

ISOLASI, IDENTIFIKASI, SKRINING, DAN OPTIMASI KAPANG ENDOFIT
Dendrobium crumenatum Sw. (ANGGREK MERPATI) PENGHASIL
ANTIMIKROORGANISME TERHADAP BAKTERI DAN KHAMIR

Suciatmih
0606002080



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
2008

ISOLASI, IDENTIFIKASI, SKRINING, DAN OPTIMASI KAPANG ENDOFIT
Dendrobium crumenatum Sw. (ANGGREK MERPATI) PENGHASIL
ANTIMIKROORGANISME TERHADAP BAKTERI DAN KHAMIR

T E S I S

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk
Memperoleh gelar Magister Sains**

Oleh:
SUCIATMIH
0606002080



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
2008

JUDUL : ISOLASI, IDENTIFIKASI, SKRINING, DAN OPTIMASI
KAPANG ENDOFIT PENGHASIL ANTIMIKROORGANISME
DARI *Dendrobium crumenatum* Sw. (ANGGREK MERPATI)

Nama : SUCIATMIH

NPM : 0606002080

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Prof. Dr. Indrawati Gandjar
Pembimbing I

Dr. Wibowo Mangunwardoyo M.Sc
Pembimbing II

2. Penguji

Dr. Susiani Purbaningsih DEA
Penguji I

Dr. Nisyawati
Penguji II

**3. Pjs. Ketua Program Studi
Biologi**

**4. Ketua Program Pascasarjana
FMIPA-UI**

Dr. Abinawanto

Dr. Adi Basukriadi M.Sc

Tanggal lulus: 10 Juni 2008

Name : Suciati

Date:

Title : Isolation, identification, screening, and optimization of endophytic moulds of *Dendrobium crumenatum* Sw. (pigeon orchid) producing antimicrobial agent to bacteria and yeast

Thesis Supervisors : Prof. Dr. Indrawati Gandjar
Dr. Wibowo Mangunwardoyo M.Sc

SUMMARY

Endophytic microorganisms live in host plant tissues without causing damages to their hosts. They have been found in orchids, such as *Dendrobium crumenatum* Sw. (pigeon orchid) which is sometimes used in traditional medicine. According to Ren Xiang Tan & Wen Xin Zou (2001), endophytic moulds have a protective role against insect herbivory and many are potential producers of novel antimicrobial agents.

Antimicrobial agents are available from plants, animals, and microorganisms. Among the latter, antimicrobial agents have a broad spectrum of industrial application, since they are more stable compared with plant and animal antimicrobial agent and they can be produced cheaply (Radji 2005).

Production of antimicrobial agents are dependent on several environmental factors such as carbon and nitrogen sources, pH, and temperature (Atlas 1984; Judoamidjojo *et al.* 1992) and O₂

(Suryani *et al.* 2000; Sundaran *et al.* 2001).

This study consists of two parts. Part I is entitled: isolation, identification, and screening of endophytic moulds of *Dendrobium crumenatum* Sw. (pigeon orchid) producing antimicrobial agent to bacteria and yeast. Part II is entitled: Optimization of the antiyeast agent by endophytic *Fusarium nivale* (Fr.) Ces. from *Dendrobium crumenatum* Sw. (pigeon orchid).

The study was carried out at the Laboratory of Microbiology Division, Research Center for Biology, Indonesian Institute of Sciences, Cibinong during May–December 2007.

Isolation of the endophytic moulds from healthy roots, bulbouses, stems, and leaves of *D. crumenatum* were collected from Tanah Baru Housing area, Bogor Botanical Garden, and Herbarium Bogoriense, Bogor (West Java) was carried out using direct planting method on *Potato Dectrose Agar* (PDA) (Nakagiri *et al.* 2005). Identification of the isolates was carried out on PDA based on macroscopic and microscopic morphological observations of the colonies.

Sixty isolates were obtained from a total of 600 sample units collected from the roots, bulbouses, stems, and leaves of *D. crumenatum*. Endophytic moulds which were isolated from *D. crumenatum* were 12 species. Endophytic moulds which were isolated from roots were 6 species, from bulbouses 5 species, from stems 3 species, and from leaves 6 species.

