garcinia mangostana*

xiv + 101 hlm; gbr; tab; lamp.

Bibliografi : 50 (1980 – 2008)



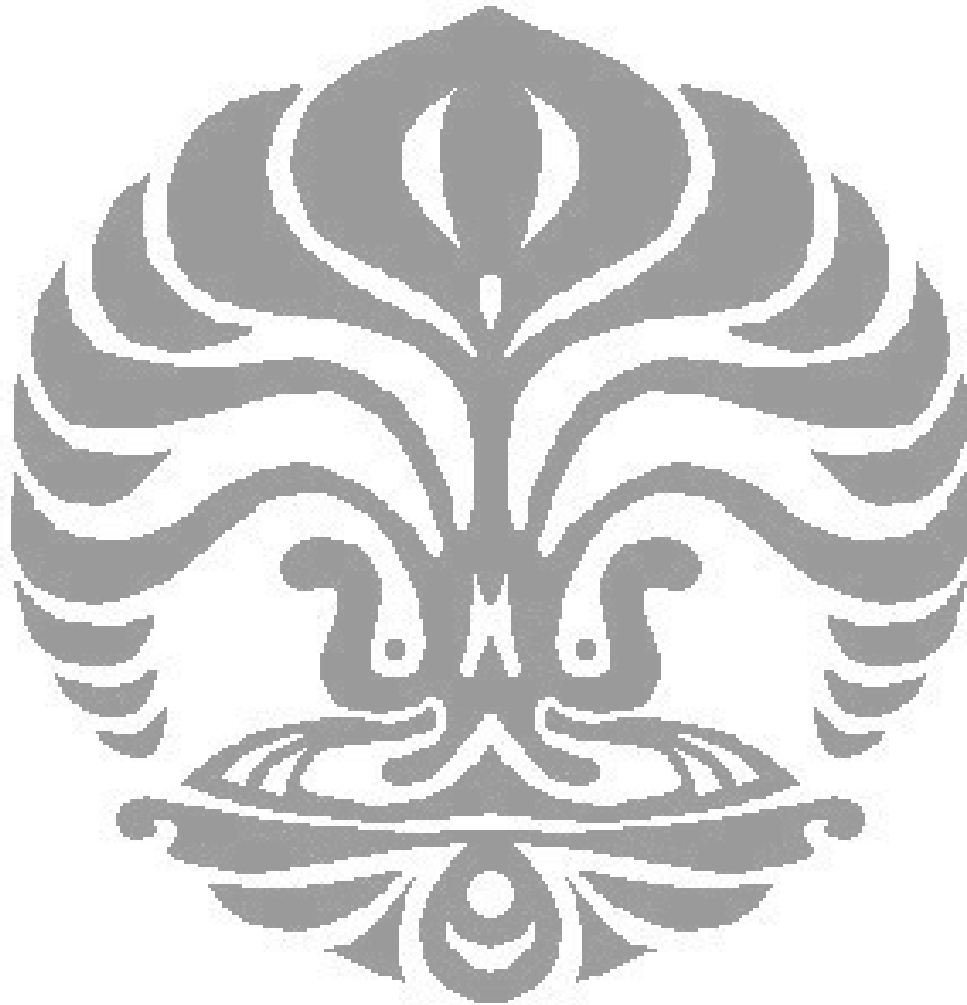
ABSTRACT

Endophytes are microbial entities that live within living tissue of plants and have symbiotic mutualism relationship. Metabolite compounds as a result of fermentation of endophytic fungi are useful as a defense against pathogenic fungi and bacteria. Some of bioactive compounds that are produced by endophytic fungi are also useful for novel drug discovery. This research was done to screen new potential sources for antimicrobial and antioxidant agent from endophytic fungi that were isolated from twigs and leaves of *Garcinia mangostana*. Fermentation was done to endophytic fungi which had been isolated from sample. The fermentation products of endophytic fungi were extracted by using organic solvent ethyl acetate, *n*-butanol, and methanol. The result was some fractions from each solvent that was used. The extracts then were tested as antimicrobial and antioxidant activity. Antimicrobial assay was done by using the disc method and antioxidant was tested by using free radical 1,1-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH). Antimicrobial assay was done against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhosa*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, dan *Aspergillus niger*. The result showed that the largest zone of inhibition was performed by R2.M extract against *Bacillus subtilis* (12.85 mm) and against *Staphylococcus aureus* (11.90 mm). The best antioxidant activity was resulted from R18.B extract with IC₅₀ 107.71 µg/ml.

Key word: endophytic fungi, antimicrobial, antioxidant, *Garcinia mangostana*

xiv + 101 pages; pitures; tables; appendix

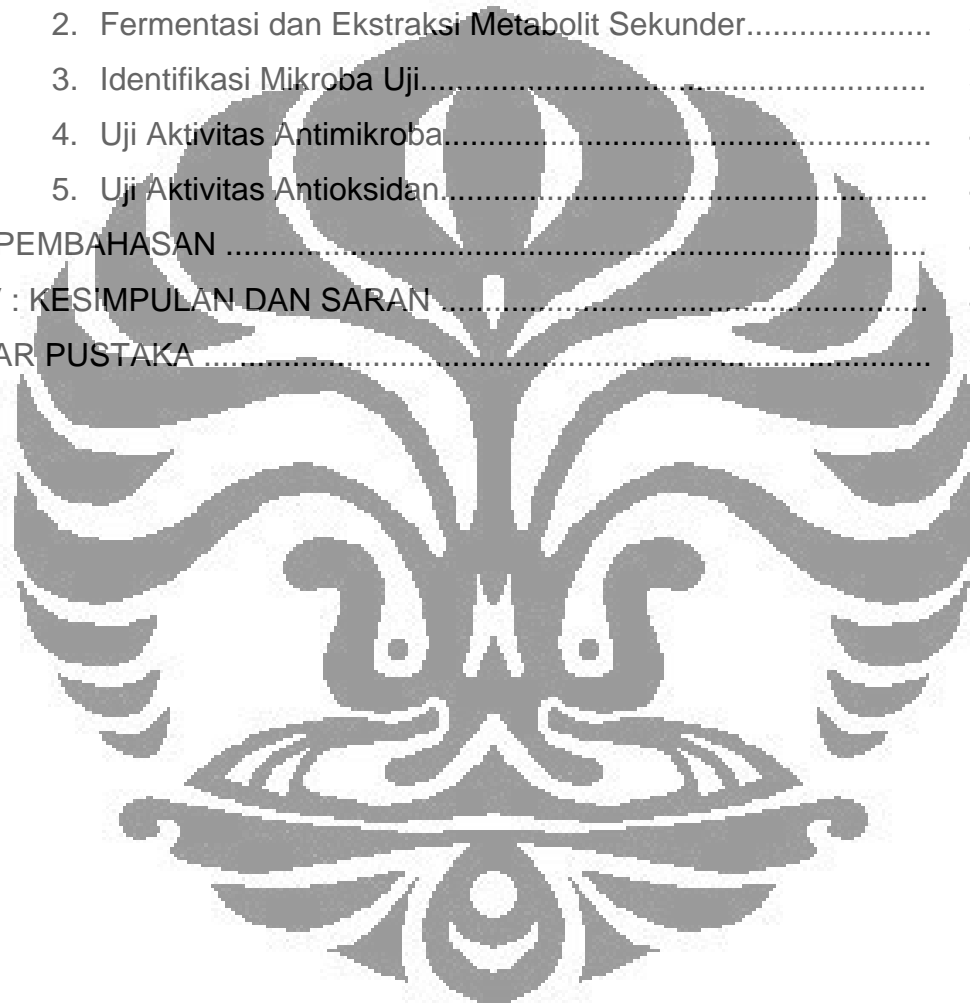
Bibliography : 40 (1980 – 2008)



DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	v
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I : PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Tujuan.....	3
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Endofit.....	5
B. <i>Garcinia mangostana</i>	7
C. Antimikroba.....	9
D. Antioksidan	12
E. Spektrofotometri uv-vis.....	14
F. Mikroba Patogen	16
BAB III : METODE PENELITIAN	23
A. Bahan.....	23
B. Alat	24
C. Cara Kerja	25
1. Pembuatan Medium Isolasi Kapang Endofit.....	25
2. Pembuatan Medium Pemurnian Kapang Endofit.....	25
3. Pembuatan Medium Fermentasi Kapang Endofit.....	25
4. Sampling Tanaman dan Penyimpanan Sampel.....	26
5. Sterilisasi Permukaan dan Isolasi Kapang Endofit.....	26
6. Pemurnian dan Peremajaan Kapang Endofit.....	27
7. Fermentasi Kapang Endofit.....	28

8. Ekstraksi Hasil Fermentasi.....	28
9. Uji Aktivitas Antimikroba.....	29
10. Uji aktivitas Antioksidan.....	34
BAB IV : HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
A. HASIL	37
1. Isolasi Kapang Endofit.....	37
2. Fermentasi dan Ekstraksi Metabolit Sekunder.....	37
3. Identifikasi Mikroba Uji.....	38
4. Uji Aktivitas Antimikroba.....	40
5. Uji Aktivitas Antioksidan.....	41
B. PEMBAHASAN	42
BAB V : KESIMPULAN DAN SARAN	49
DAFTAR PUSTAKA	51



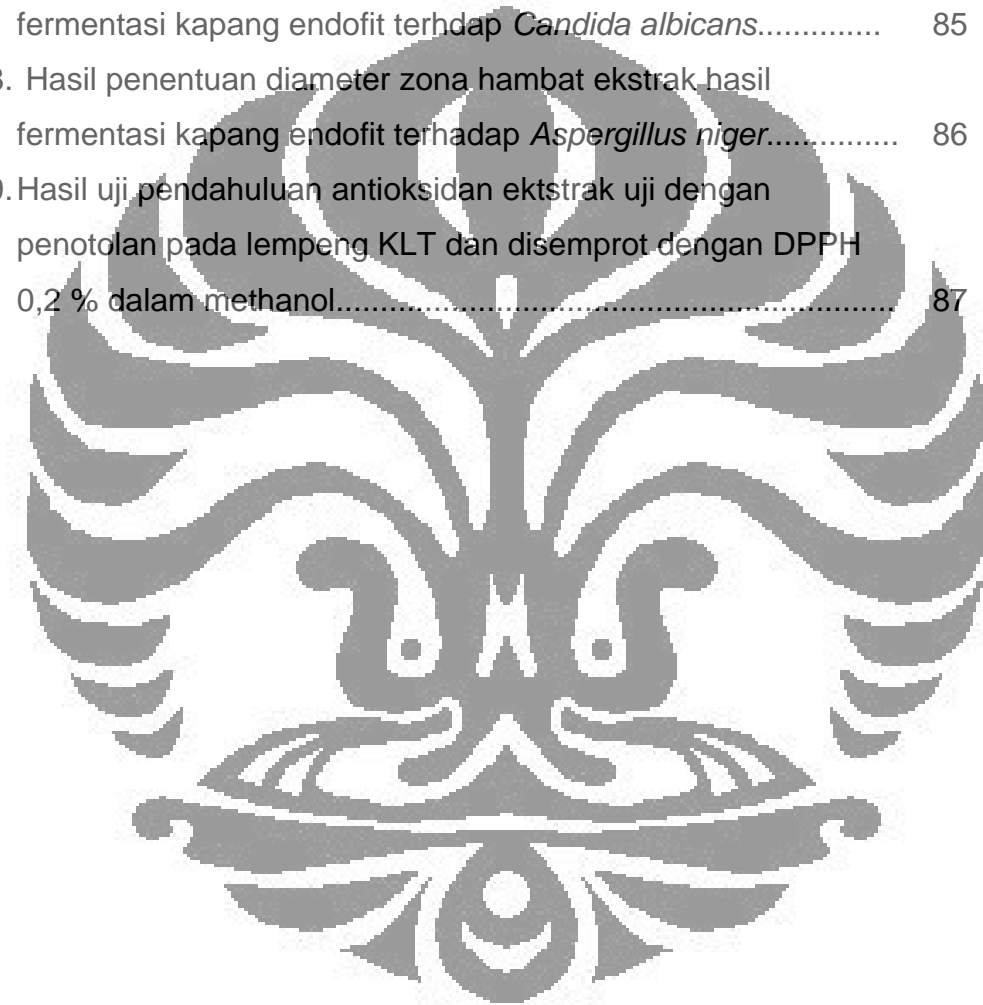
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman <i>Garcinia mangostana</i> L yang digunakan dalam seleksi kapang endofit penghasil antimikroba dan antioksidan	59
2. Isolasi kapang endofit.....	60
3. Identifikasi mikroba uji dengan pewarnaan Gram secara mikroskopik (perbesaran 1000 kali).....	61
4. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R1 yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	62
5. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R1 perbesaran 400 kali.....	62
6. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R2 yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	63
7. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R2 perbesaran 400 kali.....	63
8. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R3 yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	64
9. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R3 perbesaran 400 kali.....	64
10. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit D4 yang diisolasi dari daun tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	65
11. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit D4 perbesaran 400 kali.....	65
12. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit D5a yang diisolasi dari daun tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	66
13. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit D5a perbesaran 400 kali.....	66
14. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit D5b	

yang diisolasi dari daun tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	67
15. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit D5b perbesaran 400 kali.....	67
16. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R6 yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	68
17. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R6 perbesaran 400 kali.....	68
18. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R7 yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	69
19. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R7 perbesaran 400 kali.....	69
20. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R9 yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	70
21. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R9 perbesaran 400 kali.....	70
22. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit D10 yang diisolasi dari daun tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	71
23. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit D10 perbesaran 400 kali.....	71
24. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R13a yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	72
25. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R13a perbesaran 400 kali.....	72
26. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R13b yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	73
27. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R13b perbesaran 400 kali.....	73
28. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit D14 yang diisolasi dari daun tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	74
29. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit D14	

perbesaran 400 kali.....	74
30. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R15a yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	75
31. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R15a perbesaran 400 kali.....	75
32. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R15b yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	76
33. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R15b perbesaran 400 kali.....	76
34. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R17 yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	77
35. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R17 perbesaran 400 kali.....	77
36. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R18 yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	78
37. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R18 perbesaran 400 kali.....	78
38. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R19 yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	79
39. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R19 perbesaran 400 kali.....	79
40. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R20 yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	80
41. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R20 perbesaran 400 kali.....	80
42. Hasil pengamatan secara makroskopik kapang endofit R21 yang diisolasi dari ranting tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	81
43. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R21 perbesaran 400 kali.....	81
44. Hasil penentuan diameter zona hambat ekstrak hasil	

fermenrasi kapang endofit terhadap <i>Bacillus subtilis</i>	82
45. Hasil penentuan diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi kapang endofit terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	83
46. Hasil penentuan diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi kapang endofit terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84
47. Hasil penentuan diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi kapang endofit terhadap <i>Candida albicans</i>	85
48. Hasil penentuan diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi kapang endofit terhadap <i>Aspergillus niger</i>	86
49. Hasil uji pendahuluan antioksidan ektstrak uji dengan penotolan pada lempeng KLT dan disemprot dengan DPPH 0,2 % dalam methanol.....	87

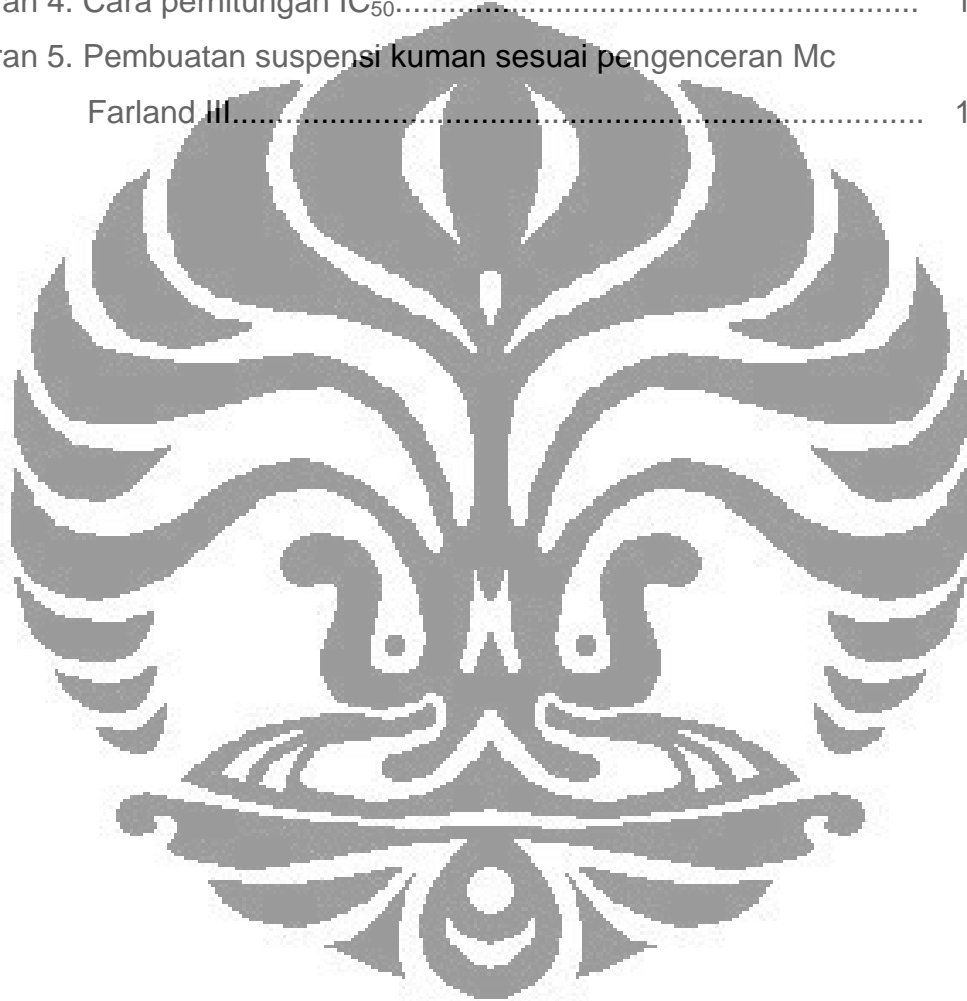


DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil isolasi kapang endofit dari ranting dan daun tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	89
2. Isolat kapang endofit yang difermentasi dan hasil ekstraksi dengan pelarut organik metanol, <i>n</i> – butanol dan etil asetat.....	90
3. Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi dengan konsentrasi 20 µg / cakram terhadap bakteri uji.....	91
4. Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi dengan konsentrasi 40 µg / cakram terhadap bakteri uji.....	92
5. Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi dengan konsentrasi 100 µg / cakram terhadap kapang uji.....	93
6. Hasil uji pendahuluan antiosidan ekstrak metabolit sekunder hasil fermentasi kapang endofit dari tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	94
7. Hasil uji aktivitas peredaman ekstrak metabolit sekunder hasil fermentasi kapang endofit dari tanaman <i>Garcinia mangostana</i>	95

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil determinasi tanaman <i>Garcinia mangostana</i> L.....	97
Lampiran 2. Bagan tahapan penelitian.....	98
Lampiran 3. Bagan tahapan isolasi kapang endofit.....	99
Lampiran 4. Cara perhitungan IC_{50}	100
Lampiran 5. Pembuatan suspensi kuman sesuai pengenceran Mc Farland III.....	101



BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Peningkatan jumlah penduduk dunia yang mempunyai masalah kesehatan yang disebabkan oleh kanker, bakteri resisten, protozoa parasit dan jamur melatarbelakangi berkembangnya penelitian untuk menemukan senyawa yang efektif untuk mengatasinya. Oleh sebab itu, dikembangkan penelitian untuk menemukan senyawa terbaru yang lebih efektif untuk mengatasi masalah ini (1).

Sejak tahun 1980-an mulai muncul minat industri farmasetika dan bioteknologi untuk memanfaatkan produk hasil alam dalam pengembangan obat baru (*natural product drug discovery*). Fakta menunjukkan bahwa bahan alam menjadi sumber inspirasi bagi para ahli kimia karena alam memiliki keanekaragaman struktur molekul termasuk molekul berukuran kecil. Bahan aktif dan molekul terapeutik yang bersumber dari alam memiliki berbagai karakteristik. Umumnya bahan aktif merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan mikroba atau tanaman (2).

Perkembangan penelitian di bidang farmasetik dan industri pertanian dalam menemukan produk baru, menunjukkan bahwa alam mampu menghasilkan beraneka senyawa kimia sebagai sumber substansi yang potensial untuk dikembangkan menjadi produk industri. Penelitian mengenai metabolit sekunder terfokus pada organisme yang dapat menghambat biotop

asing sebab produk-produk alam merupakan produk yang diadaptasi untuk fungsi spesifik di alam. Organisme yang mampu menghambat ini adalah endofit (3).

Endofit didefinisikan sebagai mikroba yang hidup di dalam jaringan internal tumbuhan hidup tanpa menyebabkan efek negatif langsung yang nyata. Endofit belum banyak diteliti dan merupakan sumber daya alam potensial untuk dimanfaatkan dalam bidang medis, pertanian dan industri. Tercatat sekitar 300.000 spesies di muka bumi, masing-masing merupakan tempat hidup (inang) bagi endofit. Hanya beberapa tanaman telah diteliti endofitnya. Oleh sebab itu, kesempatan untuk menemukan dan meneliti mikroorganisme ini sangat besar (4).

Hutan hujan tropis merupakan penyedia berbagai bahan kebutuhan untuk kehidupan dan kesejahteraan manusia, diantaranya adalah sebagai bahan obat. Sumber alam hayati tropika "*biodiversity*" Indonesia yang sangat beranekaragam merupakan sistem kimiawi yang mampu menghasilkan aneka senyawa utama. Salah satu keanekaragaman tersebut berasal dari famili Cluciaceae. Genus *Garcinia* adalah salah satu dari 40 genus pada famili Cluciaceae yang memiliki tidak kurang dari 400 spesies yang tersebar di daerah tropis. *Garcinia* adalah salah satu genus tumbuhan yang memiliki kemampuan bioteknologi alami yang tinggi yang diperlihatkan oleh senyawa-senyawa yang telah dilaporkan memiliki tingkat oksidasi beragam dari turunan xanton, kumarin, benzofenon dan biflavonoid terprenilasi (5).

Garcinia mangostana atau lebih dikenal dengan manggis adalah salah satu spesies dari Genus *Garcinia* yang telah diketahui memiliki aktivitas antimikroba, antikanker, antiinflamasi, dan antioksidan (6). Sehubungan dengan hal tersebut, dilakukan penelitian terhadap kapang endofit yang diisolasi dari ranting dan daun tanaman *Garcinia mangostana*. Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan untuk mengetahui aktivitas antimikroba dan antioksidan kapang endofit yang diisolasi dari ranting dan daun tanaman *Garcinia mangostana*. Uji aktivitas antimikroba dilakukan terhadap beberapa mikroorganisme yang menyebabkan penyakit pada manusia dan uji antioksidan dilakukan dengan mengukur kemampuan peredaman terhadap radikal 1,1-difenilpicrilhidrazil (DPPH).

B. TUJUAN

1. Memperoleh isolat kapang endofit dari ranting dan daun tanaman *Garcinia mangostana*.
2. Mengetahui aktivitas antimikroba kapang endofit yang diperoleh terhadap mikroba patogen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhosa*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, Khamir *Candida albicans*, dan kapang *Aspergillus niger*.
3. Mengetahui aktivitas antioksidan isolat kapang endofit yang diperoleh.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. MIKROBA ENDOFIT

1. Definisi

Endofit adalah mikroba yang hidup di antara jaringan hidup tanaman. Secara umum, hubungannya dengan tanaman inang adalah simbiosis mutualisme. Sebagian besar endofit mampu mensintesis senyawa-senyawa bioaktif yang dapat digunakan oleh tanaman sebagai sistem pertahanan melawan jamur dan bakteri patogen. Endofit dapat didefinisikan sebagai mikroba yang hidup berkoloni di dalam jaringan tanaman tanpa mengakibatkan efek negatif. Definisi ini menunjukkan hubungan simbiosis mutualisme antara tanaman inang dengan mikroba endofit. Sebagian besar endofit adalah berupa kapang. Selain itu, ada juga yang berupa bakteri yang hidup sebagai endofit tanaman dan hidup berdampingan bersama-sama dengan kapang (7).

2. Isolasi dan Skrining Mikroba Endofit (8,9)

Prosedur untuk mengisolasi endofit pada umumnya relatif mudah. Salah satu hal yang penting dalam mengisolasi kapang endofit adalah mempertahankan kesegaran sampel. Bila sampel disimpan dalam waktu yang cukup lama, akan terjadi kematian jaringan. Meskipun demikian, masih memungkinkan untuk mengisolasi sejumlah kapang endofit dari jaringan kayu

yang telah layu setelah penyimpanan beku (*Freezing*) dalam waktu lebih dari satu tahun.

Isolasi dimulai dengan melakukan sterilisasi permukaan. Metode standar yang biasa digunakan adalah dengan mencelupkan ke dalam etanol dan larutan natrium hipoklorit (NaOCl). Etanol berfungsi sebagai surfaktan dan NaOCl berfungsi sebagai aktualisasi proses sterilisasi permukaan. Pelarut dan waktu yang digunakan untuk sterilisasi bervariasi sesuai dengan jaringan dan inang. Pada umumnya, jaringan kayu dan daun dengan kutikula yang tebal disterilisasi dengan sempurna dibandingkan dengan jaringan daun yang tipis. Percobaan menunjukkan bahwa sterilisasi yang dilakukan berturut-turut dengan mencelupkan ke dalam etanol-NaOCl-etanol efektif untuk membunuh spora berdinding tebal seperti yang terdapat pada beberapa kapang kontaminan yang sering ditemukan. Alternatif lain yang dapat digunakan untuk sterilisasi permukaan adalah dengan menggunakan 0,05 – 1% asam perasetat dalam 30% etanol.

Perendaman dalam etanol diikuti dengan *flambeer* juga memberikan hasil sterilisasi permukaan yang baik. Metode ini efektif untuk menghilangkan kapang penginfeksi. Potongan sampel yang terinfeksi dicelupkan ke dalam etanol, kemudian dilewatkan pada api (*flambeer*) sebelum ditanam pada media agar. Metode ini umumnya berhasil digunakan pada jaringan yang terinfeksi.

Isolasi kapang endofit dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai media agar. Media isolasi yang biasa digunakan adalah *Corn Meal*

Malt agar (CMM) dan *Nutrien Agar* (NA). CMM digunakan untuk menumbuhkan isolat kapang endofit sedangkan NA digunakan untuk menumbuhkan isolat bakteri endofit. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 5 – 7 hari tergantung laju pertumbuhan isolat bakteri atau fungi endofit. Waktu yang diperlukan untuk mengisolasi endofit cukup lama karena umumnya endofit bersifat lambat tumbuh (9).

Sebagian besar endofit akan bersporulasi setelah beberapa minggu pada suhu 15 – 21°C pada ruangan dengan atau tanpa cahaya menggunakan media *Malt Extract Agar* (MEA). Untuk isolat yang tidak bersporulasi, dapat digunakan beberapa metode untuk merangsang sporulasi. Penyimpanan pada 8 °C di bawah sinar ultraviolet atau fluoresensi dengan siklus 12 jam gelap-terang atau inkubasi pada 4 °C pada ruang gelap dapat menginduksi sporulasi pada beberapa fungi. Pemindahan isolat yang tidak bersporulasi ke dalam media *corn meal agar*, *V8 agar*, *potato carrot agar*, atau pada media yang kimia seperti *Czapek's agar*, *potato dextrose agar* dan lain-lain juga dapat merangsang sporulasi.

B. *Garcinia mangostana*

Garcinia mangostana di Indonesia lebih populer dengan manggis. Tanaman ini merupakan tanaman buah berupa pohon yang berasal dari hutan tropis yang teduh di kawasan Asia Tenggara, yaitu hutan belantara Malaysia atau Indonesia. Tanaman ini tersebar dari Asia Tenggara ke daerah Amerika Tengah dan daerah tropis lainnya seperti Srilanka, Malagasi, Karibia,

Hawaii, dan Australia Utara. Tanaman ini memiliki klasifikasi yang sama dengan tanaman genus *Garcinia* lainnya. Klasifikasi manggis adalah sebagai berikut:

Divisio : Spermatophyta
Subdivisio : Angiospermae
Classis : Dicotyledonae
Ordo : Cluceaceae
Famili : Clusiaceae
Genus : *Garcinia*
Species : *Garcinia mangostana* (10)

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia dari tanaman *Garcinia mangostana*. Metabolit yang paling banyak ditemui pada tanaman ini adalah senyawa xanton yaitu α -mangostin, β -mangostin dan γ -mangostin. Senyawa ini pernah diisolasi dari bagian buah tanaman manggis (11). Senyawa lain yang telah ditemukan terkandung dalam tanaman ini adalah glikosida antosianin, benzofenon, maklurin, dan beberapa turunan senyawa xanton lainnya seperti calabaxanton (12).

Ekstrak metanol dari tanaman ini pernah diteliti mempunyai aktivitas antioksidan. Hasil elusidasi struktur senyawa kimia dari ekstrak metanol ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari tanaman ini mengandung senyawa kudraxanton, 8-doeksigartanin, garsimangoson, garsinon, gartanin, 1-isomangostin, α -mangostin, γ -mangostin, mangostinon, smeatxanton A, dan

tovofilin A. Diantara seluruh senyawa tersebut, yang memiliki aktivitas antioksidan paling potensial adalah gartanin, α -mangostin, γ -mangostin, dan smeatxanton A (13).

Bagian buah dari tanaman ini mengandung senyawa xanton diprenilasi. Senyawa ini memiliki aktivitas antimikroba terhadap *M. tuberculosis* (14). Selain itu, bagian kulit dari tanaman ini juga telah diteliti mempunyai aktivitas antimikroba terhadap bakteri uji *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli* (15). Kapang endofit pernah diisolasi dari beberapa spesies tanaman dari genus *Garcinia* di Thailand. Salah satu spesies yang berhasil diisolasi kapang endofit-nya adalah *Garcinia mangostana*. Hasil isolasi diuji memiliki aktivitas antimikroba terhadap mikroba patogen *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* dan *Cryptococcus neoformans* (16).

C. ANTIMIKROBA

1. Definisi

Antimikroba adalah obat pembasmi mikroba khususnya mikroba yang merugikan manusia. Komponen antimikroba adalah suatu komponen yang bersifat dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau kapang (bakteristatik atau fungistatik) atau membunuh bakteri atau kapang (bakterisidal atau fungisidal) (17).

Berbagai antimikroba yang telah diperoleh perlu diuji aktivitasnya terhadap mikroba dengan melakukan kultur uji untuk sensitivitas obat antimikroba. Aktivitas antimikroba diuji dengan menghitung jumlah senyawa yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba uji yang dinyatakan dengan teknik pengenceran dalam tabung reaksi atau dengan menggunakan metode difusi (metode cakram) (18).

2. Uji Aktivitas Antimikroba dengan Metode Cakram (18)

Uji aktivitas antimikroba dengan metode cakram juga dikenal sebagai metode difusi agar. Prinsip dari metode ini adalah penggunaan konsentrasi tertentu dari antibiotik pada suatu pembawa (*reservoir*) yang diletakkan pada permukaan agar yang digunakan sebagai kultur mikroorganisme uji. Pengaruh mikroorganisme terhadap antibiotik ditunjukkan oleh zona bening yang dikenal dengan zona hambat di sekitar pembawa (cakram). Diameter zona hambat sebanding dengan pengaruh terhadap mikroorganisme uji.

Pelaksanaan uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan memperhatikan beberapa teknik sebagai berikut:

a. Wadah / cawan yang digunakan

Media agar yang dimasukkan ke dalam cawan mempunyai ketebalan sampai dengan ± 4 mm. Untuk cawan dengan diameter 9 – 15 cm, jumlah media yang dapat dimasukkan kedalam cawan adalah 25 – 60 ml. Variasi ketebalan agar dapat mempengaruhi zona hambat yang terbentuk. Lapisan agar yang sangat tipis mengakibatkan

peningkatan ukuran zona hambat yang signifikan. Walaupun demikian, perbedaan kecil dalam hal ini cukup mempengaruhi ukuran zona yang terbentuk.

b. Cakram yang digunakan

Cakram yang digunakan harus selalu berada dalam keadaan kering dan disimpan pada kondisi anhidrat. Cakram dapat disimpan dalam wadah yang baik untuk waktu lebih dari 6 bulan pada suhu 2 – 8 °C. Pengawetan cakram lebih baik dilakukan dengan penyimpanan pada suhu – 20 °C.

c. Pemilihan cakram antimikroba

Pemilihan cakram antimikroba yang digunakan dilakukan berdasarkan jenis mikroba yang akan diuji. Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan cakram antimikroba adalah kelompok dan spektrum antibiotik dan alasan pemilihan antibiotik yang digunakan.

d. Peletakan cakram

Cakram antibiotik diletakkan sesegera mungkin setelah inokulasi dilakukan (tidak lebih dari 15 menit) dengan menggunakan pinset dan ditekan perlahan pada permukaan agar. Cakram diletakkan 15 mm dari pinggir cawan dan jarak antar cakram antara 15 – 20 mm untuk mencegah tercampurnya zona hambat yang terbentuk. Cakram tidak boleh dipindahkan sejak pertama kali

diletakkan sebab permukaan agar langsung terjadi proses difusi setelah cakram diletakkan.

e. Inkubasi

Inkubasi dilakukan pada suhu 35 – 37 °C selama 18 jam dengan posisi terbalik. Inkubasi biasanya dilakukan secara aerob dan penggunaan CO₂ dicegah khususnya untuk spesies tertentu sebab peningkatan CO₂ akan mengakibatkan penurunan pH media.

D. ANTIOKSIDAN

1. Radikal Bebas dan Antioksidan

Radikal bebas merupakan molekul atau fragmen molekul yang mempunyai elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas ini menjadi penyebab meningkatnya aktivitas pembelahan sel yang abnormal (20). Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa radikal bebas mengakibatkan kerusakan pada oksidasi lipid, protein dan asam nukleat. Senyawa antioksidan merupakan senyawa yang sangat penting untuk menghambat atau menunda pembentukan substrat yang dapat teroksidasi (21).

2. Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Radikal DPPH

Antioksidan banyak terkandung dalam tanaman. Senyawa antioksidan yang diperoleh dari bahan alam diuji aktivitasnya dengan menggunakan metode pengujian aktivitas antioksidan. Salah satu metode yang dapat

digunakan adalah pengukuran kemampuan meredam radikal DPPH. Prinsip reaksi antara radikal DPPH terhadap antioksidan adalah melalui donor atom hidrogen antioksidan pada radikal DPPH yang berwarna ungu. Hasil reaksi adalah senyawa non-radikal yang berwarna kuning pucat dan dapat diukur serapannya pada panjang gelombang 517 nm (22).

Salah satu parameter yang digunakan untuk mengetahui aktivitas peredaman terhadap radikal bebas dengan metode DPPH adalah dengan penentuan nilai IC_{50} menggunakan spektrofotometri. Nilai IC_{50} didefinisikan sebagai konsentrasi substrat yang menyebabkan hilangnya 50% aktivitas DPPH (23). Hal-hal yang harus diperhatikan pada penggunaan metode DPPH dengan spektrofotometri yaitu:

a. Wadah untuk reaksi

Pengukuran dapat dilakukan dengan menggunakan kuvet berukuran 1 x 1 cm dengan volume maksimum 4 ml. Akurasi analisis yang optimal adalah dengan mereaksikan 2 ml larutan DPPH dan 2 ml pereduksi, kecuali jumlah yang dapat digunakan tidak mencukupi.

b. Pelarut dan pH

Metode ini dapat bekerja dengan baik bila menggunakan pelarut metanol atau etanol. Penggunaan pelarut lain seperti air dan aseton memberikan hasil yang kurang baik untuk tingkat reduksi.

c. Konsentrasi reagen dan penggunaan standar

Berdasarkan persyaratan pengukuran pada spektrofotometri, konsentrasi DPPH pada kuvet sebaiknya dipilih pada konsentrasi yang dapat memberikan serapan kurang dari 1,0. Serapan ini dapat diberikan oleh larutan DPPH dengan konsentrasi antara 50 - 100 μM .

Pada saat pengukuran sangat baik bila digunakan kontrol positif sebagai standar antioksidan. Standar yang baik dan banyak digunakan adalah asam askorbat (vitamin C) dan α -tokoferol (vitamin E). Tahap ini dilakukan untuk mengevaluasi bahwa prosedur dapat berjalan dengan benar.

d. Pengukuran serapan: panjang gelombang dan alat yang digunakan

Panjang gelombang maksimum serapan (λ_{max}), yang digunakan untuk pengukuran serapan bervariasi mulai dari 515 nm, 516 nm, 517 nm, 518 nm dan 520 nm. Walaupun demikian, pada prakteknya nilai serapan yang mutlak tidak penting, maka panjang gelombang dapat diatur pada serapan maksimum yang ditunjukkan pada alat yang digunakan.

e. Waktu reaksi

Waktu reaksi yang biasa digunakan adalah 30 menit (seperti yang tersebut pada metode asli Blois). Beberapa

penelitian telah dilakukan sebagai optimasi dari waktu seperti dilakukan 5 menit atau 10 menit. Meskipun demikian, kecepatan reaksi bervariasi, dan yang terbaik adalah membiarkan reaksi berlangsung sampai seluruh substrat bereaksi sempurna.

E. SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS

Spektrofotometri serapan merupakan pengukuran suatu interaksi antara radiasi elektromagnetik dan molekul atau atom dari suatu zat kimia. Spektrum ultraviolet dan cahaya tampak suatu zat pada umumnya tidak mempunyai derajat spesifikasi yang tinggi. Walaupun demikian, spektrum tersebut sesuai untuk pemeriksaan kuantitatif dan untuk berbagai zat spektrum tersebut bermanfaat sebagai tambahan untuk identifikasi (24).

Alat yang digunakan untuk metode spektrofotometri uv-vis adalah spektrofotometer yang sesuai untuk pengukuran di daerah spektrum ultraviolet dan cahaya tampak. Alat ini terdiri dari suatu sistem optik dengan kemampuan menghasilkan cahaya monokromatik dalam jangkauan 200 nm hingga 800 nm dan suatu alat yang sesuai untuk menetapkan serapan (24).

Spektrofotometer dapat digunakan untuk mengukur besarnya energi yang diabsorpsi. Spektrofotometer uv-vis digunakan terutama untuk analisa kuantitatif. Faktor-faktor yang mempengaruhi spektrum serapan yaitu jenis pelarut, pH larutan, kadar larutan, tebal larutan dan lebar celah. Pelarut yang digunakan tidak boleh mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang pengukuran sampel. Perubahan pH dapat mempengaruhi berubahnya

panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) atau daya serap (a) jika pembuatannya tidak tepat sama dari waktu ke waktu. Konsentrasi larutan yang tinggi akan mengakibatkan terjadinya polimerisasi sehingga λ_{maks} berubah sama sekali. Tebal larutan yang berbeda juga akan memberikan spektrum yang berbeda. Demikian pula dengan lebar celah. Makin lebar celah maka makin lebar pula serapan, cahaya makin polikromatis, resolusi dan puncak kurva tidak sempurna. (25)

E. MIKROBA PATOGEN

Patogen adalah kemampuan mikroorganisme untuk mengakibatkan penyakit atau menginfeksi. Infeksi ini dapat terjadi pada berbagai jaringan organisme tingkat tinggi. Misalnya pada manusia, infeksi dapat terjadi pada jaringan kulit, organ pernafasan, organ pencernaan dan sebagainya (26).

Mikroba patogen dapat berasal dari golongan jamur atau bakteri dan jumlahnya sangat banyak. Berikut adalah penjelasan beberapa bakteri patogen yang digunakan dalam penelitian ini.

1. *Escherichia coli*

Mikroba ini termasuk dalam kelompok bakteri dari famili Enterobacteriaceae dengan karakteristik berupa Gram negatif, memiliki flagel peritrik. Spesies ini bersifat patogen namun juga bersifat komensal yaitu sebagai flora normal dalam saluran

pencernaan manusia dan hewan yang berperan penting dalam proses pencernaan makanan (27).

Species ini merupakan satu-satunya species dari genus *Escherichia*. Klasifikasi bakteri ini adalah sebagai berikut.

Kingdom : Bacteria
 Phylum : Proteobacteria
 Classis : Zymobacteria
 Ordo : Enterobacteriales
 Famili : Enterobacteriaceae
 Genus : *Escherichia*
 Species : *Escherichia coli* (18).

2. *Staphylococcus aureus* (27)

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif berbentuk sel sferis berdiameter 1 μm , membentuk kelompok-kelompok. Ada yang tunggal, berpasangan, berkoloni empat, dan membentuk koloni rantai. Coccus muda merupakan Gram positif.

Klasifikasi bakteri ini adalah sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria
 Phylum : Firmicutes
 Classis : Bacilli
 Ordo : Lactobacillales

Familia : Staphylococcaceae
 Genus : Staphylococcus
 Spesies : *Staphylococcus aureus* (18).

3. *Salmonella typhosa*

Mikroba ini termasuk bakteri yang sering kali menimbulkan infeksi pada manusia atau hewan ketika masuk melalui oral. Bakteri ini ditularkan dari hewan dan produk-produk hewani ke manusia, yang mengakibatkan infeksi pada saluran pencernaan dan infeksi sistemik (27).

Morfologi bakteri ini mirip dengan *E.coli* sebab berasal dari famili yang sama. Klasifikasi bakteri ini adalah sebagai berikut.

Kingdom : Bacteria
 Phylum : Proteobacteria
 Calssis : Zymobacteria
 Ordo : Enterobacteriales
 Familia : Enterobacteriaceae
 Genus : Salmonella
 Species : *Salmonella typhosa* (18).

4. *Bacillus subtilis*

Mikroba ini termasuk kelompok bakteri Gram positif, berbentuk batang, berukuran 1 x 3 – 4 μm . Bakteri ini menyebabkan infeksi pada

manusia dan hewan. Bakteri ini berasal dari famili bacillaceae (27).

Klasifikasi bakteri ini adalah sebagai berikut.

Kingdom	: Bacteria
Phyllum	: Firmicutes
Classis	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Familia	: Bacillaceae
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus subtilis</i> (18)

5. *Pseudomonas aeruginosa*

Mikroba ini merupakan bakteri Gram negatif berukuran 0,6 x 2 µm.

Bakteri ini mengakibatkan infeksi pada inang yang mempunyai daya tahan tubuh yang tidak normal. Bakteri ini, yang hanya sedikit ditemukan pada flora saluran pencernaan dan pada kulit manusia, merupakan kelompok patogen (27).

Bakteri ini berasal dari famili Pseudomonadaceae. Klasifikasi bakteri ini adalah sebagai berikut.

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Classis	: Zymobacteria
Ordo	: Pseudomonadales

Familia : Pseudomonadaceae
Genus : Pseudomonas
Species : *Pseudomonas aeruginosa* (18)

6. *Candida albicans*

Candida termasuk fungi oportunist yaitu fungi yang dapat hidup pada keadaan yang menguntungkan pada orang sehat. Pada kultur atau jaringan, spesies *Candida* tumbuh berbentuk oval, berukuran 3 – 6 µm. *Candida albicans* merupakan salah satu spesies *Candida* yang dapat mengakibatkan kandidiasis (27). Fungi ini termasuk khamir. Klasifikasi khamir ini adalah sebagai berikut.

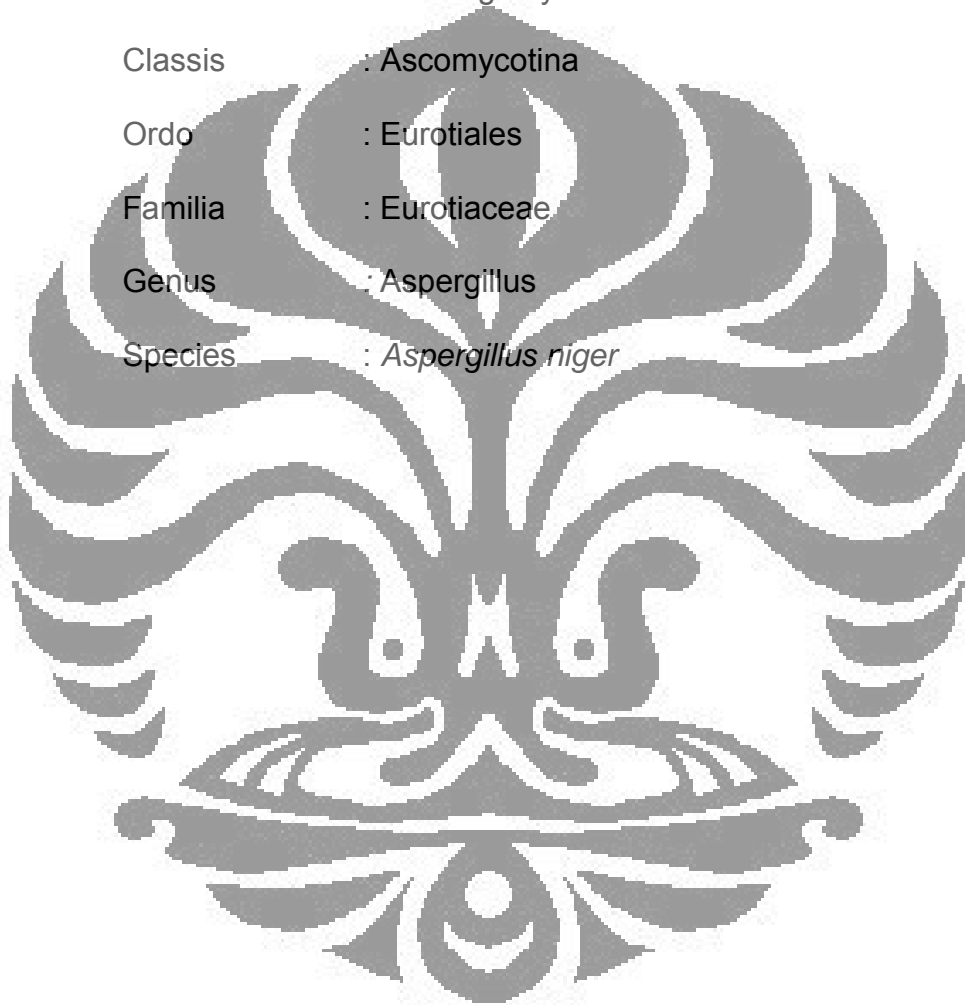
Kingdom : Mycetae
Divisio : Amastigomycota
Classis : Deuteromycetes
Ordo : Cryptococcales
Famili : Cryptococcaceae
Genus : *Candida*
Species : *Candida albicans*

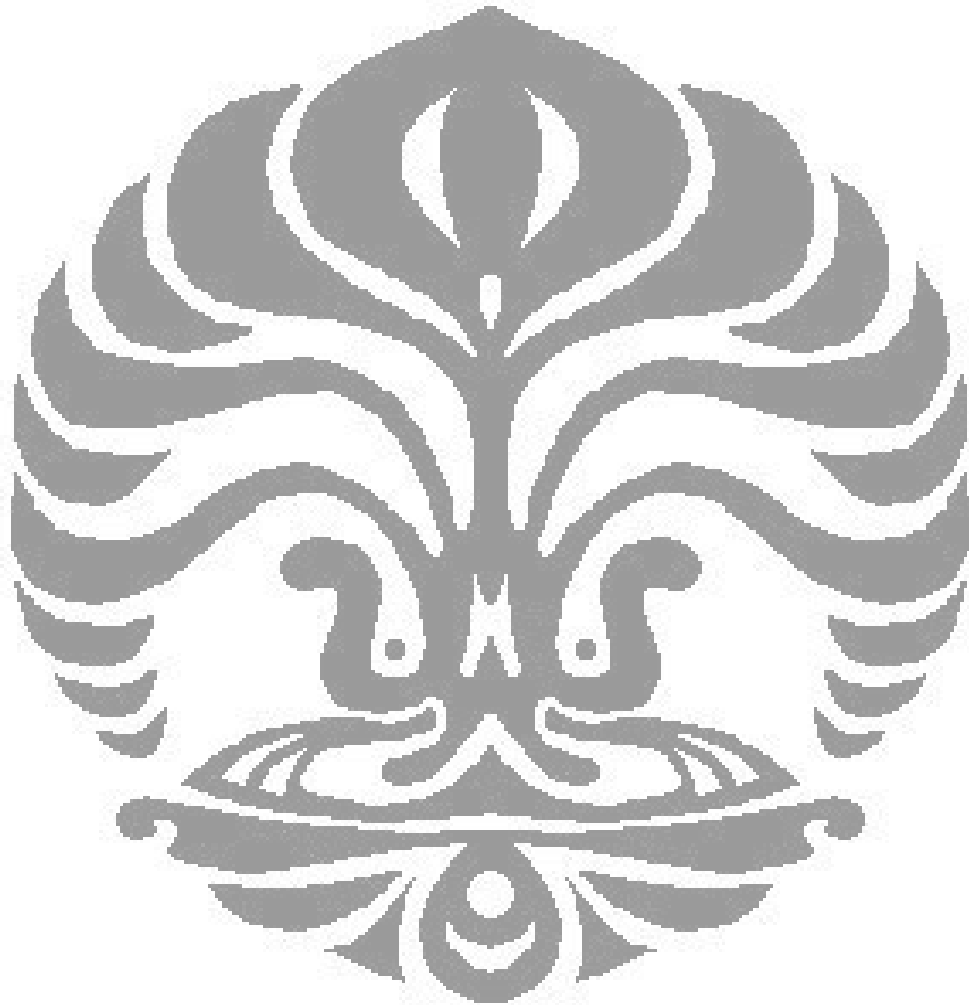
7. *Aspergillus niger*

Spesies *Aspergillus* merupakan penyebab penyakit aspergilosis dan merupakan patogen yang termasuk kelompok fungi. Spesies ini

tersebar sebagai saprofit di alam. *Aspergillus niger* merupakan salah satu species patogen pada manusia (27). Klasifikasi kapang ini adalah sebagai berikut.