Twelve representative isolates obtained, were identified as *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, 1952, *Cladosporium sphaerospermum* Penzig, 1882, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Sacc., *Colletotrichum* sp., *Curvularia brachyspora* Boedijn, *Fusarium nivale* (Fr.) Ces., 1895, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., 1881, *Guignardia endophyllicola* Okane, Nakagiri, & Ito 2001 (anamorph: *Phyllosticta capitalensis* P. Herm.), *Pestalotiopsis* sp., *Scolecobasidium* sp., *Westerdikella* sp., dan *Xylohypha* sp.

The highest colonization frequency (4.7 %) from *D. crumenatum* was *G. endophyllicola*. The highest colonization frequency of endophytic moulds from roots was *C. cladosporioides* (2,7 %), for bulbouses was *C. gloeosporioides* (6.7 %), for stems was *G. endophyllicola* (1,3 %) and *C. gloeosporioides* (1,3 %), and for leaves was *G. endophyllicola* (17,3 %). *Guignardia endophyllicola* was the dominat endophytic mould species in *D. crumenatum*.

Screening of the 60 isolates for their antimicroorganism activities againt *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 2091, *Candida tropicalis* LIPIMC 203, *Escherichia coli* ATCC 25022, and *Staphylococcus aureus* ATCC 25023 have been carried out with the *Kirby-Bauer* disc technique (Harmita & Radji 2004). The only one isolate of *F. nivales* inhibited *C. albicans* and *C. tropicalis*. All isolates did not inhibit the

growth of *B. subtilis*, *E. coli*, and *S. aureus*.

Fusarium nivale was further studied for its bioactivities against *C. albicans* and *C. tropicalis* with using several media such as *Potato Dextrose Yeast* (PDY), *Tauge Extract Broth* (TEB), *Malt Extract Broth* (MEB), and *Potato Dextrose Broth Pepton* (PDBP); concentration of yeast extract (1 gl⁻¹ N, 2 gl⁻¹ N, and 3 gl⁻¹ N) and potato-dextrose (20 gl⁻¹ C, 24 gl⁻¹ C, and 28 gl⁻¹ C) of PDY medium; pH (4.0, 5.0, 6.0, and 7.0); temperature (25, 30, 35, and 40° C); and agitation (0, 80, 90, and 100 rpm).

The optimum condition to produce the antiyeast agent of *F. nivale* was obtained using PDY medium containing 1 gl⁻¹ yeast extract and 24 gl⁻¹ potato-dextrose, at pH 6,0, temperature 25° C, and agitation of 90 rpm. Lag phase occurred at 0-1 day in which the antiyeast agent was not yet produced and pH decreased from 6.0 to 4.81. The antiyeast agent was produced at the exponential and stationary phases (a growth-associated production phase). The antiyeast agent production coincided with an increase in pH from 4.81 to 7.24-8.39. A maximum activity of the antiyeast agent that inhibited *C. albicans* (2.47 ± 0.12) and *C. tropicalis* (1.68 ± 0.04) was on the 9th day incubation, respectively.

xiv + 105 pp.; 13 append.; 12 plates; 6 tables;

Bibl.; 72 (1935–2007)

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur bagi Allah SWT yang telah berkenan melimpahkan rahmat, karunia, dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis yang berjudul “Isolasi, identifikasi, skrining, dan optimasi kapang endofit *Dendrobium crumenatum* Sw. (anggrek merpati) penghasil antimikroorganisme terhadap bakteri dan khamir” sebagai prasyarat akhir untuk menyelesaikan pendidikan di Program Pascasarjana Biologi, FMIPA-UI.