Kingdom : Mycetae
Divisio : Amastigomycotina
Classis : Ascomycotina
Ordo : Eurotiales
Familia : Eurotiaceae
Genus : *Aspergillus*
Species : *Aspergillus niger*





BAB III

METODE PENELITIAN

A. BAHAN

1. Tanaman uji

Bahan uji yang digunakan adalah ranting dan daun tanaman *Garcinia mangostana* (Gambar 1) yang diperoleh dari Kebun Raya Bogor dan telah dideterminasi di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Pusat Konservasi Tumbuhan-Kebun Raya Bogor (Lampiran 1).

2. Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan untuk sterilisasi permukaan adalah alkohol 70%, alkohol 96% dan natrium hipoklorit (NaOCl) 5,25% (Baycline). Pelarut kimia yang digunakan untuk ekstraksi adalah etil asetat (Merck), n-butanol (Merck), dan metanol (Merck). Antibiotik yang ditambahkan ke dalam media isolasi adalah kloramfenikol (Merck). Bahan kimia yang ditambahkan pada media fermentasi adalah CaCO_3 (Merck). Bahan kimia yang digunakan sebagai standar uji antimikroba adalah amoksisilin (Brataco Chemical) dan kapsul itrakonazol (Kimia Farma). Bahan kimia yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah 1,1-difenilpikrilhidrazil (DPPH, Sigma), Vitamin C (Kimia Farma), DMSO (Merck), dan metanol *p.a* (Merck). Bahan kimia yang digunakan untuk identifikasi kapang secara mikroskopik adalah *Lactofenol* *Cotton Blue* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FKUI. Bahan kimia

yang digunakan untuk identifikasi mikroba uji adalah Lugol, Kristal violet dan cairan Fukhsin.

3. Media

Media yang digunakan untuk isolasi kapang endofit adalah *Corn Meal Malt Agar* (CMA; Himedia), *Potato Dextrose Agar* (PDA; Difco), *Malt Extract* (Oxoid). Media yang digunakan untuk fermentasi kapang endofit adalah *Potato Dextrose Broth* (PDB; Difco) dan *Yeast Extract* (Oxoid).

4. Mikroba Uji

Mikroba uji yang digunakan adalah mikroba patogen yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhosa* ATCC 14028, kapang patogen *Aspergillus niger* dan khamir *Candida albicans*.

B. ALAT

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Laminar Air Flow* (ESCO), autoklaf (Hirayama), timbangan analitik (Acculab), *vortex mixer* (Digisystem), *orbital shaker* (Lab-line), *hotplate* (Corning), mikroskop cahaya (Euromax-Holland), inkubator (Memmert), sentrifus (Kubota-6800), mikropipet (Socorex), Spektrofotometer UV-Vis model UV-1601 (Shimadzu), kamera (Olympus tipe C-379 Zoom), cawan petri diameter 9 cm, labu bulat, lampu

spiritus, inkubator, jarum ose, tabung reaksi, lupang dan alu, cakram, vial, dan alat-alat yang biasa digunakan pada laboratorium mikrobiologi.

C. CARA KERJA

1. Pembuat Media Isolasi Kapang Endofit

Corn meal ditimbang 17 g/L, *malt extract* sebanyak 20 g/L, *yeast extract* sebanyak 2 g/L, dan kloramfenikol sebanyak 50 g/L, dimasukkan ke dalam labu bulat kemudian dilarutkan dalam 1 liter aquades hingga tercampur sempurna. Panaskan di atas *hot plate* selama $\pm 15 - 20$ menit hingga mendidih dan terbentuk campuran yang homogen, kemudian disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C . Media ini selanjutnya disebut sebagai media CMM (*Corn Meal Malt*).

2. Pembuatan Media Pemurnian Kapang Endofit

PDA ditimbang sebanyak 39 g/L, dimasukkan ke dalam labu bulat kemudian larutkan dalam 1 liter aquades. Panaskan di atas *hot plate* selama $\pm 15 - 20$ menit hingga mendidih dan terbentuk campuran yang homogen, kemudian disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C .

3. Pembuatan Media Fermentasi Kapang Endofit

PDB ditimbang sebanyak 24 g/L, *yeast extract* sebanyak 2 g/L dan CaCO_3 sebanyak 5 g/L, dimasukkan ke dalam labu bulat, kemudian tambahkan aquadest sampai volume 1 liter. Panaskan di atas *hot plate*

selama $\pm 15 - 20$ menit hingga mendidih dan terbentuk campuran yang homogen, kemudian disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. Media ini selanjutnya disebut media PDY (*Potato Dextrose Yeast*).

4. Sampling Tanaman dan Penyimpanan Sampel

Simplisia yang diperoleh dari Kebun Raya Bogor yaitu ranting dan daun *Garcinia mangostana* dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan kotoran yang melekat pada permukaannya, kemudian air dibiarkan kering di udara dan disimpan dalam lemari pendingin suhu $\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Simplisia disimpan selama 5 – 7 hari disesuaikan dengan perubahan kesegaran dari simplisia.

5. Sterilisasi Permukaan dan Isolasi Kapang Endofit

Bagian ranting yang telah dicuci dipotong menjadi potongan-potongan kecil berukuran ± 1 cm sedangkan daun dipotong menjadi potongan-potongan berukuran $\pm 1 \times 1$ cm, lalu disterilkan secara bertingkat dengan mencelupkan ke dalam alkohol 70% selama ± 3 menit kemudian dicelupkan pada larutan NaOCl 5,25% selama ± 1 menit lalu terakhir dicelupkan lagi ke dalam alkohol 70% selama ± 30 detik dengan menggunakan pinset yang sebelumnya telah dilewatkan pada api (*flambeer*) terlebih dahulu (8, 28). Untuk tahap sterilisasi permukaan juga dilakukan dengan menggunakan alkohol 96% dan beberapa modifikasi cara sterilisasi .

Potongan ranting yang telah steril dikupas kulit luarnya dengan pisau steril, dibelah membujur dan dipotong hingga berukuran 0,5 – 1 cm kemudian ditanam di atas permukaan media CMM. Setiap cawan petri dapat ditanam 3 – 4 potongan ranting. Sebagai kontrol sterilisasi permukaan, potongan simplisia yang telah disterilisasi permukaan dipaparkan di atas media CMM lainnya sebagai kontrol steril dan potongan simplisia yang belum disterilisasi permukaan sebagai kontrol nonsteril.

Potongan daun yang telah steril digerus dalam lumpang steril dan ditanam pada permukaan media CMM. Setiap cawan petri dapat ditanam 3 – 4 daun yang telah digerus. Media yang telah ditanam diinkubasi pada suhu kamar selama 14 – 30 hari. Masing-masing cawan petri yang telah ditanam disimpan dalam kotak plastik yang diberi kapur barus untuk menghindari kontaminasi serangga kecil. Bagan mengenai tahapan isolasi dapat dilihat pada Lampiran 3.

6. Pemurnian dan Peremajaan Kapang Endofit

Kapang endofit yang tumbuh pada media CMM kemudian dimurnikan ke dalam media PDA dengan cara hifa kapang diinokulasi dengan menggunakan ose dari media CMM lalu diletakkan pada media PDA kemudian diinkubasi selama 7 – 14 hari. Setiap koloni kapang endofit yang berbeda dipindahkan ke dalam satu cawan petri berisi PDA hingga diperoleh isolat murni. Setiap isolat dibuat duplo, satu untuk *working culture* dan yang lain untuk *stock culture*. Isolat yang telah murni dikultur dalam agar miring

yang pengerjaannya dibuat duplo untuk dijadikan *working cultur* dan *stock cultur*.

7. Fermentasi Kapang Endofit

Koloni kapang endofit murni pada cawan petri media PDA diambil kira-kira 1x1 cm (hifa dan agar), diinokulasi ke dalam 100 ml media PDY dalam Erlenmeyer. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu kamar menggunakan *shaker incubator* 150 rpm selama 10 – 14 hari.

8. Ekstraksi Hasil Fermentasi

Kultur hasil fermentasi diekstraksi sesuai perbedaan polaritas pelarut organik yang digunakan berturut-turut dengan menggunakan etil asetat, *n*-butanol dan metanol. Suspensi kapang endofit hasil fermentasi dimasukkan ke dalam tabung sentrifus kemudian ditambahkan etil asetat setengah dari volume kultur dan dikocok dengan vorteks hingga seluruh kapang dan cairan tersuspensi merata. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit (29). Ekstrak diambil dengan menggunakan *syringe* 5cc, selanjutnya dimasukkan ke dalam vial kering yang telah ditimbang sebelumnya dan dikeringkan pada suhu kamar hingga diperoleh ekstrak kering kemudian vial ditimbang.

Sisa biomassa yang terdapat dalam tabung sentrifus kemudian ditambahkan *n*-butanol setengah dari volume kultur. Kemudian dilakukan prosedur yang sama dengan ekstraksi menggunakan etil asetat yaitu dikocok

dengan vorteks, disentrifugasi kemudian diambil ekstraknya untuk dikeringkan dan diperoleh ekstrak kering dan kemudian vial ditimbang. Sisa biomassa pada tabung sentrifus kemudian diekstraksi lagi dengan metanol menggunakan prosedur yang sama hingga diperoleh ekstrak kering dan vial ditimbang. Bobot ekstrak kering merupakan selisih antara bobot vial berisi ekstrak yang telah dikeringkan dengan bobot vial kosong yang ditimbang mula-mula.

Masing-masing ekstrak kering dilarutkan dalam metanol *p.a* dengan bantuan sedikit DMSO hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 2 mg/ml dan 5 mg/ml sebagai larutan induk. Larutan induk dengan konsentrasi 5 mg/ml dibuat dengan cara menambahkan beberapa tetes DMSO ke dalam vial kemudian volume metanol ditambahkan sebanyak 20% dari bobot ekstrak kering lalu dihomogenkan dengan vorteks. Larutan induk dengan konsentrasi 2 mg/ml dibuat dengan cara menambahkan beberapa tetes DMSO ke dalam vial kemudian volume metanol ditambahkan sebanyak 50% dari bobot ekstrak kering. Untuk memperoleh larutan uji dengan konsentrasi 1 mg/ml, larutan induk diencerkan dengan menggunakan rumus $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$.

9. Uji Aktivitas Antimikroba

a. Identifikasi Mikroba Uji

Identifikasi bakteri uji secara mikroskopis dilakukan dengan menggunakan pewarnaan Gram. Kuman standar pada agar miring dieramkan

selama 18 – 24 jam pada suhu 37 °C untuk selanjutnya dibuat sebagai preparat bakteri dengan cara bakteri diambil satu sengkeliit diletakkan di atas kaca objek yang telah ditetesi sedikit air suling. Sebarkan bakteri pada kaca objek dengan menggunakan ose bulat kemudian dilewatkan di atas api (difiksasi) (30).

Larutan karbol kristal ungu dituangkan diatas preparat yang telah disiapkan kemudian dibiarkan selama 5 menit. Preparat dicuci dengan air. Kemudian cairan lugol dituangkan pada preparat dan dibiarkan selama 45 – 60 detik. Preparat dicuci dengan air lalu kemudian dicuci lagi dengan alkohol 96%, digoyang-goyangkan selama 30 detik. Setelah itu, air fukhsin dituangkan di atas preparat dan dibiarkan selama 1 – 2 menit. Preparat dicuci dengan air dan dikeringkan dengan menggunakan tisu. Preparat ditetesi dengan minyak imersi dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali (30).

Identifikasi kapang uji dilakukan dengan pengamatan secara mikroskopis hifa kapang uji yang telah diwarnai dengan cairan lacto fenol cotton blue. Hifa kapang diambil satu sengkeliit dengan menggunakan ose lurus, kemudian diletakkan di atas kaca objek. Cairan lacto fenol cotton blue ditetaskan di atas kaca objek dan kaca objek ditutup dengan kaca penutup. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali.

b. Pembuatan Inokulum

Kuman standar pada media agar miring dieramkan selama 18 – 24 jam pada suhu 37 °C untuk bakteri dan selama 5 – 7 hari pada suhu 28 °C. Kuman dari pertumbuhan ini dibuat menjadi suspensi kuman 10^9 sesuai dengan kekeruhan standar Mc Farland III dengan cara kuman diinokulasi satu ose dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah diisi dengan 2 ml larutan NaCl fisiologis kemudian dikocok dengan vortex. Kekeruhan suspensi kuman yang dibuat dibandingkan dengan kekeruhan standar Mc Farland III. Apabila kekeruhan belum sama, kuman diinokulasi kembali ke dalam suspensi yang dibuat hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar.

Suspensi kuman 10^9 kemudian diencerkan hingga pengenceran 1000 kali untuk bakteri dan pengenceran 10.000 kali untuk kapang sehingga diperoleh suspensi kuman 10^6 untuk bakteri dan 10^5 untuk kapang. Pengenceran dilakukan dengan cara suspensi kuman 10^9 dipipet 1 ml ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml NaCl fisiologis sehingga diperoleh suspensi kuman 10^8 . Suspensi kuman 10^8 dipipet 1 ml ke dalam 9 ml NaCl fisiologis sehingga diperoleh suspensi kuman 10^7 . Demikian seterusnya hingga diperoleh suspensi kuman 10^6 untuk bakteri dan 10^5 untuk kapang (30). Bagan pembuatan suspensi kuman sesuai standar Mc Farland III dan tahap pengenceran dapat dilihat pada Lampiran 5.

c. Pembuatan Media Uji Antibakteri

NA (*Nutrient Agar*) ditimbang 23 g/L dimasukkan ke dalam labu bulat kemudian ditambahkan aquadest hingga volume 1 liter, kemudian dipanaskan di atas *hot plate* selama $\pm 15 - 20$ menit hingga mendidih dan terbentuk campuran yang homogen, kemudian disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C . Media ini selanjutnya digunakan sebagai media uji antibakteri terhadap bakteri patogen.

d. Pembuatan Media Uji Antijamur

Media yang digunakan untuk uji antijamur terhadap khamir patogen *Candida albicans* adalah media PGA (*Polypeptone Glucose Agar*). Polipepton ditimbang 2 g/L, glukosa 5 g/L dan agar 19 g/L dimasukkan ke dalam labu bulat kemudian ditambahkan aquadest hingga volume 1 liter kemudian dipanaskan di atas *hot plate* selama $\pm 15 - 20$ menit hingga mendidih dan terbentuk campuran yang homogen, kemudian disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C . Media yang digunakan untuk uji antijamur terhadap jamur patogen *Aspergillus niger* adalah media PDA.

e. Uji Aktivitas Antimikroba dengan Metode Cakram

Suspensi bakteri 10^6 dan suspensi kapang 10^5 dipipet 1 ml dimasukkan secara aseptis ke dalam cawan petri steril kemudian ditambahkan media agar yang telah dibuat untuk masing-masing mikroba uji sejumlah ± 10 ml. Suspensi kuman yang telah diberi agar dalam cawan petri

digoyangkan perlahan (10 kali ke kanan dan 10 kali ke kiri) untuk memperoleh suspensi kuman yang tersebar merata pada media agar.

Uji antibakteri dilakukan dengan cara ekstrak larutan uji 1 mg/ml dan 2 mg/ml dipipet 20 μ l dijerap secara aseptis pada cakram dengan diameter 6 mm hingga diperoleh zat aktif pada cakram sejumlah 20 μ g. Cakram dibiarkan kering, kemudian diletakkan secara aseptis pada permukaan media yang telah berisi bakteri uji. Media diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 – 24 jam. Isolat yang memiliki aktivitas antibakteri akan menunjukkan zona hambat bening pada sekeliling cakram. Zona hambat diukur dengan menggunakan jangka sorong (30, 31).

Larutan amoksisilin 2 mg/ml dalam metanol digunakan sebagai standar antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhosa*, dan *Bacillus subtilis* yang diperlakukan sama dengan ekstrak uji. Sedangkan untuk *Pseudomonas aeruginosa* digunakan standar cakram Gentamisin 10 μ g/cakram yang ada di pasaran.

Uji antijamur dilakukan dengan cara ekstrak larutan uji dengan konsentrasi 5 mg/ml dipipet 20 μ l dijerap secara aseptis pada cakram sehingga diperoleh jumlah zat pada cakram 100 μ g/cakram. Cakram dibiarkan kering pada sebuah cawan petri kosong yang steril kemudian diletakkan secara aseptis pada permukaan media yang telah berisi kapang uji. Media diinkubasi pada suhu 28 °C selama 3 – 5 hari. Isolat yang memiliki aktivitas antijamur akan menunjukkan zona hambat bening pada sekeliling

cakram. Zona hambat diukur dengan menggunakan jangka sorong. Larutan itrakonazol 5 mg/ml dalam metanol digunakan sebagai standar antijamur dan diberi perlakuan sama dengan ekstrak larutan uji.

10. Uji Aktivitas Antioksidan

a. Uji Pendahuluan

Larutan uji dengan konsentrasi 2 mg/ml ditotolkan di atas lempeng KLT sejumlah 10 μ l secara perlahan dan dibiarkan kering di udara. Kemudian disemprot dengan larutan DPPH 0,2% dalam metanol, diamkan selama 30 menit. Adanya senyawa antioksidan akan tampak bercak berwarna kuning dengan latar belakang ungu (32, 33).

b Uji Peredaman Radikal DPPH secara Spektrofotometri

Ekstrak yang mempunyai aktivitas antioksidan dilanjutkan dengan pengujian aktivitas antioksidan menggunakan radikal bebas DPPH. Larutan uji dibuat dalam berbagai konsentrasi (25, 50, 75 dan 100 ppm) dengan DPPH dan pengenceran menggunakan metanol *p.a.* dalam tabung reaksi. Larutan uji 1 mg/ml dipipet masing-masing 50 μ l, 100 μ l, 150 μ l dan 200 μ l ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 400 μ l DPPH 0,4 mM dalam metanol yang selalu dibuat baru dan cukupkan volume tabung reaksi dengan metanol *p.a* hingga 2 ml (34). Larutan dalam tabung reaksi kemudian dihomogenkan dengan vorteks dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30

menit. Serapan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 516,5 nm. Untuk mengetahui persentase peredaman radikal bebas (Lampiran 4) perlu dilakukan pengukuran terhadap serapan blanko DPPH dengan cara 400 μ l DPPH 0,4 mM dipipet ke dalam tabung reaksi kemudian dicukupkan volumenya hingga 2 ml dengan metanol *p.a.* Sebagai kontrol positif dan pembanding digunakan vitamin C yang diperlakukan sama dengan larutan uji. Vitamin C dibuat konsentrasi 2, 4, 6, dan 8 ppm.

Ekstrak dinyatakan aktif sebagai antioksidan apabila nilai IC_{50} kurang dari 200 μ g/ml. Nilai IC_{50} adalah konsentrasi efektif antioksidan yang mampu menghambat 50% radikal bebas yang dapat dihitung dengan persamaan regresi linear (35).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Isolasi Kapang Endofit

Isolasi kapang endofit dari ranting dan daun tanaman *Garcinia mangostana* yang dilakukan, diperoleh hasil isolasi sejumlah 24 isolat yaitu 19 isolat berasal dari ranting dan 5 isolat berasal dari daun. Kapang endofit tumbuh setelah 14 – 30 hari. Kontrol sterilisasi menunjukkan bahwa sterilisasi permukaan yang dilakukan mampu menghambat pertumbuhan mikroba pada permukaan tanaman sehingga isolat yang diperoleh diyakini adalah kapang endofit. Kontrol sterilisasi dan kapang yang mulai tumbuh dapat dilihat pada Gambar-2 dan Tabel 1.

2. Fermentasi dan Ekstraksi Metabolit Sekunder

Fermentasi dilakukan menggunakan medium PDY terhadap 20 isolat kapang endofit yang berbeda secara morfologi dan dilakukan secara bertahap berdasarkan kecepatan pertumbuhan isolat setelah dimurnikan pada medium PDA.

Hasil ekstraksi metabolit sekunder diperoleh 60 ekstrak yaitu 20 ekstrak etil asetat (disingkat dengan EA), 20 ekstrak *n*-butanol (disingkat dengan B) dan 20 ekstrak metanol (disingkat dengan M). Morfologi kapang yang difermentasi secara makroskopis dan mikroskopis dapat dilihat pada Gambar

4 – 43 dibandingkan dengan pengamatan mikroskopis kapang dari literatur, sedangkan hasil fermentasi dan hasil ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 2.

3. Identifikasi Mikroba Uji

a. Identifikasi Bakteri Uji

Identifikasi terhadap bakteri uji yang dilakukan secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram memberikan hasil sebagai berikut:

1. *Staphylococcus aureus*

Pada medium agar, morfologi bakteri terlihat sebagai koloni berwarna kuning mengkilat, berbentuk bulat tidak merata. Setelah dilakukan pewarnaan Gram, pengamatan di bawah mikroskop menunjukkan bakteri berbentuk bulat, berkoloni seperti anggur, dan berwarna ungu. Ini menunjukkan bahwa bakteri adalah Gram positif (Gambar 3.a).

2. *Bacillus subtilis*

Pada medium agar, koloni terlihat berbentuk bulat dan kasar. Permukaan agar jelas tertutup oleh koloni sehingga terlihat permukaan agar berwarna putih seperti susu. Pengamatan di bawah mikroskop setelah dilakukan pewarnaan Gram menunjukkan bakteri berbentuk batang, berwarna ungu dan merupakan bakteri Gram positif (Gambar 3.b).

3. *Escherichia coli*

Pada medium agar, koloni terlihat berbentuk bulat kecil (halus) berwarna putih. Pengamatan di bawah mikroskop setelah dilakukan

pewarnaan Gram menunjukkan bakteri merupakan Gram negatif dengan ciri mikroskopik berbentuk batang dan berwarna merah (Gambar 3.c).

4. *Salmonella typhosa*

Pada medium agar, koloni terlihat berbentuk bulat, berwarna putih. Pengamatan di bawah mikroskop setelah dilakukan pewarnaan Gram menunjukkan bakteri berbentuk batang dan berwarna merah (Gambar 3.d).

5. *Pseudomonas aeruginosa*

Pada medium agar, terlihat medium menjadi berwarna hijau setelah ditanam selama 18 – 24 jam yang disebabkan oleh adanya pigmen piosoanin yang dihasilkan oleh bakteri ini dan berdifusi pada medium agar. Pengamatan di bawah mikroskop setelah dilakukan pewarnaan Gram menunjukkan bakteri berbentuk batang dan berwarna merah yang menunjukkan bahwa bakteri merupakan Gram negatif (Gambar 3.e).

b. Identifikasi Jamur Uji

1. *Candida albicans*

Pada medium agar, koloni terlihat seperti lendir tebal berwarna putih sampai kekuningan, dan berbau seperti ragi. Secara mikroskopis terlihat koloni membentuk serangkaian blastospora berbentuk bulat telur sepanjang hifa (Gambar 3.f).

2. *Aspergillus niger*

Kapang yang ditanam pada medium agar tumbuh membentuk koloni kapang yang berwarna hitam setelah tumbuhnya konidia. Secara mikroskopik

terlihat hifa yang tidak bersekat, transparan dan tidak bercabang. Ujungnya berbentuk bulat dengan konidia yang mengitarinya Gambar 3.g).

4. Uji Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba dengan metode cakram memberikan hasil yang dapat memenuhi kriteria penerimaan adanya diameter zona hambat terhadap mikroba uji. Beberapa ekstrak menunjukkan zona hambat yang dapat diterima dengan interpretasi menengah (intermediate) menurut standard ampisilin terhadap enterococcus *Staphylococcus* (19), yaitu ekstrak R2.M dengan konsentrasi 20 $\mu\text{g}/\text{cakram}$ dengan diameter zona hambat sebesar 12,85 mm terhadap bakteri uji *Bacillus subtilis*, ekstrak R2.M dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g}/\text{cakram}$ dengan diameter sebesar 14,65 mm terhadap bakteri uji *Bacillus subtilis* dan 12,55 mm terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* (Gambar 44 – 45). Sedangkan ekstrak R2.M dengan konsentrasi 20 $\mu\text{g}/\text{cakram}$ memberikan hasil pengukuran zona hambat dengan interpretasi resisten yaitu 11,90 mm terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus*.