Penghargaan dan rasa hormat serta ucapan terima kasih sebesar besarnya penulis sampaikan kepada Prof. Dr. Indrawati Gandjar dan Dr. Wibowo Mangunwardoyo M.Sc selaku dosen pembimbing yang telah membimbing dalam penelitian dan penyusunan tesis ini dengan penuh kesabaran. Rasa hormat dan terima kasih penulis sampaikan kepada Dr. Susiani Purbaningsih DEA dan Dr. Nisyawati selaku dosen penguji. Penghargaan dan terima kasih penulis sampaikan kepada seluruh staf pengajar yang telah memberikan bekal ilmu pengetahuan, serta Bapak Tb Aldi Hakim dan seluruh staf sekretariat Program Studi Biologi Pascasarjana-UI yang telah membantu penulis menyangkut keadministrasian.

Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Kepala Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI yang telah memberikan ijin studi

dan penggunaan fasilitas serta sarana penelitian sampai selesai.

Terima kasih kepada suami tercinta Yun Indiarto atas dorongan dan pengertiannya. Untuk teman-teman yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu penelitian maupun penyusunan tesis ini, penulis mengucapkan terima kasih.

Penelitian dan penyusunan tesis ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat membangun sangat diharapkan. Semoga tesis ini berguna dan dapat menambah informasi tentang kapang endofit.

Bogor, 2008

Suciatmih

DAFTAR ISI

	Halaman
SUMMARY	iv
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR SINGKATAN	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
PENGANTAR PARIPURNA	1
MAKALAH I: ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN SKRINING KAPANG ENDOFIT <i>Dendrobium crumenatum</i> Sw. (ANGGREK MERPATI) PENGHASIL ANTIMIKROORGANISME TERHADAP BAKTERI DAN KHAMIR	
Pendahuluan	5
Bahan dan cara kerja	9
Hasil	19
Pembahasan	25
Kesimpulan	32
Daftar acuan	33
MAKALAH II: OPTIMASI PRODUKSI ANTIKHAMIR <i>Fusarium nivale</i> (Fr.) Ces. dari <i>Dendrobium crumenatum</i> Sw. (ANGGREK MERPATI)	
Pendahuluan	53
Bahan dan cara kerja	56
Hasil	68
Pembahasan	76
Kesimpulan	88
Daftar acuan	89
DISKUSI PARIPURNA	95
RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN	101
DAFTAR ACUAN	103

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar I.1. Frekuensi kolonisasi kapang endofit pada <i>D. crumenatum</i>	20
Gambar I.2. Frekuensi kolonisasi kapang endofit pada akar <i>D. crumenatum</i>	21
Gambar I.3. Frekuensi kolonisasi kapang endofit pada umbi semu <i>D. crumenatum</i>	22
Gambar I.4. Frekuensi kolonisasi kapang endofit pada batang <i>D. crumenatum</i>	23
Gambar I.5. Frekuensi kolonisasi kapang endofit pada daun <i>D. crumenatum</i>	24
Gambar II.1. Kurva perubahan pH medium, biomassa, dan indeks antikhmir <i>F. nivale</i> terhadap <i>C. albicans</i> dan <i>C. tropicalis</i> , pada waktu inkubasi 12 hari	75
Gambar II.2. Daerah hambatan pertumbuhan pada <i>C. albicans</i> dan <i>C. tropicalis</i> ; (A, B, & C) antikhmir <i>F. nivale</i> (50 µl/kertas cakram); (E) kontrol negatif; (D) kontrol positif (nistatin 100 µg/kertas cakram)	86

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel II.1. Pengaruh antara media dan khamir <i>Candida</i> terhadap indeks antikhamir <i>F. nivale</i>	69
Tabel II.2. Pengaruh antara konsentrasi sumber N dan sumber C medium PDY, serta khamir <i>Candida</i> terhadap indeks antikhamir <i>F. nivale</i>	71
Tabel II.3. Pengaruh antara pH medium dan khamir <i>Candida</i> terhadap indeks antikhamir <i>F. nivale</i>	72
Tabel II.4. Pengaruh antara suhu medium dan khamir <i>Candida</i> terhadap indeks antikhamir <i>F. nivale</i>	73
Tabel II.5. Pengaruh antara agitasi medium dan khamir <i>Candida</i> terhadap indeks antikhamir <i>F. nivale</i>	74
Tabel II.6. Korelasi antara pH medium dan indeks antikhamir, antara pH medium dan biomassa sel, dan antara biomassa sel dan indeks antikhamir.	76

DAFTAR SINGKATAN

ATCC : American Type Culture Collection

LIPIMC : Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Culture Collection

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran I.1. <i>Dendrobium crumenatum</i> Sw. (anggrek merpati)	40
Lampiran I.2. Frekuensi kolonisasi spesies kapang endofit total dan pada akar <i>D. crumenatum</i>	41
Lampiran I.3. Frekuensi kolonisasi spesies kapang endofit pada umbi semu, batang, dan daun <i>D. crumenatum</i>	42
Lampiran I.4. (a) konidia <i>Cladosporium cladosporioides</i> ; (b) konidia <i>Cladosporium sphaerospermum</i> ; (c & d) konidia & apresoria <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ; (e & f) konidia & apresoria <i>Colletotrichum</i> sp. (1000 X)	43
Lampiran I.5. (g) konidia <i>Curvularia brachyspora</i> ; (h) konidia <i>Fusarium nivale</i> ; (i) konidia <i>Fusarium solani</i> ; (j) konidia <i>Pestalotiopsis</i> sp.; (k) konidia <i>Scolecobasidium</i> sp. (l) konidia <i>Xylohypha</i> sp. (1000 X)	44
Lampiran I.6. (m & n) konidia & spermatia <i>Phyllosticta capitalensis</i> ; (o & p) askomata, askus & askospora <i>Guignardia endophyllicola</i> ; (q & r) askomata & askospora <i>Westerdikella</i> sp. (1000 X)	45
Lampiran I.7. (a) <i>Cladosporium cladosporioides</i> ; (b) <i>Cladosporium sphaerospermum</i> ; (c) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .	46
Lampiran I.8. (d) <i>Colletotrichum</i> sp.; (e) <i>Curvularia brachyspora</i> ; (f) <i>Fusarium nivale</i>	47
Lampiran I.9. (g) <i>Fusarium solani</i> ; (h) <i>Guignardia endophyllicola</i> ; (i) <i>Pestalotiopsis</i> sp.	48
Lampiran I.10. (j) <i>Scolecobasidium</i> sp.; (k) <i>Westerdikella</i> sp.; (l) <i>Xylohypha</i> sp.	49

	Halaman
Lampiran I.11. Data pengamatan makroskopis kapang endofit dari <i>D. crumenatum</i> .	50
Lampiran I.12. Data pengamatan mikroskopis kapang endofit dari <i>D. crumenatum</i> .	51
Lampiran I.13. Skrining kapang endofit penghasil antimikroorganisme terhadap bakteri dan khamir	52





PENGANTAR PARIPURNA

Penyakit infeksi masih merupakan salah satu tantangan besar yang harus dihadapi Indonesia dan negara-negara berkembang lainnya. Penyakit infeksi yang mengalami peningkatan cukup tinggi adalah diare, keputihan, dan bronkhitis. Setiap tahun angka morbiditas dan mortalitas semakin tinggi, akan tetapi cara pengobatan penyakit infeksi tersebut menggunakan antibiotik baik secara tunggal maupun campuran kurang berhasil. Penggunaan antibiotik yang tidak terkontrol berakibat terjadinya resistensi mikroorganisme patogen terhadap obat tersebut.

Lima tahun terakhir ini, antibiotik masih merupakan bahan impor dan mahal harganya, sehingga perlu diusahakan pengobatan penyakit infeksi dengan bahan lokal yang lebih murah. Bahan alam, seperti tumbuhan telah lama digunakan sebagai upaya pengobatan maupun menjaga kondisi tubuh. Bahan alam tersebut bahkan telah diteliti kandungan dan manfaatnya bagi kesehatan (Windono & Sutarjadi 2002; Praptiwi 2007).

Penggunaan bahan alam sebagai sumber bahan aktif mengalami beberapa kendala. Pertama, bahan alam sangat kompleks sifatnya, sehingga membuat optimasi penggunaannya melalui modifikasi kimia menjadi sangat kompleks pula. Kedua, sumber bahan aktif dari sumber biologis sulit didapatkan secara berkesinambungan. Ketiga, informasi budidaya belum banyak, sehingga cenderung menggunakan bahan dari alam yang dikhawatirkan akan terjadi kemusnahan (Radji 2005).