Sebagian besar ekstrak dapat memberikan zona hambat terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi rendah 20 $\mu\text{g}/\text{cakram}$ namun tidak memberikan zona hambat pada bakteri Gram negatif. Pada peningkatan konsentrasi ekstrak yang dijerap pada cakram menjadi 40 $\mu\text{g}/\text{cakram}$ memberikan hasil adanya diameter zona hambat terhadap bakteri uji pada beberapa ekstrak yang sebelumnya tidak memiliki

zona hambat pada konsentrasi 20 µg/cakram. Hasil pengukuran diameter zona hambat terhadap bakteri uji dapat dilihat pada Tabel 3 dan 4.

Uji aktivitas antimikroba yang dilakukan terhadap kapang uji memberikan hasil bahwa sebagian besar ekstrak yang diuji dengan konsentrasi 100 µg/cakram memberikan zona hambat terhadap khamir *Candida albicans* terutama ekstrak etil asetat. Zona hambat terbesar terhadap *Candida albicans* diperlihatkan oleh ekstrak R3.B, R13b.B, dan R21.B yaitu sebesar 10,00 mm (Gambar 47). Untuk kapang uji *Aspergillus niger*, adanya zona hambat diperlihatkan oleh ekstrak R10.M, R19.EA, R21.EA dan R21.B. Zona hambat terbesar adalah ekstrak R21.B (Gambar 48). Hasil pengukuran diameter zona hambat terhadap kapang uji dapat dilihat pada Tabel 5.

4. Uji Aktivitas Antioksidan

Uji pendahuluan aktivitas antioksidan dengan penotolan pada lempeng KLT yang disemprot dengan larutan DPPH 0,2 % dalam metanol diperoleh 7 ekstrak yang menunjukkan aktivitas antioksidan yaitu ekstrak R2.M, R3.M, R7.EA, R9.EA, R3.B, R18.B dan R19.B. Hasil uji pendahuluan antioksidan dapat dilihat pada Gambar 3 dan Tabel 4.

Uji aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH secara spektrofometri diperoleh hasil 4 ekstrak memiliki nilai IC_{50} kurang dari 200 µg/ml yaitu ekstrak R18.B dengan nilai IC_{50} sebesar 107,71 µg/ml, ekstrak R3.B sebesar

131,80 $\mu\text{g/ml}$, ekstrak R3.M 170,97 $\mu\text{g/ml}$, dan ekstrak R19.B sebesar 189,73 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan tiga ekstrak lainnya memiliki nilai IC_{50} lebih dari 200 $\mu\text{g/ml}$ yaitu ekstrak R2.M sebesar 200,65 $\mu\text{g/ml}$, ekstrak R9.EA sebesar 206,97 $\mu\text{g/ml}$, dan ekstrak R7.EA sebesar 455,30 $\mu\text{g/ml}$. Vitamin C yang digunakan sebagai pembanding dan kontrol positif memiliki nilai IC_{50} sebesar 3,11 $\mu\text{g/ml}$. Hasil uji aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH secara spektrofotometri dapat dilihat pada Tabel 5.

B. PEMBAHASAN

Manggis (*Garcinia mangostana*) sebagai tanaman khas daerah tropis khususnya wilayah Asia telah banyak diteliti dan telah dipercaya mampu menghasilkan senyawa-senyawa yang sangat bermanfaat bagi manusia. Salah satu khasiatnya yang terkenal adalah sebagai antioksidan dan antimikroba. Oleh sebab itu, penelitian mengenai tanaman ini terus dikembangkan. Pada bidang mikrobiologi, penelitian mengenai manggis dilakukan dengan mengisolasi kapang endofit dari tanaman ini.

Isolasi kapang endofit dari tanaman ini dilakukan dengan menggunakan standar teknik isolasi yang telah sering digunakan. Isolasi kapang endofit dari suatu simplisia diawali dengan proses sterilisasi permukaan. Tujuan dilakukannya sterilisasi permukaan adalah untuk menghambat pertumbuhan mikroba pada permukaan simplisia. Beberapa metode yang dilakukan untuk sterilisasi permukaan mampu menghambat

pertumbuhan mikroba pada permukaan simplisia. Alkohol 70% digunakan sebagai bahan untuk sterilisasi permukaan karena alkohol 70% telah direkomendasikan sebagai konsentrasi optimum untuk desinfektan yang berfungsi sebagai bakterisid dan fungisid. Sterilisasi permukaan juga dilakukan menggunakan alkohol 95% sebab pada dasarnya alkohol dengan berbagai konsentrasi antara 60% dan 95% dapat membunuh mikroba dengan cepat (36). NaOCl 5,25% juga digunakan sebagai bahan untuk sterilisasi permukaan sebab NaOCl terbukti mampu mematikan spora yang berdinding tebal (37). Konsentrasi kecil NaOCl sudah cukup untuk mengurangi sporulasi mikroba secara bermakna. Matinya mikroba ini disebabkan oleh kemampuan senyawa ini merusak DNA mikroba (38).

Isolasi kapang endofit dari simplisia ranting dan daun dilakukan pada medium CMM sebab medium ini terdiri dari karbohidrat yang diserap cenderung lebih lambat oleh kapang sehingga medium ini baik bagi pertumbuhan kapang. Medium ini juga memberikan keseimbangan antara pertumbuhan miselium dengan sporulasi (39). Penambahan antibiotik kloramfenikol bertujuan untuk menekan pertumbuhan mikroba yang tidak diinginkan (8). Oleh sebab itu, kapang yang diisolasi diyakini adalah endofit.

Kapang endofit yang diisolasi tumbuh setelah 14 – 30 hari. Hal ini disebabkan oleh kapang endofit yang bersifat lambat tumbuh (*Slow grower*). Kapang yang berhasil diisolasi lebih banyak berasal dari ranting dibandingkan daun. Faktor keberhasilan untuk dapat mengisolasi endofit tergantung dari

densitas (kerapatan), lokasi hifa pada jaringan tanaman dan spesies fungi yang terdapat pada jaringan tanaman (40).

Kapang endofit yang telah tumbuh dimurnikan ke dalam medium PDA untuk memperoleh endofit yang benar-benar murni. Medium PDA mengandung karbohidrat yang lebih mudah dicerna oleh kapang dibandingkan CMM sehingga pertumbuhan endofit pada media ini umumnya lebih cepat (39).

Kapang endofit yang telah murni kemudian diamati secara mikroskopis untuk menentukan jenis kapang endofit yang diperoleh. Hasil pengamatan secara mikroskopis yang dilakukan belum dapat mengidentifikasi secara jelas jenis kapang yang diperoleh sebab hasil yang diperoleh kurang spesifik secara mikroskopis. Beberapa isolat menunjukkan ciri mikroskopis yang hampir sama. Spesifikasi ciri mikroskopis isolat yang diperoleh ditunjukkan oleh bentuk hifa dan konidia yang khas seperti kapang *Aspergillus* (Gambar 5). Namun, beberapa ciri mikroskopis konidia terlihat hampir sama atau bahkan tidak ditemukan konidia yang khas pada pengamatan mikroskopis. Hal ini mungkin disebabkan oleh kenyataan bahwa sebagian besar kapang endofit ternyata tidak memproduksi konidia atau spora (16). Oleh sebab itu, perlu dilakukan identifikasi secara molekular untuk mengetahui jenis kapang endofit yang telah berhasil diisolasi (16, 41, 42).

Fermentasi dilakukan untuk memperoleh senyawa metabolit yang dihasilkan oleh kapang endofit. Medium PDY dipilih sebagai medium fermentasi sebab PDY mengandung nitrogen sebanyak 10,6% dari yeast

extract dan 1% dari PDB sehingga total nitrogen yang terkandung dalam medium ini merupakan total nitrogen yang berasal dari *yeast extract* dan PDB. Nitrogen sebagai salah satu makronutrien yang penting bagi pertumbuhan mikroorganisme, metabolismenya oleh mikroorganisme mempunyai hubungan dengan kecepatan produksi antimikroba (43).

Hasil fermentasi yang diperoleh diekstraksi dengan menggunakan pelarut organik. Pelarut organik dipilih berdasarkan perbedaan polaritas untuk dapat mengekstraksi senyawa metabolit yang dihasilkan dari proses fermentasi. Pelarut organik yang dipilih adalah etil asetat, *n* – butanol, dan metanol (13, 14, 31). Ekstraksi dilakukan secara bertingkat mulai dari pelarut yang paling nonpolar dari pelarut terpilih yaitu etil asetat, *n* – butanol dan terakhir dengan metanol. Cara ini dilakukan sebagai tahap awal untuk memisahkan golongan utama senyawa yang dihasilkan pada proses fermentasi untuk mempermudah menelaah profil fitokimia dari senyawa tersebut (44).

Ekstrak yang diperoleh diuji aktivitasnya sebagai antimikroba dan antioksidan. Uji aktivitas antimikroba diawali dengan melakukan identifikasi mikroba uji yang digunakan untuk meyakinkan bahwa mikroba uji yang digunakan adalah mikroba patogen seperti yang dimaksud pada tujuan penelitian. Konsentrasi ekstrak pada cakram disesuaikan dengan konsentrasi standard antimikroba cakram yang ada di pasaran (45).

Standar yang digunakan sebagai antibakteri disesuaikan dengan antibakteri standar yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi UI.

Standar antibakteri yang digunakan untuk *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhosa*, dan *Bacillus subtilis* adalah amoksisilin sebab berdasarkan percobaan bakteri-bakteri tersebut mampu menunjukkan sensitifitas terhadap amoksisilin sedangkan *Pseudomonas aeruginosa* tidak menunjukkan sensitifitas terhadap amoksisilin sehingga standar yang digunakan adalah gentamisin. Standar yang digunakan sebagai antijamur adalah itrakonazol yang diperoleh dari kapsul itrakonazol yang beredar di pasaran sebagai pengganti nistatin yang biasanya digunakan sebagai standar uji antijamur. Hal ini disebabkan oleh kesulitan memperoleh nistatin yang seharusnya digunakan sebagai standar antijamur.

Zona hambat yang dibentuk oleh ekstrak uji terhadap mikroba uji bervariasi. Dengan peningkatan konsentrasi terjadi perubahan diameter zona hambat. Pada uji antibakteri sebagian besar ekstrak tidak menunjukkan zona hambat pada konsentrasi 20 µg/cakram, namun zona hambat dapat terukur pada konsentrasi 40 µg/cakram. Ini menunjukkan bahwa konsentrasi tinggi dari ekstrak mampu menghambat pertumbuhan mikroba. Beberapa ekstrak dengan konsentrasi 20 µg/cakram dan 40 µg/cakram tidak menunjukkan aktivitas antibakteri yang ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona hambat di sekitar cakram. Masih terlalu dini untuk menyimpulkan bahwa ekstrak tersebut tidak mempunyai aktivitas antibakteri karena ekstrak yang diuji bukan zat murni. Ada kemungkinan ekstrak menunjukkan aktivitas antibakteri pada konsentrasi yang lebih tinggi lagi atau bila dilakukan ekstraksi secara

sinambung dan zat murni dapat diisolasi (15). Pada uji antijamur, digunakan konsentrasi yang lebih tinggi sebab pada umumnya antijamur dapat memberikan efek pada konsentrasi yang lebih tinggi (46).

Uji pendahuluan aktivitas antioksidan dilakukan untuk mengetahui ekstrak mana yang mempunyai aktivitas antioksidan. Uji ini dilakukan dengan penotolan pada lempeng KLT karena dengan metode ini pada konsentrasi kecil dapat mengidentifikasi adanya senyawa antioksidan setelah disemprot dengan larutan DPPH 0,2% sehingga dapat memperkecil jumlah ekstrak uji dan larutan DPPH yang digunakan.

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH. Metode ini lebih mudah dilakukan, cepat, dan dapat digunakan pada semua jenis senyawa antioksidan (47). Prinsip uji aktivitas antioksidan menggunakan metode ini adalah mengukur besarnya serapan pemucatan warna larutan DPPH secara spektrofotometri. Pemucatan warna DPPH terjadi karena kelebihan elektron pada DPPH menjadi berpasangan dengan hidrogen dari antioksidan sehingga DPPH membentuk DPPH tereduksi (DPPH-H) (23,47) .

Secara umum, ekstrak yang positif sebagai antioksidan diyakini memang memiliki aktivitas antioksidan. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan bila nilai IC_{50} kurang dari 200 $\mu\text{g/ml}$. Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan 3 ekstrak memiliki nilai IC_{50} lebih dari 200 $\mu\text{g/ml}$. Akan tetapi, nilai IC_{50} yang lebih besar dari 200 $\mu\text{g/ml}$ tidak menutup kemungkinan juga potensial memiliki aktivitas antioksidan

sebab nilai IC_{50} yang lebih besar dari 200 $\mu\text{g/ml}$ tersebut merupakan nilai IC_{50} dari ekstrak kasar bukan hasil isolasi senyawa murni fitokimia (48, 49). Oleh sebab itu, perlu dilakukan metode pemisahan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik adalah ekstrak *n*-butanol R18B dengan nilai IC_{50} 107,71 $\mu\text{g/ml}$.

Ekstrak yang diuji sebagai antioksidan merupakan ekstrak dari pelarut organik dengan polaritas yang bervariasi. Ada kemungkinan uji aktivitas antioksidan yang dilakukan terhadap supernatan hasil fermentasi kapang endofit dapat memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik sebab senyawa kimia yang dihasilkan selama fermentasi mungkin diekskresikan keluar sel kapang dan merupakan senyawa yang dapat larut pada media air. Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan supernatan ini tidak dapat dilakukan sebab menemukan kesulitan alat untuk melakukan liofilisasi supernatan.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Sebanyak 24 isolat kapang endofit telah berhasil diisolasi dari tanaman *Garcinia mangostana* yaitu 19 isolat berasal dari ranting dan 5 isolat berasal dari daun.
2. Ekstrak pelarut organik senyawa metabolit hasil fermentasi isolat kapang endofit dari ranting dan daun tanaman *Garcinia mangostana* memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri uji *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhosa* dan *Staphylococcus aureus* dan terhadap kapang uji *Candida albicans* dan *Aspergillus niger*.
3. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa kapang endofit yang diisolasi dari tanaman *Garcinia mangostana* memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} dari ekstrak *n*-butanol sebesar 107,71 $\mu\text{g/ml}$.

B. SARAN

Mengingat penelitian yang dilakukan masih belum sempurna, maka disarankan:

1. Melakukan pemisahan senyawa-senyawa pada ekstrak yang diuji sehingga dapat diketahui kemurnian dari ekstrak yang telah diuji aktivitasnya.
2. Melakukan identifikasi secara molekular untuk mengetahui jenis kapang endofit yang telah berhasil diisolasi sehingga dapat dibudidayakan dan diteliti lebih lanjut.
3. Melakukan uji aktivitas antimikroba terhadap mikroba patogen lain sehingga dapat lebih diketahui kemampuan aktivitas antimikroba yang dimilikinya.
4. Melakukan percobaan uji aktivitas antioksidan dengan metode lain sehingga dapat lebih diyakini kekuatan antioksidan dari senyawa yang terkandung di dalamnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Strobel, G.A. 2002. Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit Rev Biotechnol.* **22**(4): 315-33.
2. Prasetyo, A. Atmokusumo, I. 2006. Mikroba endofit: sumber molekul acuan baru yang berpotensi. *Bio Trends* **1**(2): 13-15.
3. Schulz, B., Boyle, C & Draeger S. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* **106**: 996-1004.
4. Strobel, G., Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**(4): 491-502.
5. Ersam, T. 2006. Kimiawi tumbuhan Cluciaceae Indonesia perkembangan kimia organik bahan alam dari masa ke masa. *Seminar Nasional VIII Institut Teknologi Sepuluh November, Surabaya.*: 1-17
6. C. Anthony. 2002. A review of mangosteen (*Garcinia mangostana*) Linn. [http://www.dweckdata.com/published_papers/Garcinia mangostana.pdf](http://www.dweckdata.com/published_papers/Garcinia_mangostana.pdf). 10 Februari 2008, pukul 08.37 WIB
7. Owen, N.L., Hundley, N. 2004. Endophytes – the chemical synthesizers inside plants. *Science Progress* **87** (2): 79 – 99.
8. <http://classes.plantpath.wsu.edu/plp521/wors%20documents/endos.doc>. 10 Februari 2008, pukul 10.05 WIB.

9. Wahyudi, P. 1997. Mikroba Endofitik Penghasil Materi yang bermanfaat. *Sub Direktorat Bioteknologi Direktorat Pengkajian Ilmu Kehidupan Deputi Bidang Pengkajian Ilmu Dasar dan Ilmu Terapan BPP Teknologi: 2 – 3.*
10. Prihatman, K. 2000. Manggis (*Garcinia mangostana*). *Tentang budidaya pertanian*. Kantor Deputi Menegristek Bidang Pendayagunaan dan Pemasyarakatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi, Jakarta: 1 – 25.
11. Nilar, Harison, L.J. 2002. Xanthone from heartwood of *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* **60**: 546 – 548.
12. Mahabusarakam, W., Wiryachitra, P. 1987. Chemical constituents of *Garcinia mangostana*. *Journal of Natural Product* **5**(3): 474 – 478.
13. Jung, H., Su, B., Keller, W.J., Mehta, R.G., & Kinghorn, D. 2006. Antioksidan xanton from the perikarp of *Garcinia mangostana* (mangosteen). *Journal of Agricultural and food Chemistry* **54**: 2077 – 2082.
14. Suksamrarn, S., Suwannapoch, & Phakhodee, W. 2003. Antimicrobial activity of prenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia mangostana*. *Chemical Pharmacy Bulletin* **51**(7): 857 – 859.
15. T. Marisi, R., Soetarno, S. & S. Yulinah, E. 1998. Telaah kandungan kimia dan antimikroba kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L., Guttiferae). Sekolah Farmasi ITB. <http://bahan-bahan.alam.fa.itb.ic.id>. 4 Februari 2008, pukul 11.30 WIB

16. Pongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V. & Sakayaroj, J. 2006. Antimicrobial activity in culture of endofitic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **48**(3): 367 – 372.
17. Ganiswarna, S.G, dkk. 1995. *Farmakologi dan terapi*. Edisi 4. Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 571 – 583.
18. Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. 2003. *Biology of microorganisms*. Tenth Edition. Prentice Hall, USA: 707-726, 815 – 818, appendix 2 A-5 – A-13.
19. Acar, J.F. 1980. The disc susceptibility test. Dalam: Victor, L. *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams and Wilkins, New York: 24 – 51.
20. Slater, T.F. 1984. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochemical Journal*. **222**: 1-15.
21. Ames, B.N., Shigenaga, M.K. & Hagen, T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 7915-7952.
22. Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. **181**: 1199-1200.
23. Molyneux, P. 2004. The used of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl. *Songklanakarin Journal of Science Technology*. **26** (2): 211 – 219.

24. Anonim. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Departemen Kesehatan RI, Jakarta: 1061, 1065 – 1066.
25. Harmita (ed). 2006. *Analisis kuantitatif bahan baku dan sediaan farmasi* edisi Pertama. Departemen Farmasi FMIPA UI. Depok: 134 – 143.
26. Boyd, R.F. & M. D. Joseph. 1980. *Medical microbiology*. First Edition. Little Brown Company, USA: 257 – 258.
27. Jawetz, Melanick, & Adelberg's. 2002. *Medical microbiology*. International Edition. Twenty Second Edition. Mc. Graw Hill: 180, 197 – 198, 217 – 219, 229 – 230.
28. Wiriandini, R. 2007. Skrining kapang endofit penghasil antimikroba dari ranting tanaman *Garcinia latissima* Miq. terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhosa*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, dan *Aspergillus niger*. Skripsi Sarjana Ekstensi Farmasi FMIPA UI, Depok: 21 – 25.
29. Li Hiyang, Qing Chen, Zhan Yanli & Zhao Zhiwei. 2005. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medical plants. *World journal of microbiology* 21: 1515 – 1519.
30. Radji, M. 2006. *Penuntun praktikum mikrobiologi farmasi*. Edisi kedua. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok: 24 – 25.
31. Handayani. 2007. Skrining kapang endofit penghasil antimikroba dari ranting tanaman *Garcinia Tetrandra* Pierre. terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhosa*, *Bacillus subtilis*,

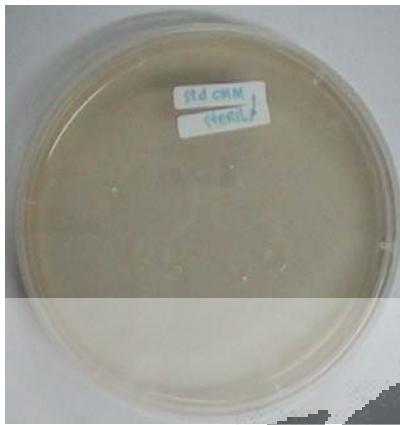
- Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, dan *Aspergillus niger*. Skripsi Sarjana Ekstensi Farmasi FMIPA UI, Depok: 27 – 29, 46 – 46.
32. Ersam, T & Sukamat. 2006. Dua senyawa xanton dari kayu batang mundu *Garcinia dulcis* (Roxb.) Kurz. sebagai antioksidan. *Seminar Nasional Kimia VIII*, Surabaya: 1 – 5.
33. Feriani, Y. 2005. Skrining aktivitas antioksidan beberapa cendawan suku Coriolaceae. Skripsi Sarjana Farmasi FMIPA UI, Depok: 19 – 29.
34. Lacikova, L., Muselik, J., Masterova, I & Grancai D. 2007. Antioxidant activity and total phenols in different extract of four *Staphylea* L. species. *Molecules* **12**: 98 – 102.
35. Rohman, A & Riyanto, S. 2005. Daya antioksidan ekstrak etanol daun kemuning (*Muraya paniculata* (L) Jack) secara invitro. *Majalah Farmasi Indonesia*. **16**(3): 136 – 140.
36. Boyd, R.F & Marr Joseph. 1980. *Medical microbiology*. First Edition. Little Brown and Company, USA: 158.
37. Indriyanto, G., Noor Erma Sugijanto & Noor Cholis Zaini. 2004. Isolasi dan determinasi berbagai jamur endofit dari tanaman *Aglaia elliptica*, *Aglaia eusideroxylon*, *Aglaia odorata* dan *Aglaia odoratissima*. *Jurnal Penelitian Medika Eksakta* **5**(2): 131-146.
38. Miche, L., & Jaques, B. 2001. Effect of rice seed surface sterilisation with hypochlorite on inokulation *Burkholderia Vietnamiensis*. *Applied and Environmental* **67**(7): 3046 – 3052.

39. Yulia, P.R. 2005. Isolasi dan seleksi kapang endofit penghasil antimikroba pada beberapa tanaman obat tradisional Indonesia. Skripsi Sarjana Ekstensi FMIPA UI, Depok: 55 – 56.
40. Bacon, C.W. 1990. Isolation, culture, and maintenance of endophytic fungi of grasses. Dalam: Labeda, D. P & M. C. Shearer. *Isolation of biotechnological organisms from nature*. Mc. Graw Hill, New York: 259 – 281.
41. Lin Xiang & Lu Chunhua. 2007. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1037 – 1040.
42. Shipunov, A., Rhagavendra, A.K. & Newcobe, G. 2006. Endophytic Fungi in The Invasive Spotted Knapweed. <http://uidaho.edu/~Shipunov>. 10 Mei 2008, pukul 20.04 WIB
43. Nugroho, N.B., Djaman, N & Fitria, H. 2002. Pengaruh tepung kedele dan jenis pepton terhadap aktivitas antijamur cendawan endofitik. *Jurnal Biosains dan Bioteknologi Indonesia*. November: 40 – 43.
44. Harborne, J.B. 1996. *Metode fitokimia*. Terj. Dari *Phytochemical methods*, oleh Padmawinata, K & Soediro, I. Penerbit ITB, Bandung: 1 - 46.
45. A. Robbert & B. S. Rippere. 1980. Preparation and control of antibiotics susceptibility disc and other devices containing antibiotics. Dalam: Victor, L. *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams & Wilkins, New York: 549 – 571.

46. Kobayashi, H., Namikoshi, M., Yashimoto, T. & Yokochi, T. 1996. A screening method for antimutagenic and antifungal substances using conidia of *Pyricularia oryzae*, modification and application to tropical Marine fungi. *The Journal of Antibiotics* **49**(9): 873 – 879.
47. Prakash, A., Rigelhof, F. & Miller, E. Antioxidant activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*. <http://www.medallionlabs.com>. 4 Mei 2008, pukul: 20.05 WIB.
48. Amrum, M & Umayah, E. 2007. Uji aktivitas antioksidan ekstrak Air dan ekstrak metanol dari beberapa varian buah kenit (*Chrysophyllum cainito* L.) dari Daerah Jember. *Berk. Panel Hayati* **13**: 45 – 50.
49. Guan Tan Tze, Whiteman M. Antioxidant Activities of Some Tropical Fruits. http://staff.science.nus.edu.sg/~schiloo/srp2002/sci_papper/Biochem/Tan%20Tze%20Guan1.pdf. 4 Mei 2008, pukul 19.23 WIB
50. <http://www.doctorfungus.com/imageban/index.enlarge.pl> 14 Mei 2008, pukul 10.30 WIB



Gambar 1. Tanaman *Garcinia mangostana* L yang digunakan dalam seleksi kapang endofit sebagai penghasil antimikroba dan antioksidan



a. Kontrol sterilisasi

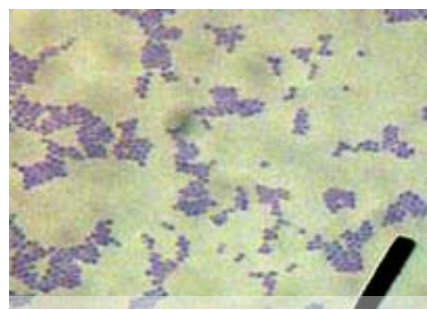


b. Penanaman sampel pada medium CMM

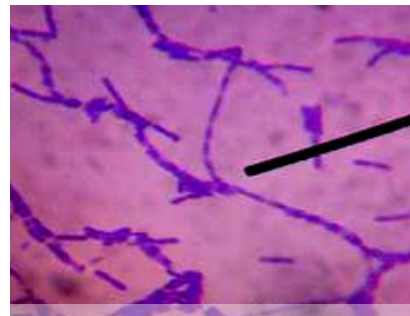


c. Kapang yang mulai tumbuh pada sampel

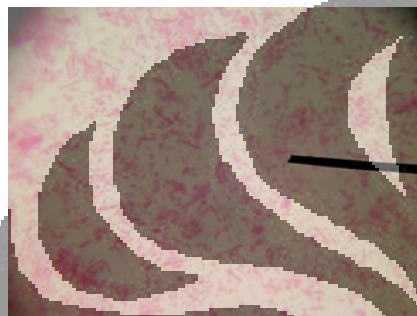
Gambar 2. Isolasi Kapang Endofit



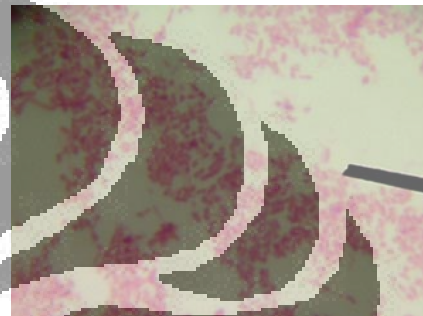
a. *Staphylococcus aureus*



b. *Bacillus subtilis*



c. *Escherichia coli*



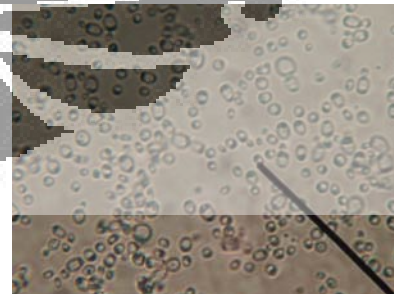
d. *Salmonella typhosa*



e. *Pseudomonas aeruginosa*

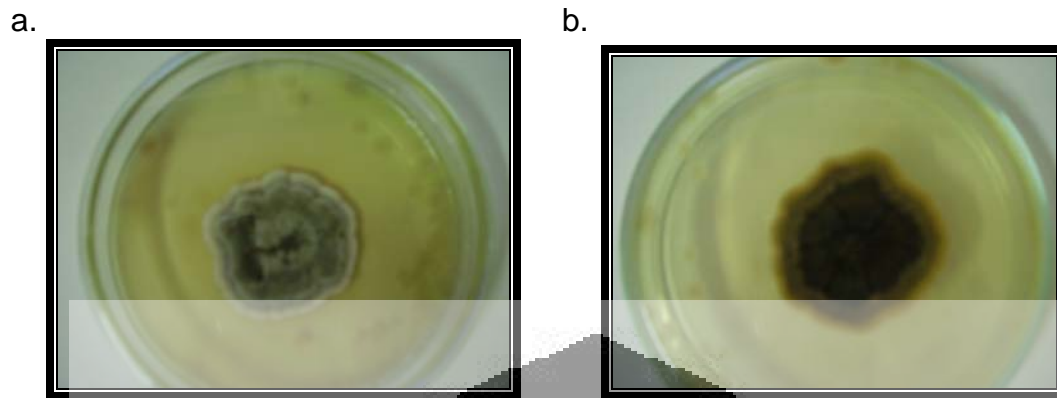


f. *Aspergillus niger*

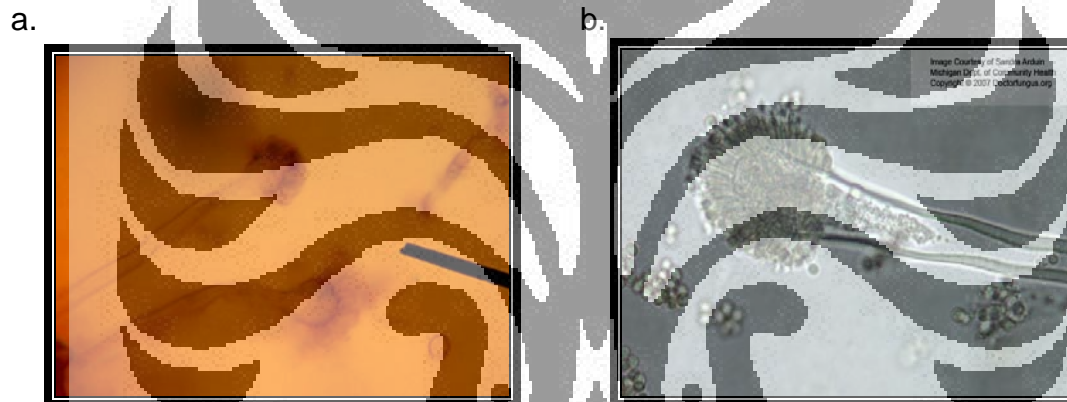


g. *Candida albicans*

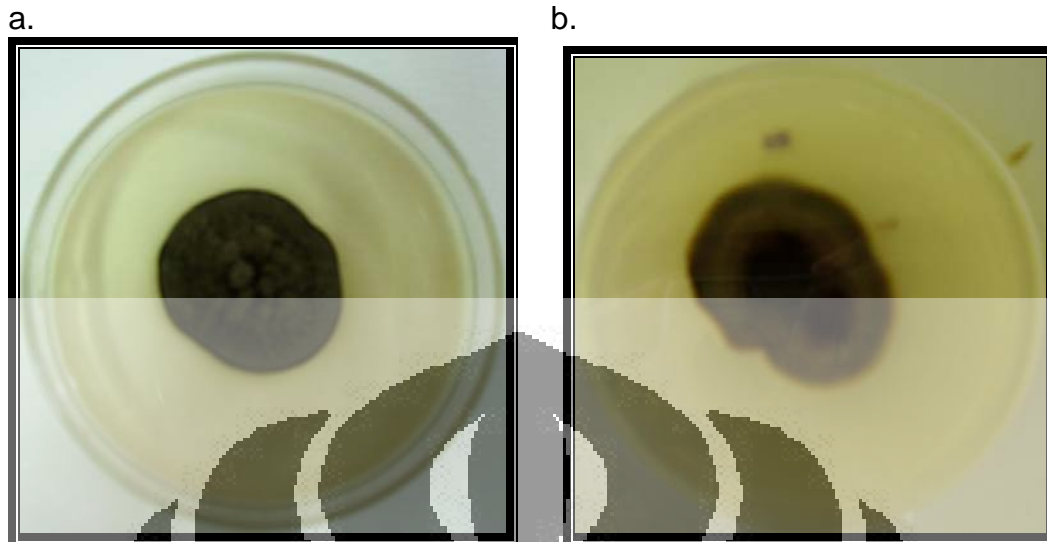
Gambar 3. Identifikasi mikroba uji dengan pewarnaan Gram secara mikroskopik (perbesaran 400 kali)



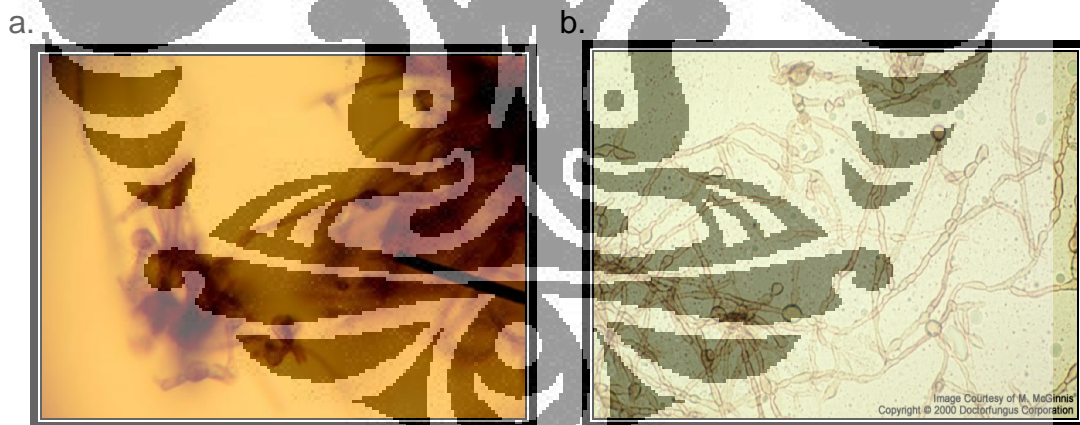
Gambar 4. Hasil pengamatan secara makroskopis kapang endofit R1 yang diisolasi dari ranting tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang)



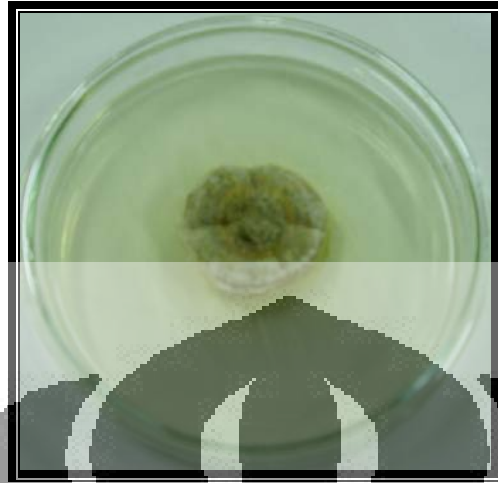
Gambar 5. Hasil pengamatan secara mikroskopik kapang endofit R1 perbesaran 400 kali (a. isolat kapang endofit R1, dibandingkan dengan b. kapang dari genus *Aspergillus* (50))



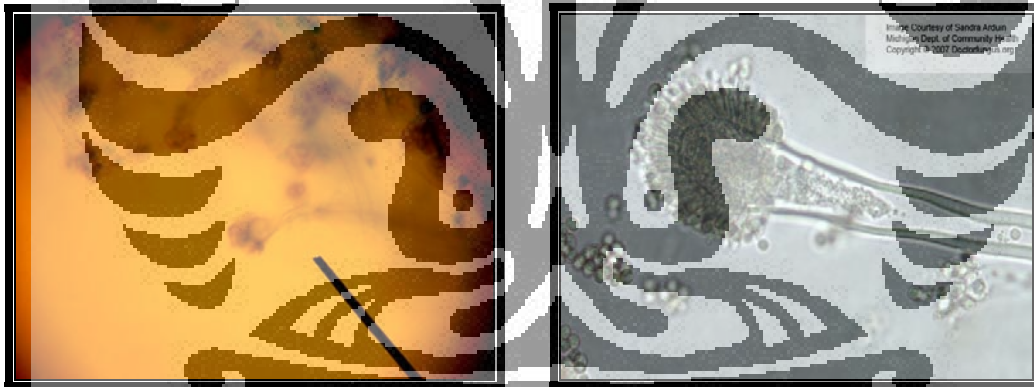
Gambar 6. Hasil pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit R2 yang diisolasi dari ranting tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan. b. Tampak belakang) yang mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* dan mempunyai aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol dengan nilai IC_{50} 200,65 μ g/ml



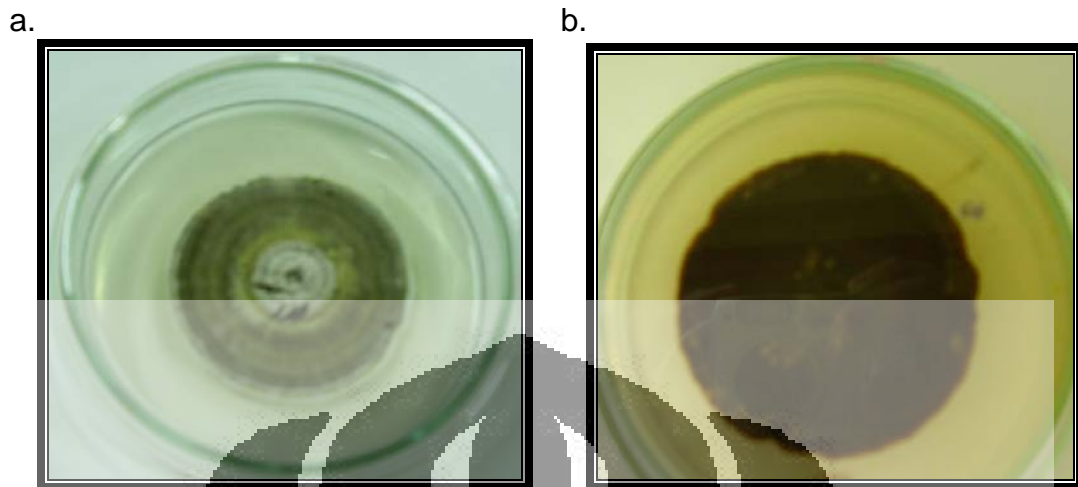
Gambar 7. Hasil pengamatan secara mikroskopik (perbesaran 400 kali) (a. isolat kapang endofit R2, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus *Cladophialophora* (50))



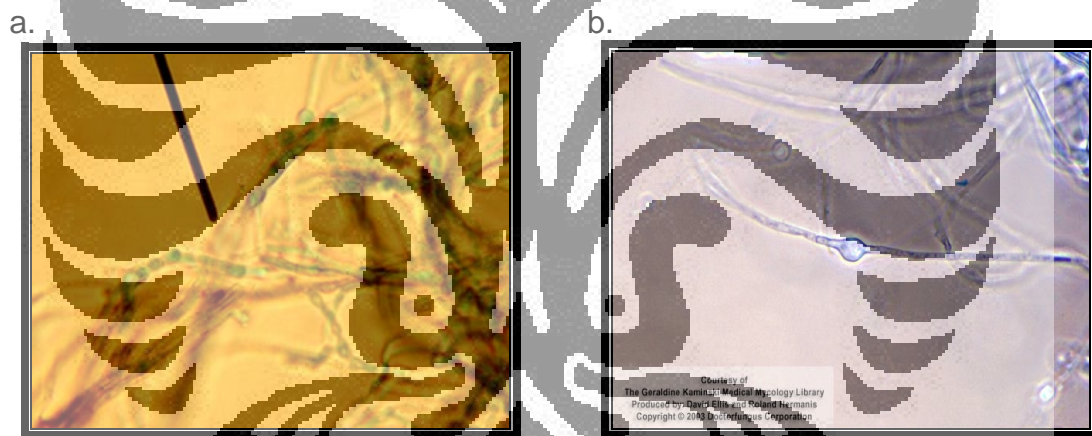
Gambar 8. Hasil pengamatan secara makroskopik isolat kapang endofit R3 dari ranting tanaman *Garcinia mangostana* (Tampak depan) yang mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan mempunyai aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol dengan nilai IC_{50} 170, 97 μ g / ml



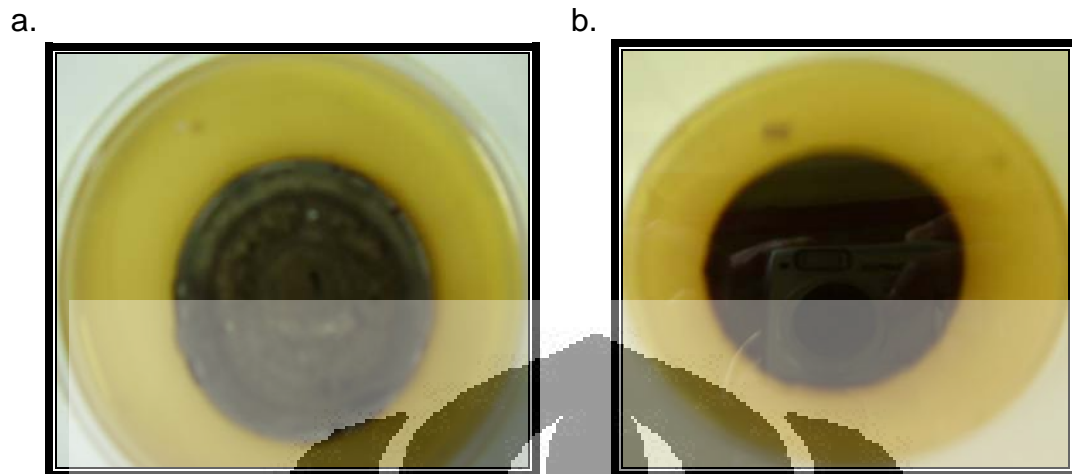
Gambar 9. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit R3, dibandingkan dengan b. Kapang dari genus *Aspergillus* (50))



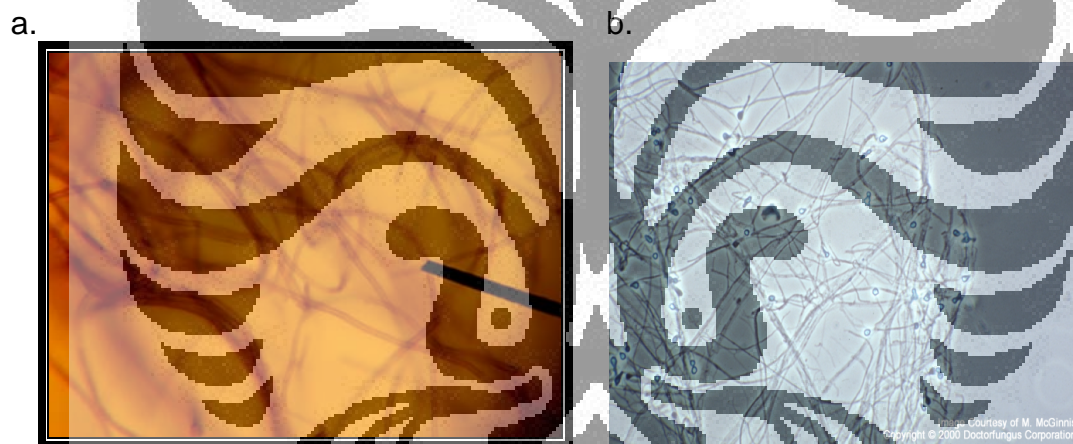
Gambar 10. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit D4 yang diisolasi dari daun Tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang)



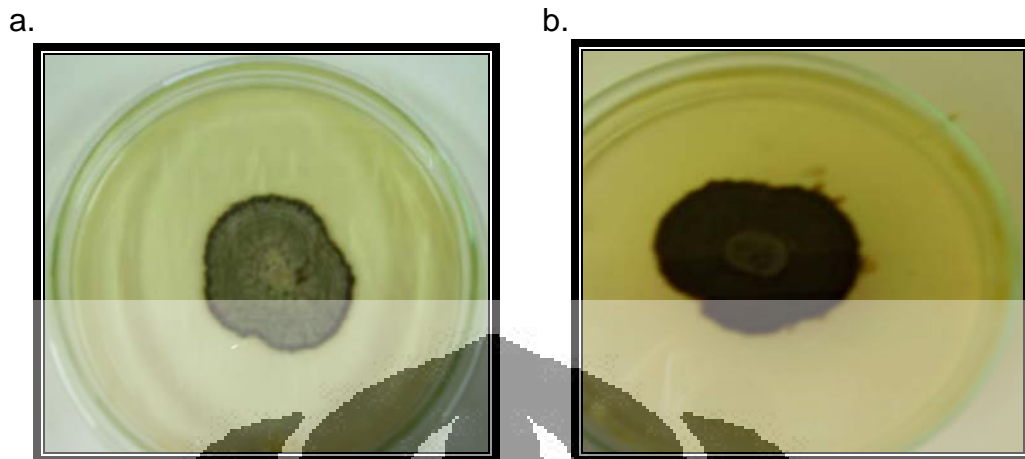
Gambar 11. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit D4, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus *Microspora* (50))



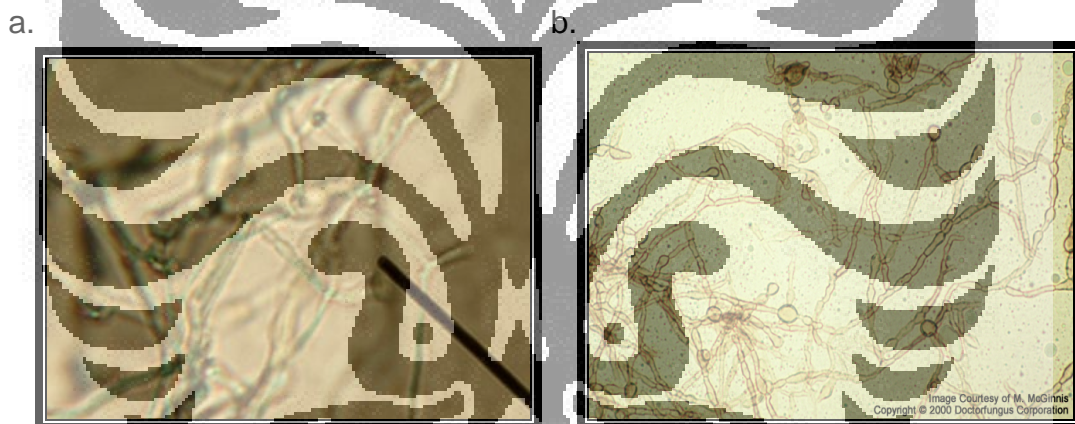
Gambar 12. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit D5a yang diisolasi dari daun Tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang)



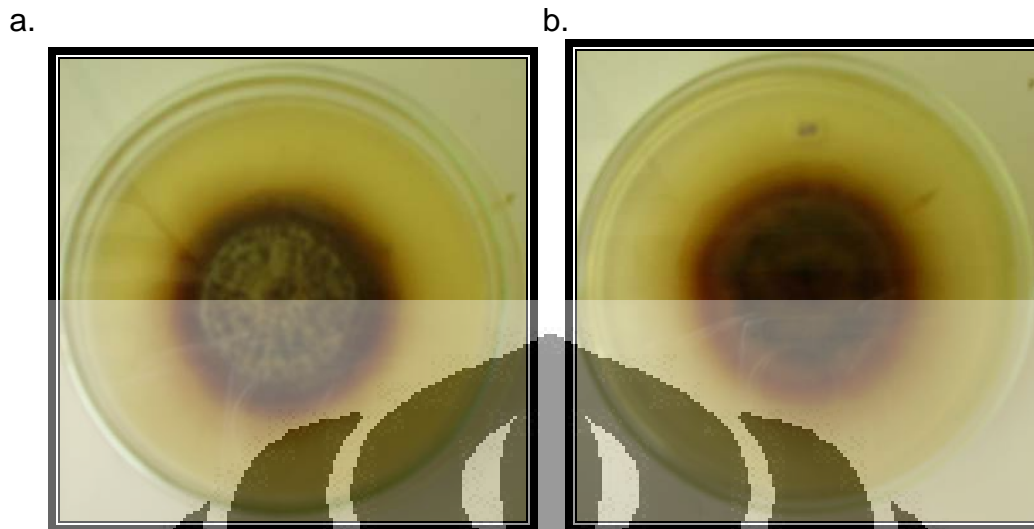
Gambar 13. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit D5a, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus *Emonsia* (50))



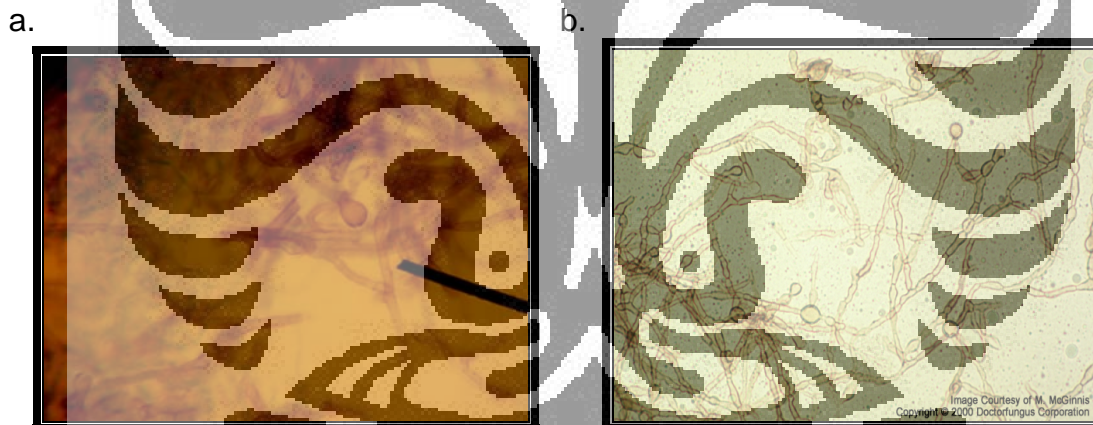
Gambar 14. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit D5B yang diisolasi dari daun Tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang)



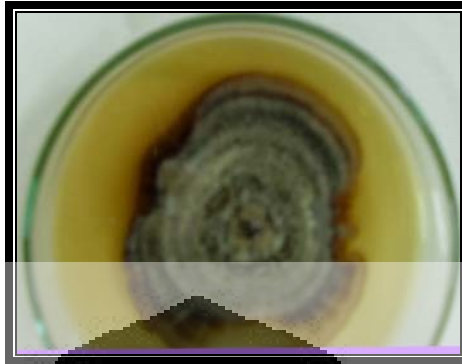
Gambar 15. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit D5B, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus *Cladophialophora* (50))



Gambar 16. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit R6 yang diisolasi dari ranting tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang)



Gambar 17. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit R6, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus *Cladophialophora* (50))

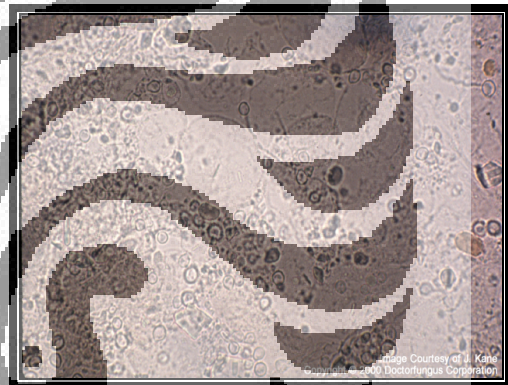


Gambar 18. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit R7 yang diisolasi dari ranting tanaman *Garcinia mangostana* (Tampak depan)

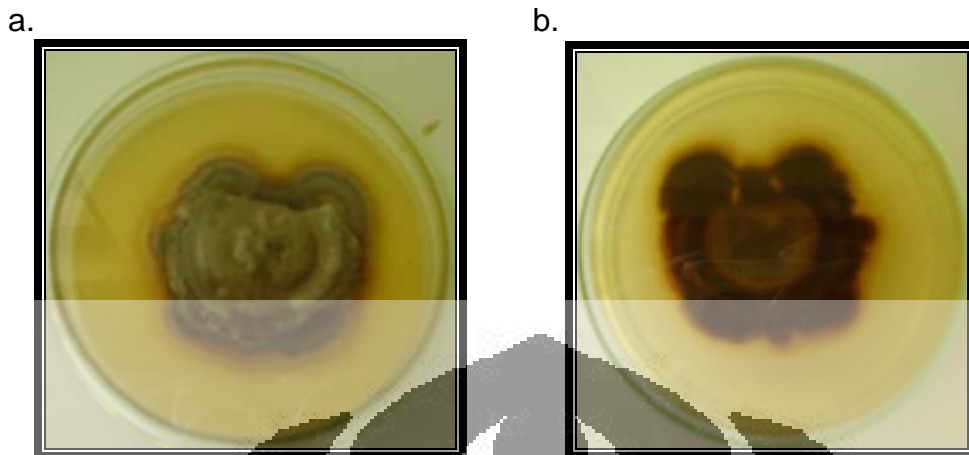
a.



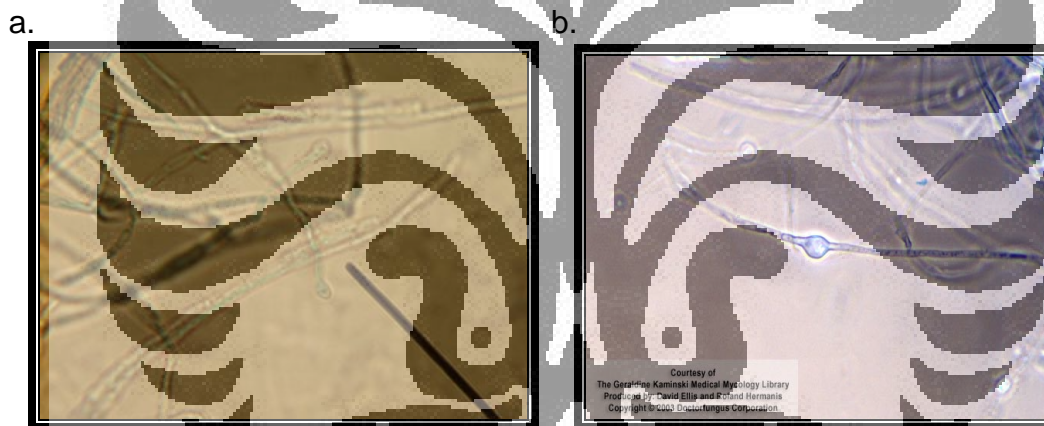
b.



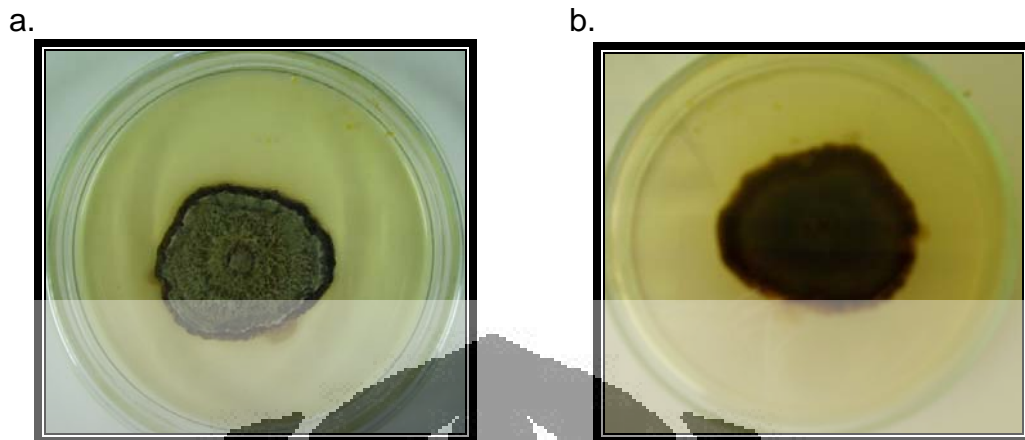
Gambar 19. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit R7, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus *Scopulariopsis* (50))



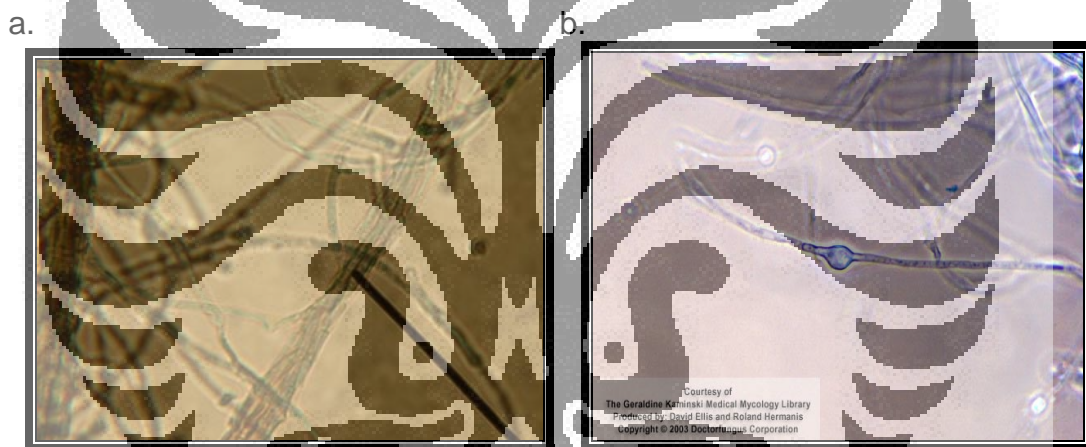
Gambar 20. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit R9 yang diisolasi dari ranting tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang)



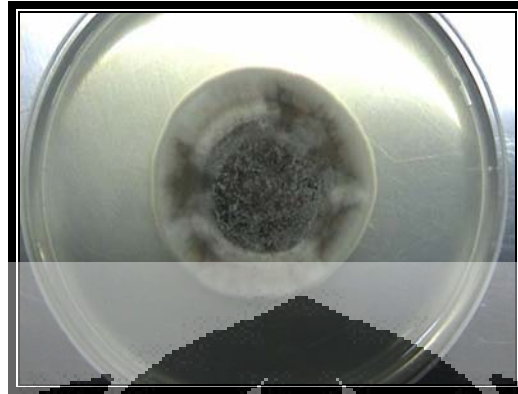
Gambar 21. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit R9, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus *Microspora* (50))



Gambar 22. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit D10 yang diisolasi dari daun tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang)

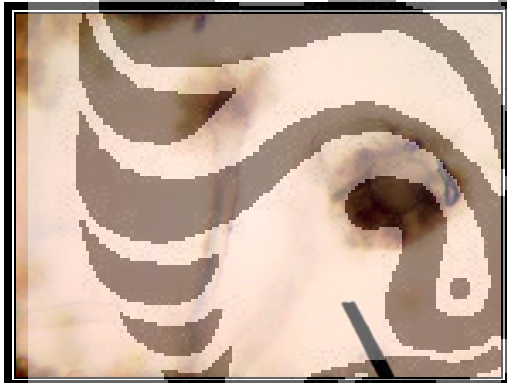


Gambar 23. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit R9, dibandingkan dengan b. Kapang dari genus *Microspora* (50))



Gambar 24. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit R13A yang diisolasi dari ranting tanaman *Garcinia mangostana* (Tampak depan)

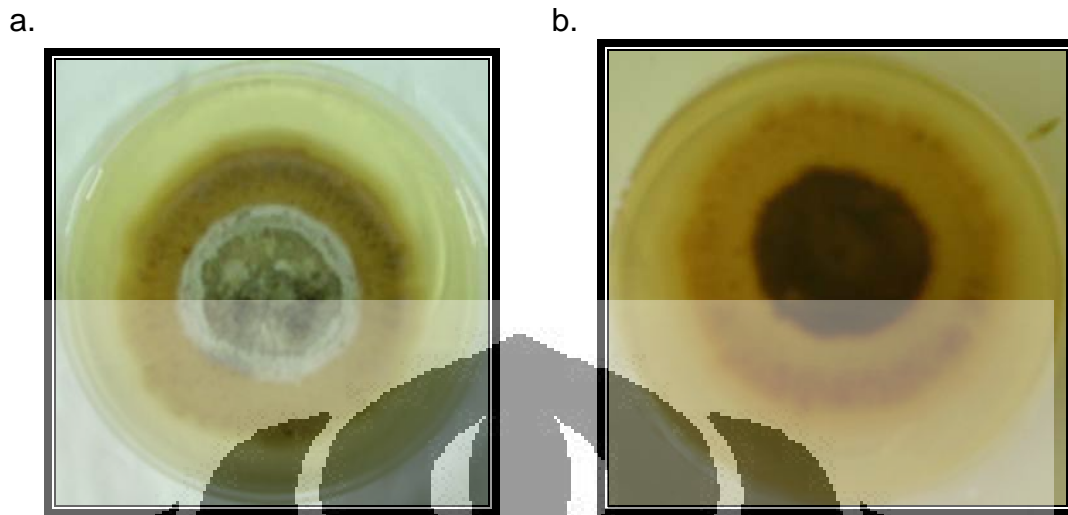
a.



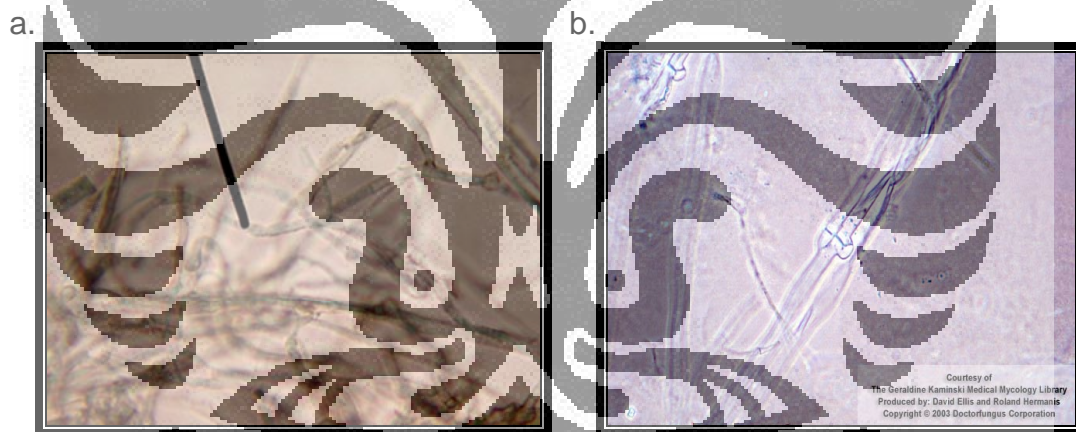
b.



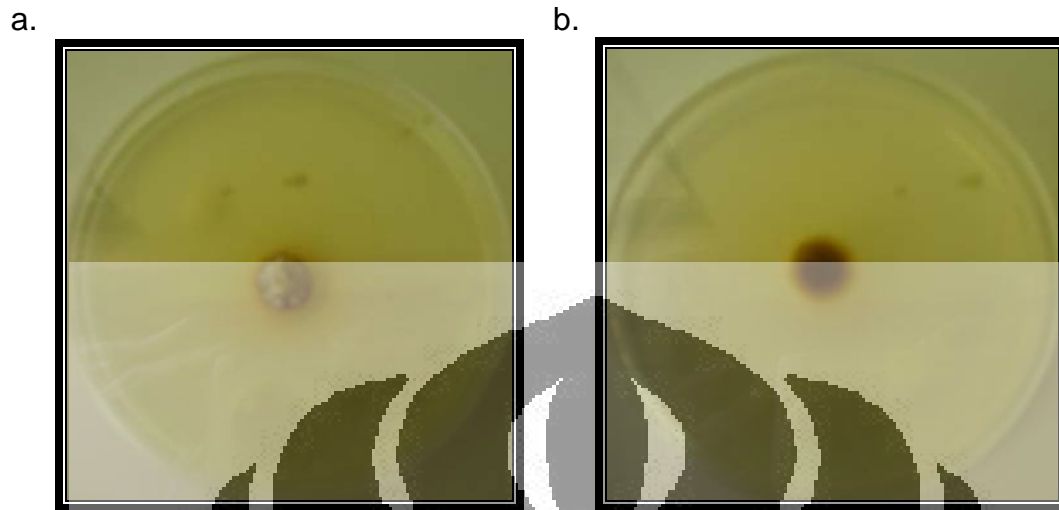
Gambar 25. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit R9, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus *Aspergillus* (50)),



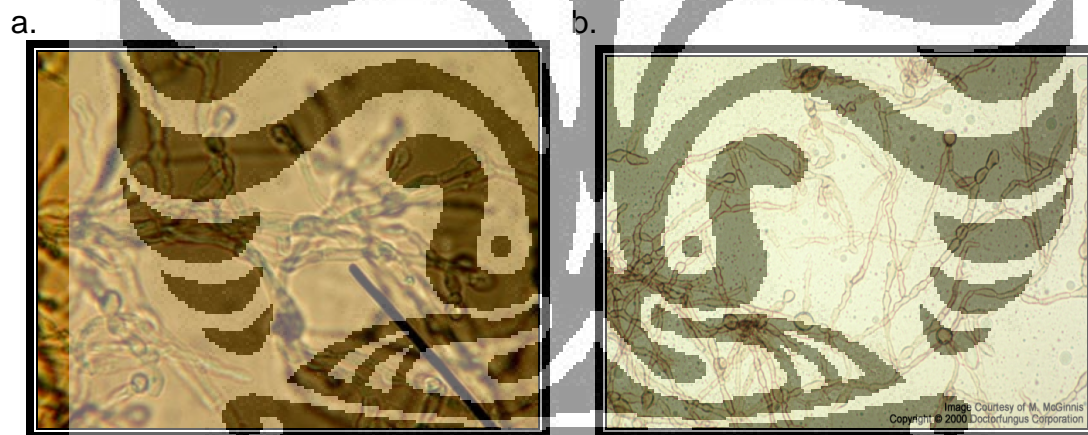
Gambar 26. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit R13B yang diisolasi dari ranting tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang)



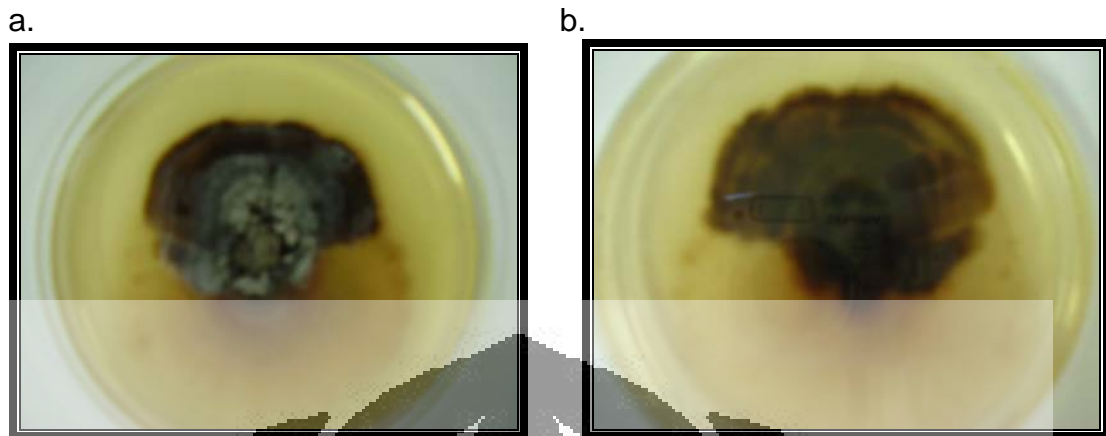
Gambar 27. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit R13B, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus Basidiomycete (50))



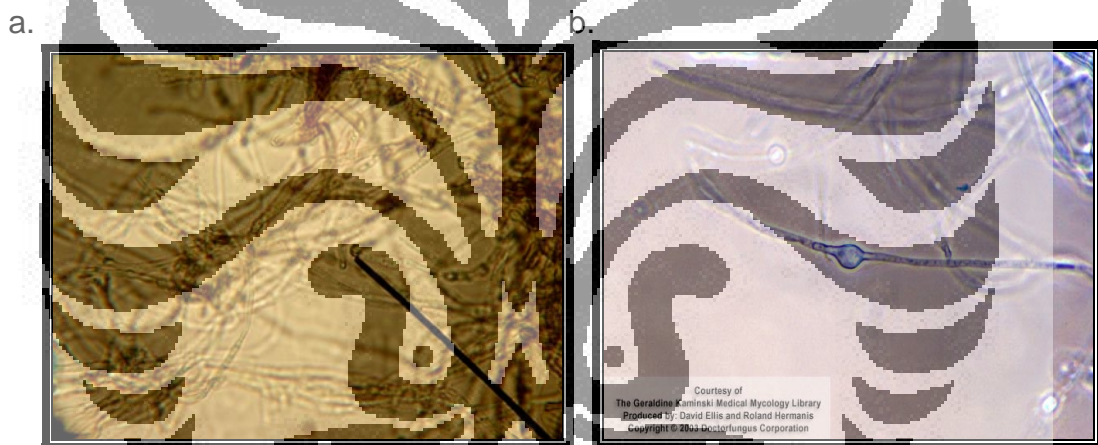
Gambar 28. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit D14 yang diisolasi dari daun tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang)



Gambar 29. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit D14, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus *Cladophialophora* (50))



Gambar 30. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit R15A yang diisolasi dari daun tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang)



Gambar 31. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit D14, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus *Microspora* (50))

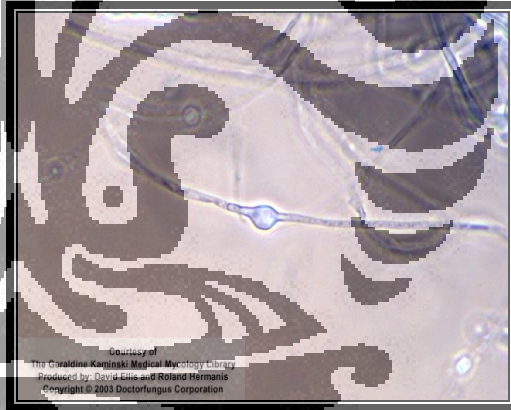


Gambar 32. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit R15b yang diisolasi dari ranting tanaman *Garcinia mangostana* (Tampak depan)

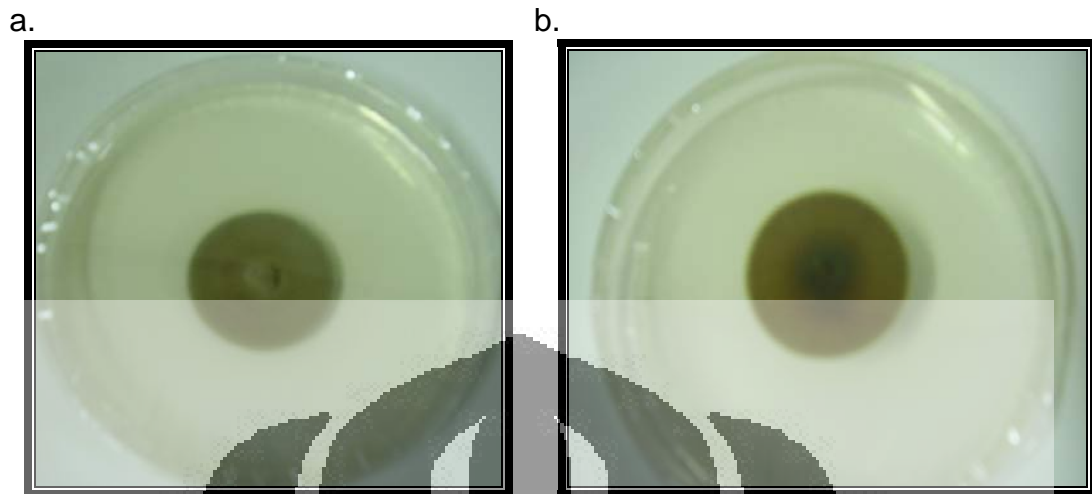
a.



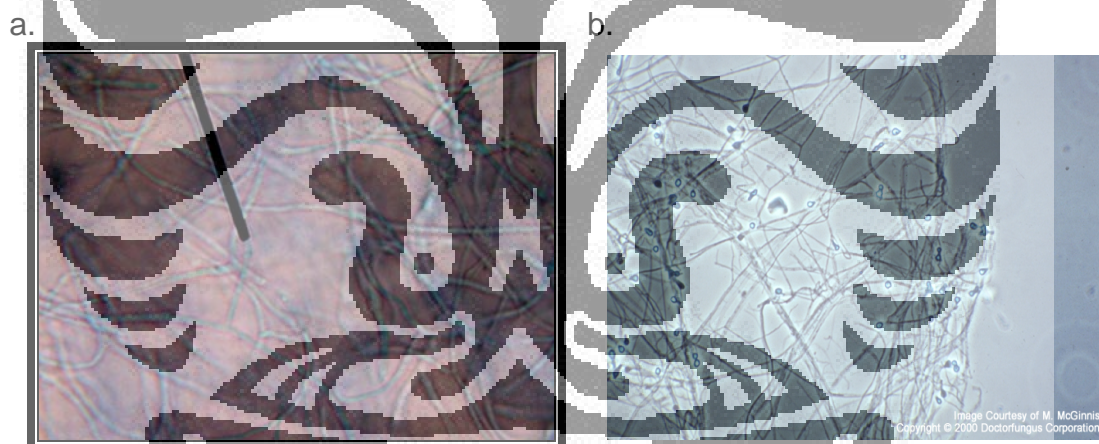
b.



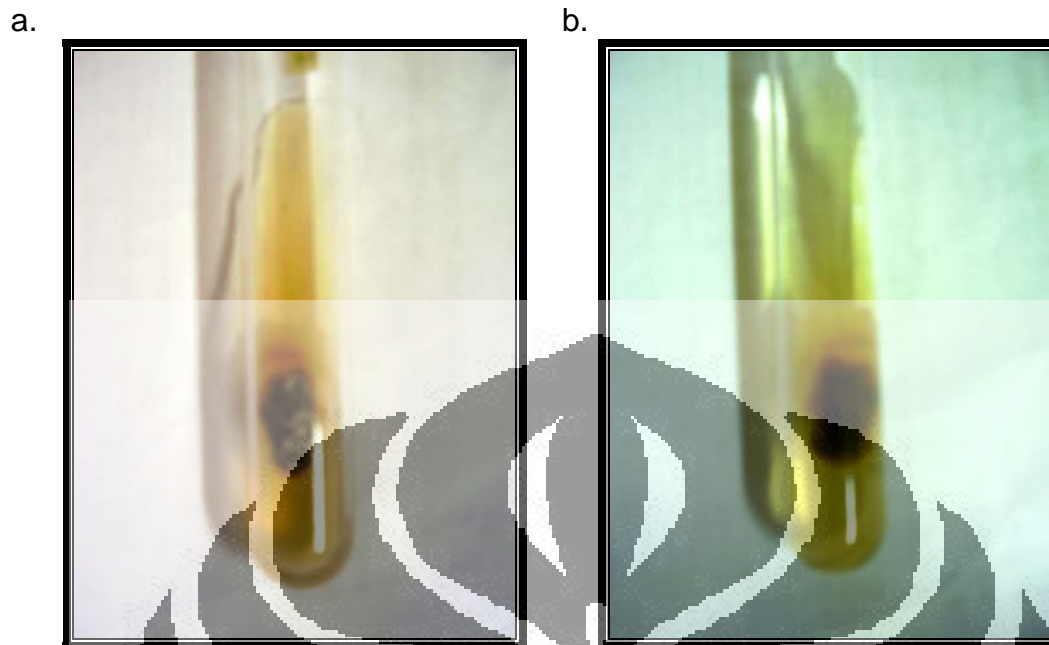
Gambar 33. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit R15b, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus *Microspora* (50))



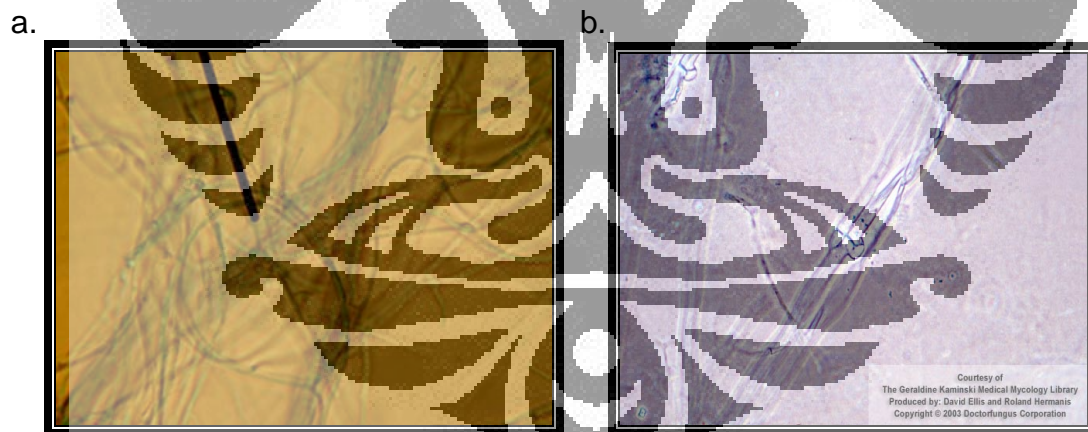
Gambar 34. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit R17 yang diisolasi dari ranting tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang)



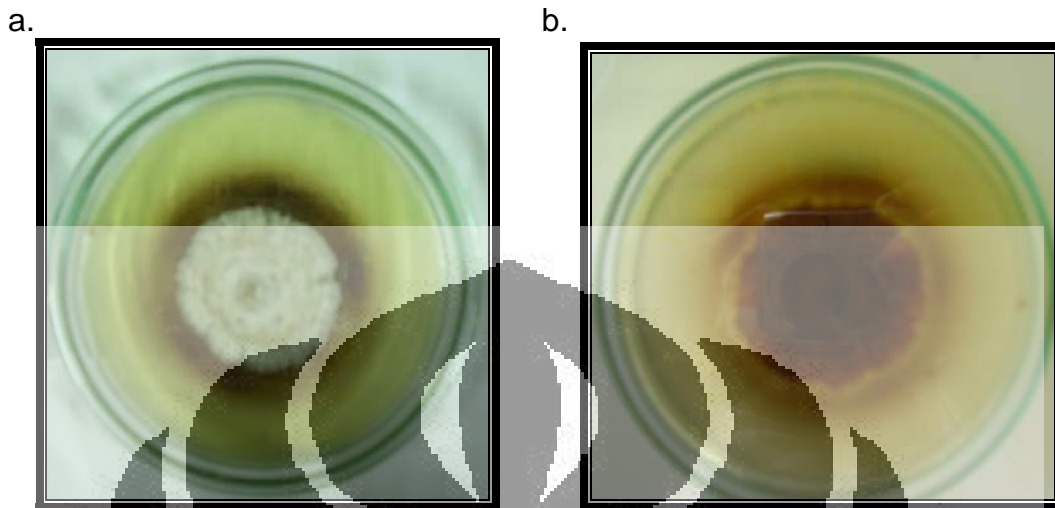
Gambar 35. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit R17, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus Emonsia (50))



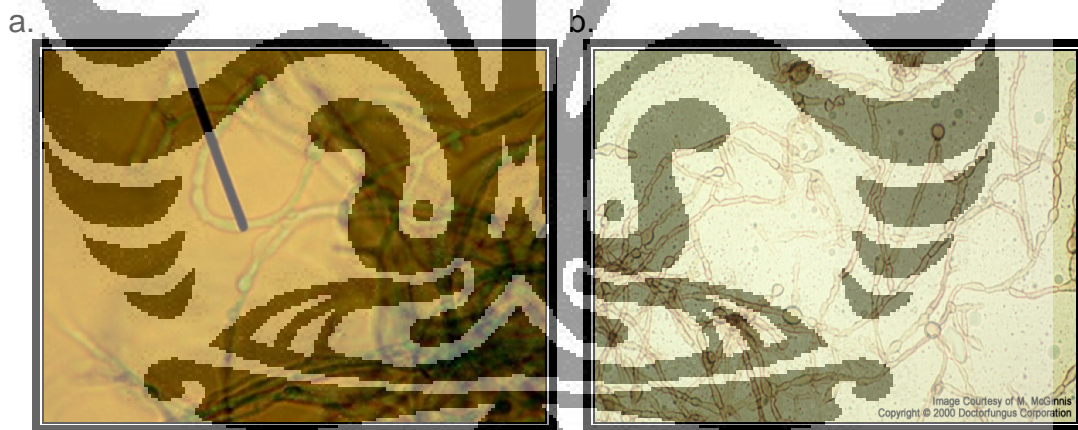
Gambar 36. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit R18 yang diisolasi dari ranting tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang) yang mempunyai aktivitas antioksidan terbaik dengan nilai IC_{50} 107,71 $\mu\text{g} / \text{ml}$



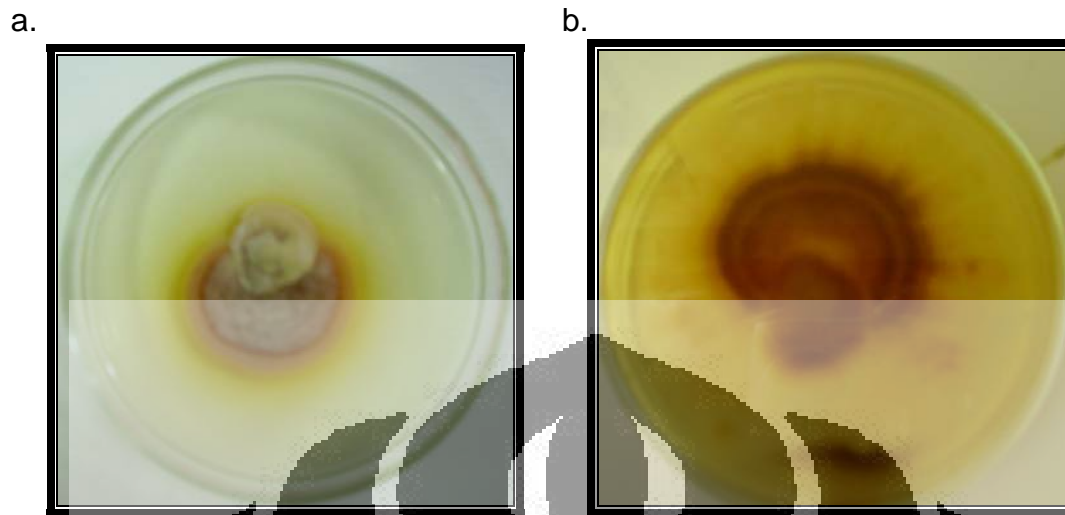
Gambar 37. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit R18, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus *Microspora* (50))



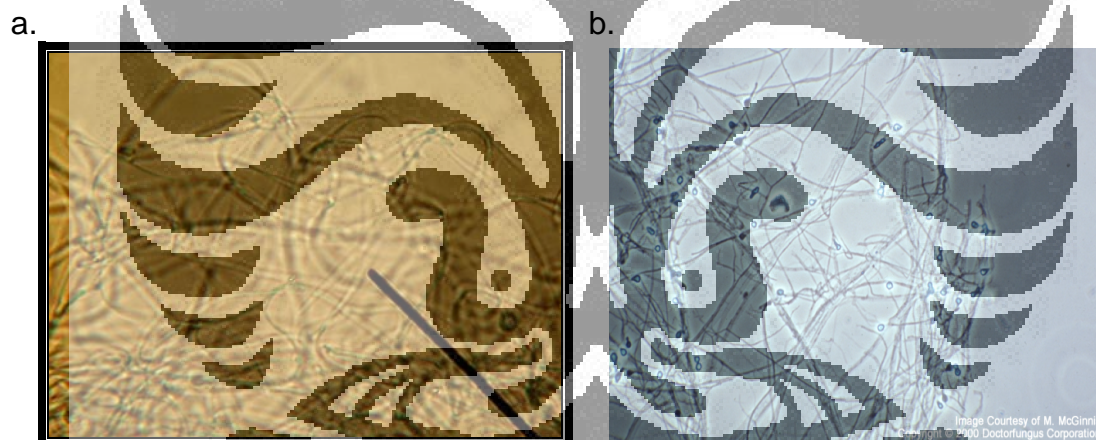
Gambar 38. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit R19 yang diisolasi dari ranting tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang)



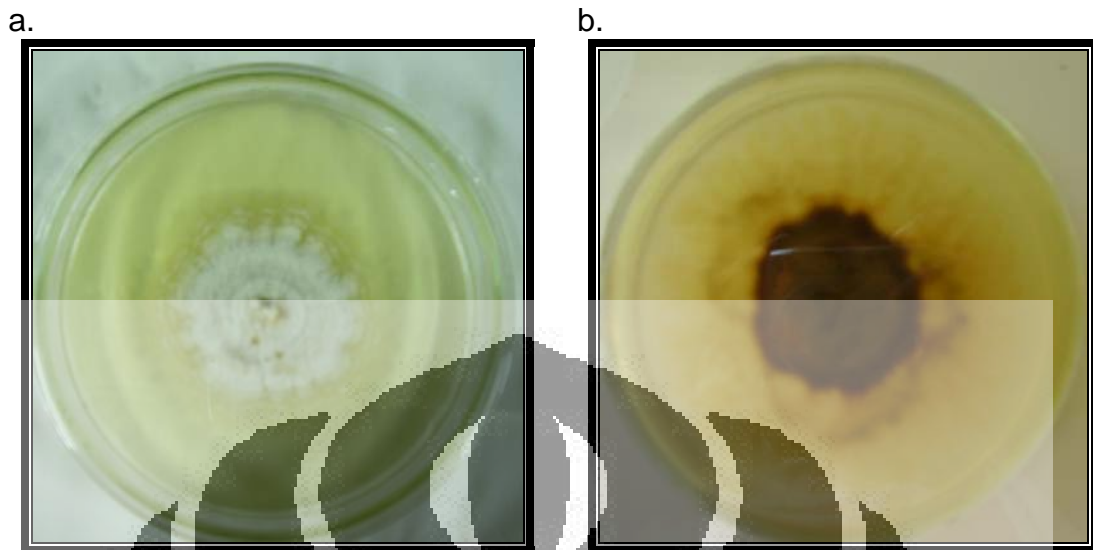
Gambar 39. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit R19, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus *Cladophialophora* (50))



Gambar 40. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit R20 yang diisolasi dari ranting tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang)



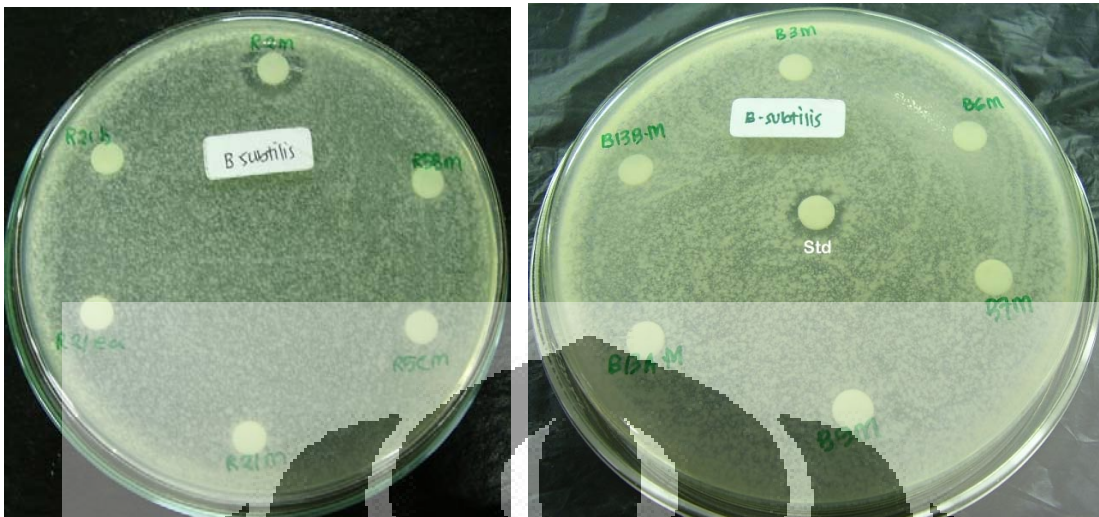
Gambar 41. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit R20, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus Emonsia (50))



Gambar 42. Hasil pengamatan secara makroskopik Isolat kapang endofit R21 yang diisolasi dari ranting tanaman *Garcinia mangostana* (a. Tampak depan, b. Tampak belakang)

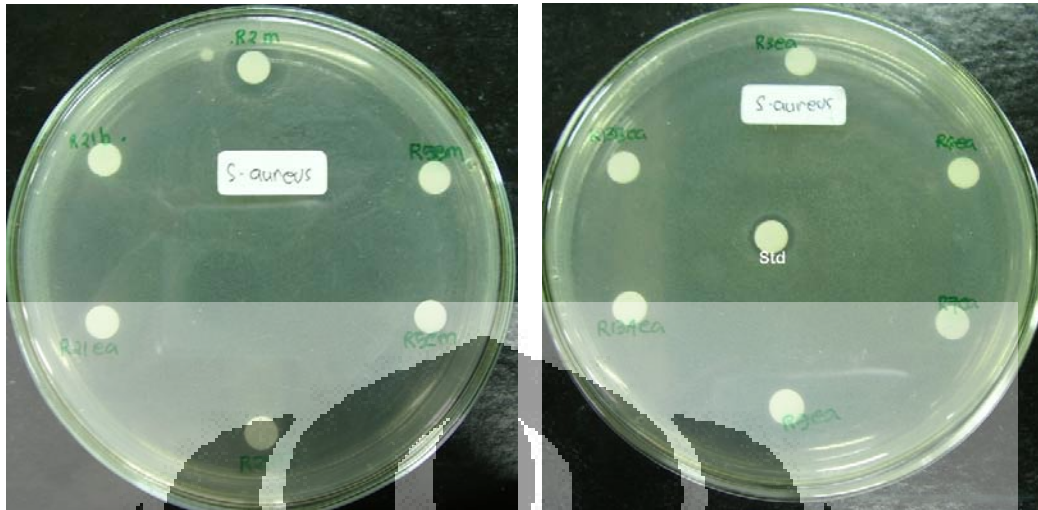


Gambar 43. Hasil pengamatan secara mikroskopik perbesaran 400 kali (a. Isolat kapang endofit R21, dibandingkan dengan b. Kapang dari Genus *Microspora* (50))



Gambar 44. Hasil penentuan diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi kapang endofit terhadap *Bacillus subtilis*

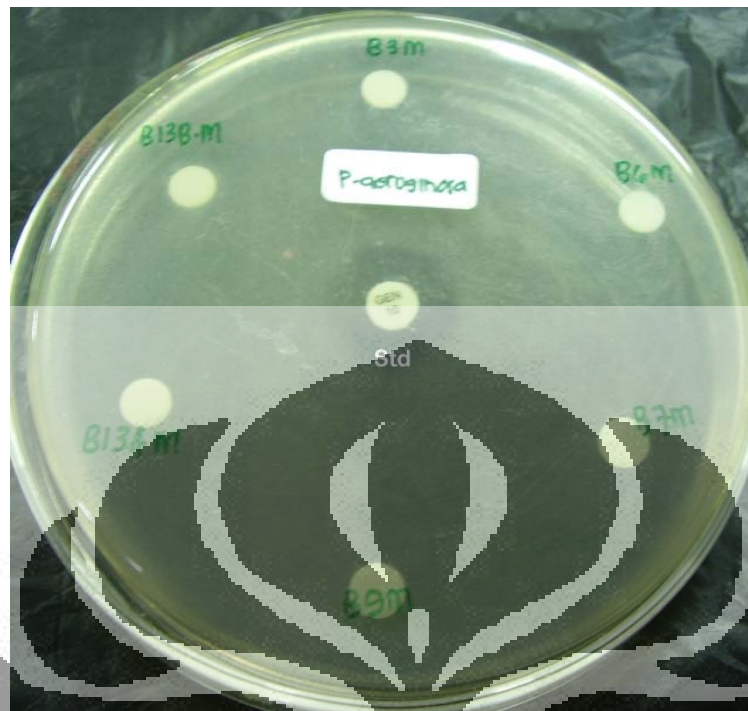
- Keterangan :
- R2M = Ekstrak metanol hasil ekstraksi fermentasi kapang endofit R2 dengan konsentrasi $20 \mu\text{g} / \text{cakram}$ mempunyai diameter zona hambat terhadap *Bacillus subtilis* 12,85 mm
 - R13a.M = Ekstrak metanol hasil ekstraksi fermentasi kapang endofit R13a dengan konsentrasi $40 \mu\text{g} / \text{cakram}$ mempunyai diameter zona hambat terhadap *Bacillus subtilis* 6,90 mm
 - R9M = Ekstrak metanol hasil ekstraksi fermentasi kapang endofit R19 dengan konsentrasi $40 \mu\text{g} / \text{cakram}$ mempunyai diameter zona hambat terhadap *Bacillus subtilis* 6,35 mm
 - Std = Larutan standar Amoksisilin dengan konsentrasi $20 \mu\text{g} / \text{cakram}$ mempunyai diameter zona hambat terhadap *Bacillus subtilis* 8,55 mm.



Gambar 45. Hasil penentuan diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi kapang endofit terhadap *Staphylococcus aureus*

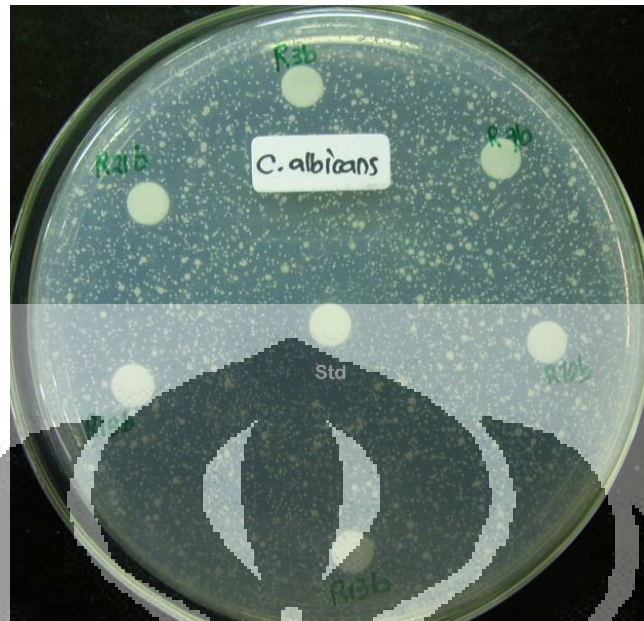
Keterangan : R2.M = Ekstrak metanol hasil ekstraksi fermentasi kapang endofit R2 dengan konsentrasi $20 \mu\text{g}$ / cakram mempunyai diameter zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* 11,90 mm

Std = Larutan standar Amoksisilin dengan konsentrasi $20 \mu\text{g}$ / cakram mempunyai diameter zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* 7,65 mm



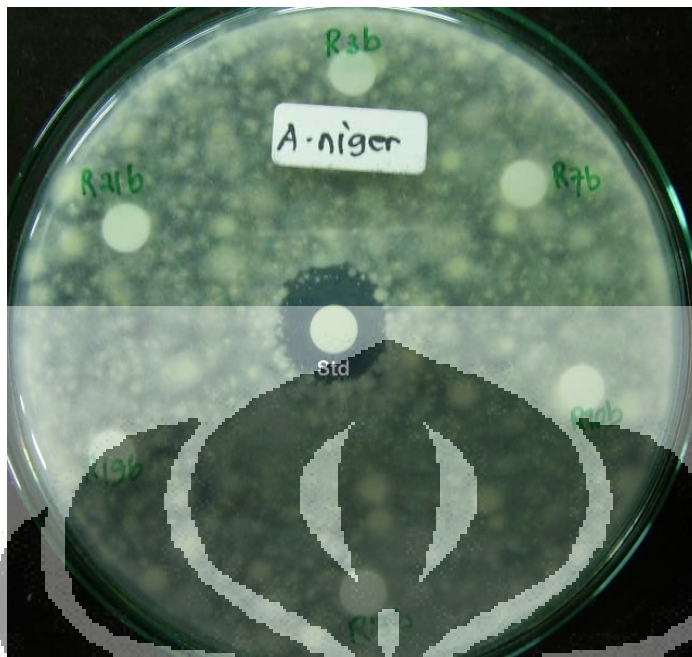
Gambar 46. Hasil penentuan diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi kapang endofit terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

- Keterangan : R13A.M = Ekstrak metanol hasil ekstraksi fermentasi kapang endofit R13A dengan konsentrasi $40 \mu\text{g}$ / cakram mempunyai diameter zona hambat parsial terhadap *Pseudomonas aeruginosa* 7,50 mm
- R6.M = Ekstrak metanol hasil fermentasi kapang endofit R6 dengan konsen $40 \mu\text{g}$ / cakram mempunyai diameter zona hambat parsial terhadap *Pseudomonas aeruginosa* 7,50 mm
- Std = Cakram standar Gentamisin dengan konsentrasi $10 \mu\text{g}$ / cakram mempunyai diameter zona hambat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* 14,60 mm



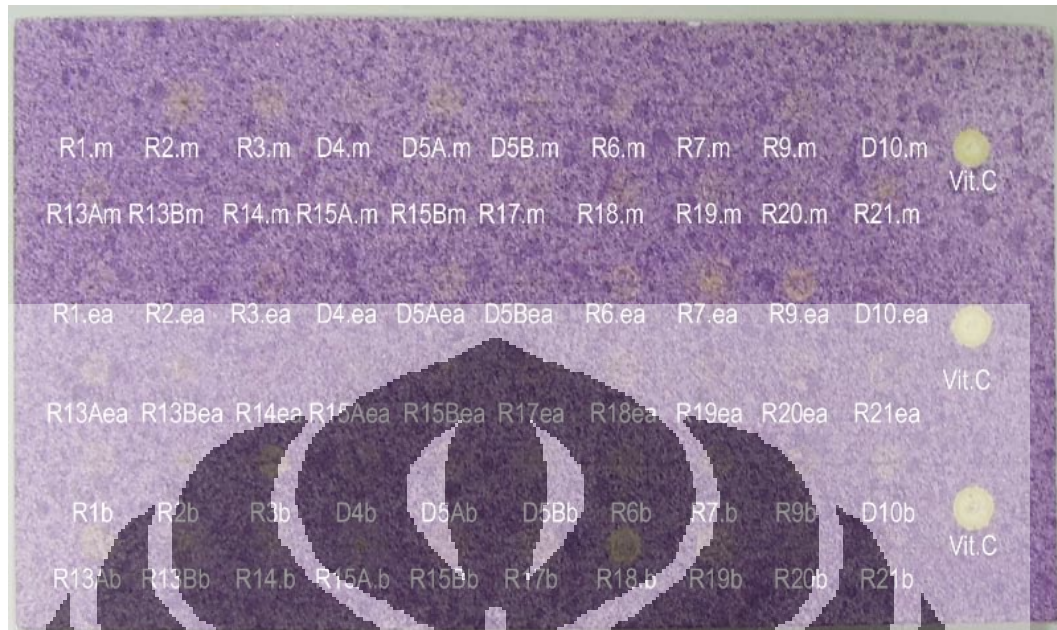
Gambar 47. Hasil penentuan diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi kapang endofit terhadap *Candida albicans*

- Keterangan :
- R3.B = Ekstrak *n* – butanol hasil ekstraksi fermentasi kapang endofit R3 dengan konsentrasi 100 μg / cakram mempunyai diameter zona hambat parsial terhadap *Candida albicans* 10,00 mm
 - R13b.B = Ekstrak *n* – butanol hasil ekstraksi fermentasi kapang endofit R13b dengan konsentrasi 100 μg / cakram mempunyai diameter zona hambat parsial terhadap *Candida albicans* 10,00 mm
 - R19.B = Ekstrak *n* – butanol hasil ekstraksi fermentasi kapang endofit R19 dengan konsentrasi 100 μg / cakram mempunyai diameter zona hambat parsial terhadap *Candida albicans* 10,00 mm
 - R21.B = Ekstrak *n* – butanol hasil ekstraksi fermentasi kapang endofit R21 dengan konsentrasi 100 μg / cakram mempunyai diameter zona hambat terhadap *Candida albicans* 10,00 mm
 - Std = Larutan standar Itraonazol dengan konsentrasi 100 μg / cakram mempunyai diameter zona hambat parsial terhadap *Candida albicans* 19,00 mm



Gambar 48. Hasil penentuan diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi kapang endofit terhadap *Aspergillus niger*

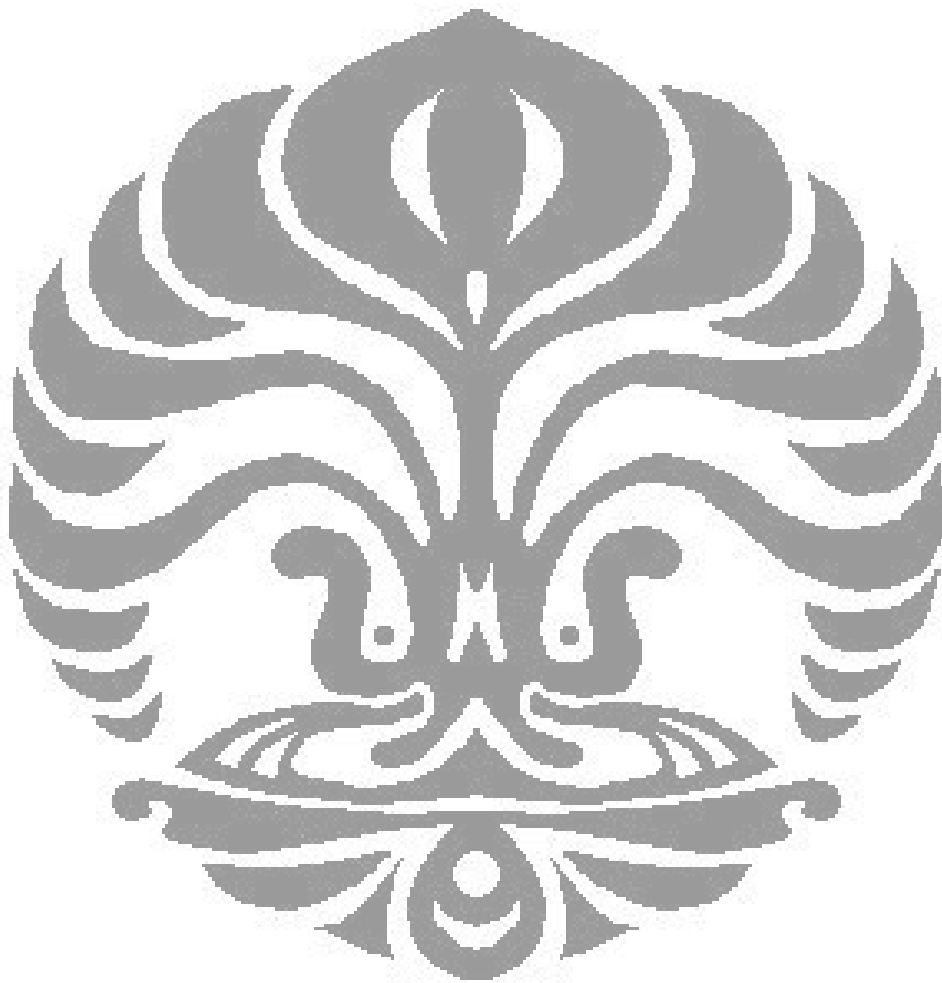
- Keterangan :
- R19.B = Ekstrak *n* – butanol hasil ekstraksi fermentasi kapang endofit R19 dengan konsentrasi 100 μg / cakram mempunyai diameter zona hambat parsial terhadap *Aspergillus niger* 7,15 mm
 - R21.B = Ekstrak *n* – butanol hasil ekstraksi fermentasi kapang endofit R21 dengan konsentrasi 100 μg / cakram mempunyai diameter zona hambat parsial terhadap *Aspergillus niger* 8,00 mm
 - Std = Larutan standar Itrakonazol dengan konsentrasi 100 μg / cakram mempunyai diameter zona hambat total terhadap *Aspergillus niger* 10,20 mm



Gambar 49. Hasil uji pendahuluan antioksidan ekttrak uji dengan penotolan pada lempeng KLT dan disemprot dengan DPPH 0,2 % dalam metanol

Keterangan :

- Vit. C : standar vitamin C dengan konsentrasi 2 mg / ml, ditotolkan sebanyak 10 μ l
- M : ekstrak metanol dengan konsentrasi 2 mg / ml, ditotolkan sebanyak 10 μ l
- EA : ekstrak etil asetat dengan konsentrasi 2 mg / ml, ditotolkan sebanyak 10 μ l
- B : ekstrak *n* – butanol dengan konsentrasi 2 mg / ml, ditotolkan sebanyak 10 μ l
- R / D : kode isolat yang berasal dari ranting / daun *Garcinia mangostana*
- Angka : nomor isolat



Tabel 1

Hasil isolasi kapang endofit dari ranting dan daun tanaman
Garcinia mangostana

No.	Kode Isolat	Bagian Tanaman
1.	R1	Ranting
2.	R2	Ranting
3.	R3	Ranting
4.	D4	Daun
5.	D5A	Daun
6.	D5B	Daun
7.	R6	Ranting
8.	R7	Ranting
9.	R8	Ranting
10.	R9	Ranting
11.	D10	Daun
12.	R11	Ranting
13.	R12	Daun
14.	R13A	Ranting
15.	R13B	Ranting
16.	D14	Ranting
17.	R15A	Ranting
18.	R15B	Ranting
19.	D16	Daun
20.	R17	Ranting
21.	R18	Ranting
22.	R19	Ranting
23.	R20	Ranting
24.	R21	Ranting

Tabel 2

Isolat kapang endofit yang difermentasi dan hasil ekstraksi dengan pelarut organik metanol, *n* – butanol dan etil asetat

Kode Isolat	Kode Ektrak		
	Etil asetat (EA)	<i>n</i> – butanol (B)	Metanol (M)
R1	R1.EA	R1.B	R1.M
R2	R2.EA	R2.B	R2.M
R3	R3.EA	R3.B	R3.M
D4	D4.EA	D4.B	D4.M
D5a	D5a.EA	D5a.B	D5a.M
D5b	D5b.EA	D5b.B	D5b.M
R6	R6.EA	R6.B	R6.M
R7	R7.EA	R7.B	R7.M
R9	R9.EA	R9.B	R9.M
D10	D10.EA	D10.B	D10.M
R13a	R13a.EA	R13a.B	R13a.M
R13b	R13b.EA	R13b.B	R13b.M
D14	D14.EA	D14.B	D14.M
R15a	D15a.EA	D15a.B	D15a.M
R15b	D15b.EA	D15b.B	D15b.M
R17	R17.EA	R17.B	R17.M
R18	R18.EA	R18.B	R18.M
R19	R19.EA	R19.B	R19.M
R20	R20.EA	R20.B	R20.M
R21	R21.EA	R21.B	R21.M

Keterangan :

1. Huruf pertama menunjukkan bagian tanaman asal yang diisolasi kapang endofitnya (R = ranting, D = daun)
2. Nomor menunjukkan urutan penanaman simplisia
3. Huruf kedua (a atau b) menunjukkan kapang berasal dari bagian tanaman yang sama yang diletakkan pada medium isolasi namun berbeda morfologi
4. Huruf ketiga dan keempat menunjukkan pelarut organik yang digunakan untuk mengekstraksi metabolit sekunder dari hasil fermentasi.

Contoh : D5a.EA, D = daun

5a = penanaman daun yang kelima, morfologi a
EA = diekstraksi dengan Etil asetat

Tabel 3

Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi dengan konsentrasi 20 µg / cakram terhadap bakteri uji

Kode Ekstrak	Diameter zona hambat (mm)				
	<i>E.coli</i>	<i>S. typhosa</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
R3.M	-	-	6,25	-	-
R6.M	-	-	6,25	-	-
R7.M	-	-	-	6,35	-
R9.M	-	-	-	6,35	-
R13a.M	6,30	6,35	-	6,40	6,35
R13b.M	-	-	-	-	6,35
R18.M	-	-	-	-	-
R19.M	-	-	-	-	6,40
R3.EA	-	-	-	-	-
R6.EA	-	-	-	-	-
R7.EA	-	-	-	-	-
R9.EA	-	-	-	-	-
R13a.EA	-	-	-	-	-
R13b.EA	-	-	-	-	-
R18.EA	-	-	-	-	-
R19.EA	-	-	-	-	6,50
R3.B	-	-	-	-	-
R6.B	-	-	-	-	-
R7.B	-	-	-	-	-
R9.B	-	-	-	-	-
R13a.B	-	-	-	-	-
R13b.B	-	-	-	-	-
R18.B	-	-	-	-	-
R19.B	-	-	-	-	7,35
R2.M	-	6,15	-	11,90	12,85
D5a.M	6,30	6,15	6,60 (p)	6,30	-
D5b.M	-	-	6,65 (p)	-	-
R2.EA	6,70	-	-	-	-
D5a.EA	-	-	-	-	-
D5b.EA	-	6,20	7,60 (p)	6,30	-

Keterangan : (p) = zona hambat parsial

Tabel 4

Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi dengan konsentrasi 40 µg / cakram terhadap bakteri uji

Kode Ekstrak	Diameter zona hambat (mm)				
	<i>E.coli</i>	<i>S. typhosa</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
R3.M	-	-	7,10 (p)	6,30	7,45 (p)
R6.M	-	-	7,50 (p)	6,20	-
R7.M	-	-	-	6,50	-
R9.M	-	-	-	6,50	6,35
R13a.M	7,35 (p)	6,35	7,50	7,25	6,90
R13b.M	-	-	6,60 (p)	-	7,25 (p)
R18.M	-	-	-	-	7,00 (p)
R19.M	-	-	-	6,40	7,00 (p)
R3.EA	-	-	-	-	-
R6.EA	-	-	6,50	-	-
R7.EA	6,30	-	-	-	-
R9.EA	-	-	-	-	-
R13a.EA	-	6,75	-	-	-
R13b.EA	-	-	-	-	-
R18.EA	-	-	6,60	-	6,60
R19.EA	6,30	-	6,50	-	6,50
R3.B	6,30	6,30	6,30	-	6,65 (p)
R6.B	6,30	6,50	6,30	-	-
R7.B	6,30	6,50 (p)	6,30	-	6,50 (p)
R9.B	-	-	6,30	-	6,30 (p)
R13a.B	-	6,50	-	-	6,30 (p)
R13b.B	6,50	6,30	6,50	-	-
R18.B	6,30	-	6,50	6,40	6,50
R19.B	-	-	6,60	6,40	6,60
R2.M	6,50	6,10	-	12,55	14,65
D5A.M	6,30	-	-	-	-
D5B.M	6,20	-	6,50	7,65	-
R21.M	-	6,25	-	6,10	6,40 (p)
R21.EA	6,30	6,25	6,10	6,25	6,40 (p)
R21.B	-	6,25	-	6,40	6,40 (p)

Keterangan : (p) = zona hambat parsial

Tabel 5

Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak hasil fermentasi dengan konsentrasi 100 µg / cakram terhadap kapang uji

Kode Ekstrak	Diameter zona hambat (mm)	
	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
R3.M	-	-
R7.M	-	-
R10.M	8,00 (p)	7,15 (p)
R13b.M	8,75 (p)	-
R19.M	-	-
R21.M	-	-
R3.EA	7,25 (p)	-
R7.EA	9,00 (p)	-
R13b.EA	7,15 (p)	-
R19.EA	-	7,15 (p)
R21.EA	7,15 (p)	7,00 (p)
R3.B	10,00 (p)	-
R7.B	7,15 (p)	-
R10.B	-	-
R13b.B	10,00 (p)	-
R19.B	-	7,15 (p)
R21.B	10,00 (p)	10,00 (p)

Keterangan : (p) = zona hambat parsial

Tabel 6

Hasil uji pendahuluan antioksidan ekstrak metabolit sekunder hasil fermentasi kapang endofit dari tanaman *Garcinia mangostana*

No.	Kode Ekstrak	Pengamatan setelah 30 menit	
		Hasil	Keterangan
1.	R2.M	+	Samar
2.	R3.M	+	Samar
3.	R7.EA	++	Kuning
4.	R9.EA	++	Kuning
5.	R3.B	+++	Kuning intensif
6.	R18.B	+++	Kuning intensif
7.	R19.B	++	Kuning

Tabel 7

Hasil uji aktivitas peredaman terhadap ekstrak mebolit sekunder hasil fermentasi kapang endofit dari tanaman *Garcinia mangostana*

Larutan uji	Konsentrasi (ppm)	Serapan blanko	Serapan sampel	Aktivitas peredaman (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
Vit C	2	0,8521	0,5592	34,39	3,11
	4		0,2913	65,85	
	6		0,1870	78,05	
	8		0,0471	94,48	
R2.M	25	0,9510	0,8082	15,04	200,65
	50		0,7350	22,71	
	75		0,6991	26,50	
	100		0,6683	29,76	
R3.M	25	0,6890	0,6772	1,71	170,97
	50		0,6318	8,30	
	75		0,6277	9,77	
	100		0,4819	30,06	
R7.EA	25	0,6163	0,4730	23,25	455,30
	50		0,4631	24,86	
	75		0,4618	25,07	
	100		0,3937	28,40	
R9.EA	25	0,8776	0,6299	28,22	206,57
	50		0,6030	31,29	
	75		0,5818	33,71	
	100		0,5525	37,44	
R3.B	25	0,5820	0,4823	17,13	131,80
	50		0,4052	30,38	
	75		0,3846	33,92	
	100		0,3511	39,67	
R18.B	25	0,8712	0,5188	40,45	107,71
	50		0,5093	46,54	
	75		0,4830	44,56	
	100		0,4346	50,17	
R19.B	25	0,7257	0,5253	27,62	189,73
	50		0,4706	35,15	
	75		0,4683	35,47	
	100		0,4502	37,96	

Lampiran 1

Hasil determinasi tanaman *Garcinia mangostana* L

LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT KONSERVASI TUMBUHAN - KEBUN RAYA BOGOR
(Center for Plant Conservation - Bogor Botanical Gardens)
Jalan Ir. H. Juanda No. 13, P.O. Box 309 Bogor 16003, Indonesia
Telepon (0251) 322197, 321657, 322220, 311362, 352519, Fax. 62 (251) 322187, 313985
e-mail : kribli@bogor.wasantara.net.id ; inetoc@indo.net.id

Norma : *Dita* BIPH.3.02/KS/07 Bogor, Desember 2007
Lamp. : -
Perihal : **Pemesanan material tanaman**

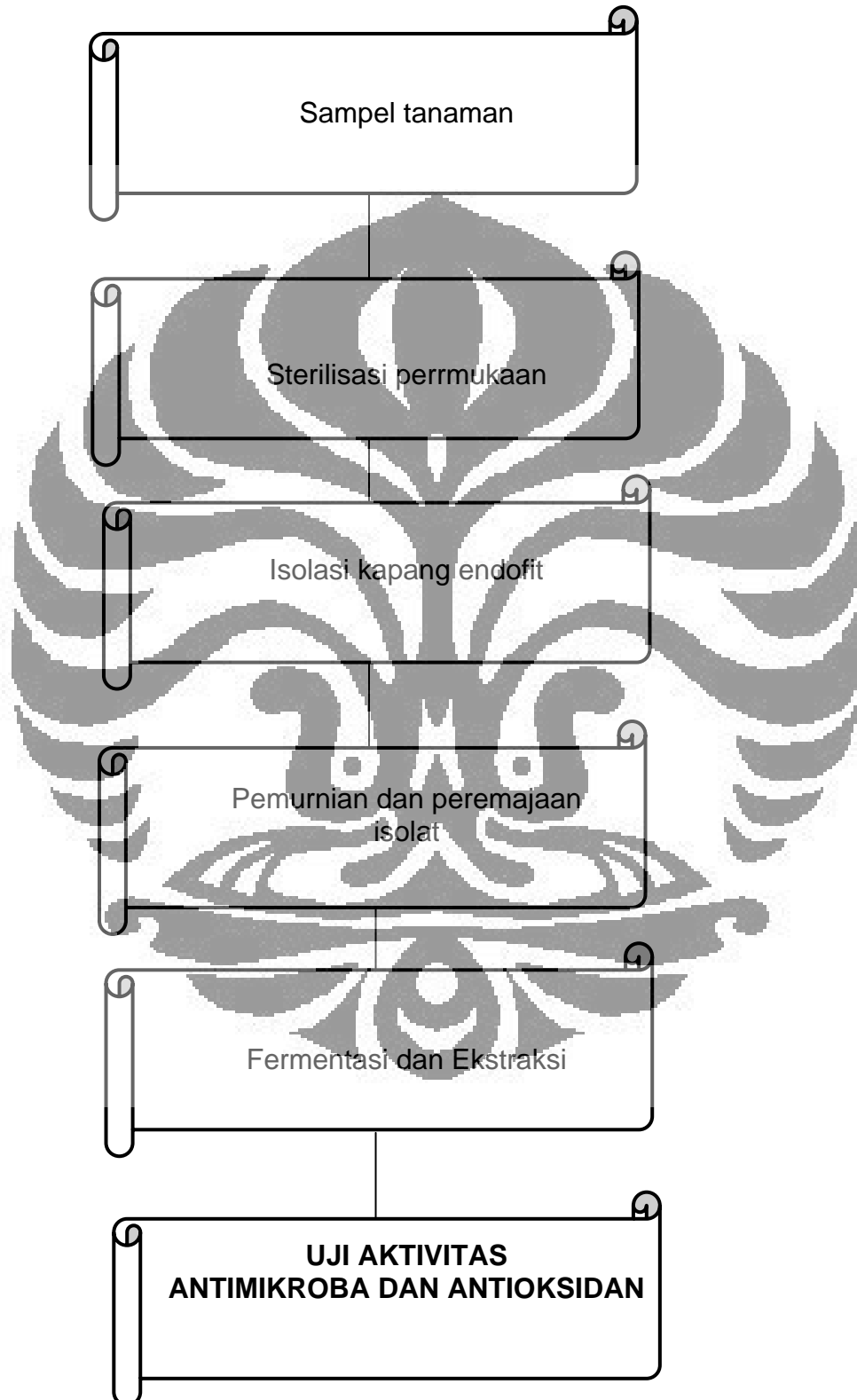
Kepada Yth.
Sdr. Renita Rachmayani
FMIPA - FARMASI
Universitas Indonesia
Depok

Dengan hormat,
Bersama ini kami sampaikan bahwa material tanaman berupa pucuk/ ranting yang Saudari pesan ke Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor adalah dari jenis *Garcinia mangostana* L.
suku Clusiaceae (Guttiferae).
Demikian keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

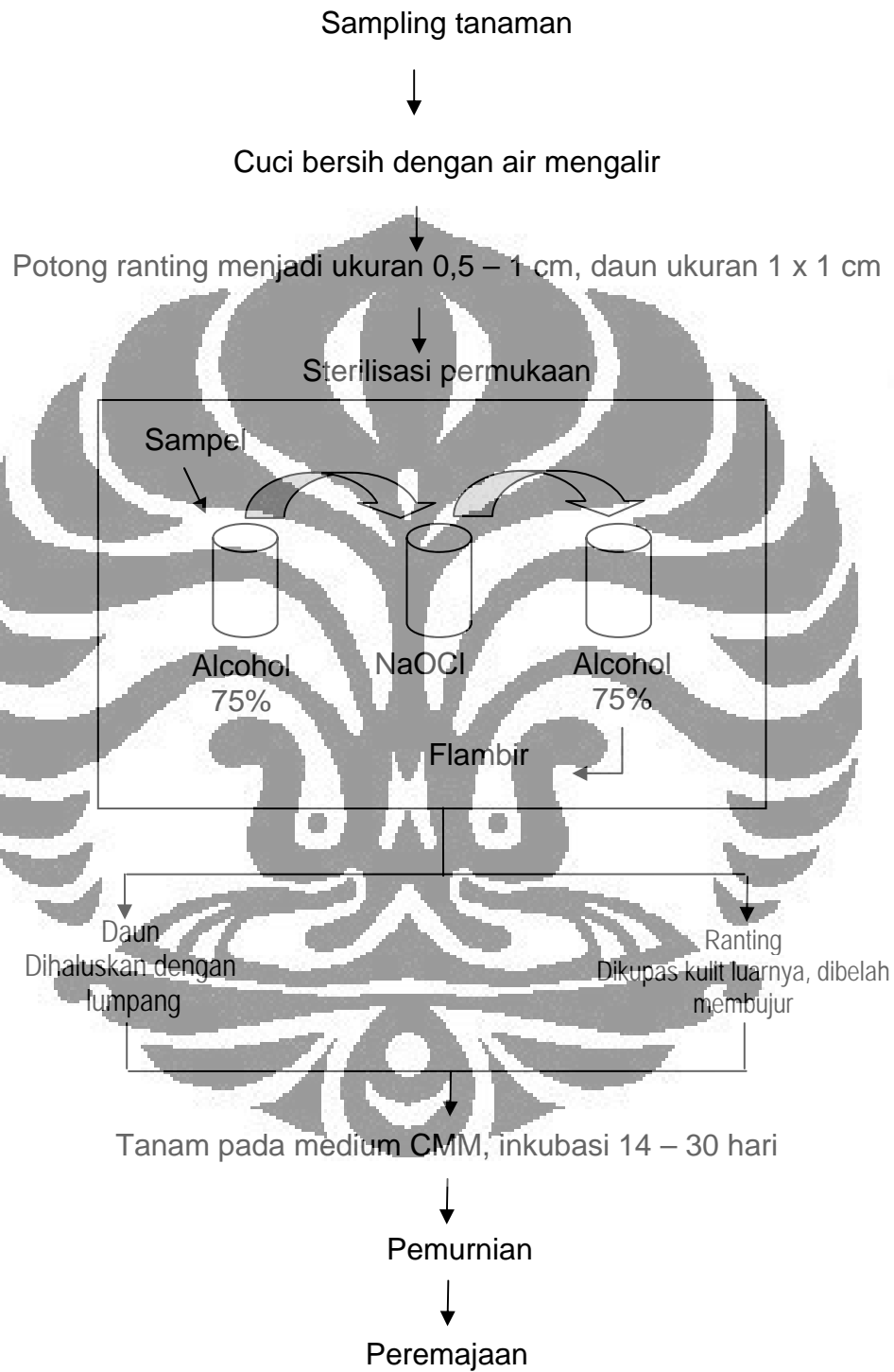
KEPALA
KEPALA BIDANG KONSERVASI EX SITU
KEPALA SUB BIDANG REGISTRASI KOLEKSI

Renita Sari, M.Sc.
NIP. 72006637

Lampiran 2
Bagan Tahapan Penelitian



Lampiran 3 Bagan tahapan isolasi kapang endofit



Lampiran 4

Cara perhitungan IC₅₀

Persentase peredaman terhadap radikal DPPH dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Peredaman} = \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}} \times 100 \%$$

Keterangan:

A blanko = serapan blanko DPPH pada λ maksimum DPPH

A sample = serapan DPPH setelah direaksikan dengan sampel

Nilai IC₅₀ diperoleh dengan membuat persamaan regresi linier antara konsentrasi dengan % peredaman, yaitu: $y = a + bx$

y = % peredaman

x = konsentrasi sampel

Dengan mengganti faktor y dengan nilai 50, diperoleh nilai IC₅₀ (x).

Lampiran 5

Pembuatan suspensi kuman sesuai pengenceran kuman standard Mc. Farland III