Upaya untuk memanfaatkan bahan alam harus seiring dengan menjaga kelestariannya. Usaha tersebut dapat dicapai antara lain dengan memanfaatkan mikroorganisme endofit yang hidup dalam jaringan bahan alam tersebut. Bacon *et al.* (2001) melaporkan bahwa mikroorganisme endofit adalah mikroorganisme yang sekurang-kurangnya selama periode tertentu dari siklus hidupnya mengolonisasi jaringan tumbuhan tanpa menimbulkan gejala penyakit atau kerusakan apa pun pada tumbuhan. Kapang endofit merupakan salah satu mikroorganisme yang unik, karena tumbuh di dalam jaringan yang berbeda antara tumbuhan yang satu dan tumbuhan lainnya. Ren Xiang Tan & Wen Xin Zou (2001) menginformasikan bahwa setiap tumbuhan tingkat tinggi mengandung beberapa mikroorganisme endofit yang mampu menghasilkan metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik dari tumbuhan inangnya ke dalam mikroorganisme endofit. Kekayaan dan keanekaragaman tumbuhan tropis, termasuk *Dendrobium crumenatum* Sw. (anggrek merpati) yang ada di Indonesia, dapat menggambarkan keanekaragaman kapang endofit.

Tanaman anggrek sudah lama dikenal mempunyai khasiat obat. Anggrek yang berkhasiat obat biasanya mengandung fenantren, alkaloid, dan steroid. Burkill (1935) melaporkan bahwa orang Melayu dan Jawa pada umumnya menggunakan air perasan umbi semu (*bulbous*) anggrek merpati untuk obat tetes telinga, sedangkan tumbuhan daunnya untuk mengobati bisul atau borok dan jerawat. Simanjuntak *et al.* (2002) menginformasikan bahwa tanaman obat tradisional Indonesia kemungkinan besar memiliki

mikroorganisme endofit berpotensi yang tumbuh secara simbiotik di dalamnya dan diyakini mampu menjadi sumber senyawa bioaktif yang potensial sebagai obat-obatan. Radji (2005) melaporkan bahwa secara komersial, mikroorganisme merupakan sumber terbaik penghasil metabolit sekunder. Selain karena sumbernya beragam, metabolit asal mikroorganisme dapat diproduksi dalam jumlah besar, waktu yang singkat, dan biaya produksi yang lebih murah.

Sebagai langkah awal pencarian sumber bioaktif baru, dilakukan isolasi kapang endofit pada akar, umbi semu, batang, dan daun anggrek merpati yang dikoleksi dari Perumahan Tanah Baru, Kebun Raya Bogor, dan Herbarium Bogoriense, Bogor. Metode isolasi yang digunakan adalah *direct planting*, yaitu meletakkan jaringan tumbuhan di atas permukaan agar dalam cawan petri (Nakagiri *et al.* 2005), sedangkan teknik fermentasi terendam (*submerged*) dalam media cair digunakan untuk memproduksi senyawa antimikroorganisme kapang tersebut (Judoamidjojo *et al.* 1992).

Filtrat hasil fermentasi kapang endofit diuji aktivitasnya terhadap bakteri Gram-positif *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, bakteri Gram-negatif *Escherichia coli* ATCC 25922, khamir *Candida albicans* ATCC 2091 dan *Candida tropicalis* LIPIMC 203 yang merupakan penyebab umum berbagai penyakit infeksi (Madigan *et al.* 2003). Penentuan aktivitas antimikroorganisme kapang endofit terhadap bakteri dan khamir uji menggunakan teknik kertas cakram *Kirby-Bauer* (Harmita & Radji 2004),

sedangkan parameter yang diamati adalah indeks antimikroorganisme (Sudiana *et al.* 2001).

Fermentasi dalam media cair merupakan salah satu cara untuk memproduksi antimikroorganisme kapang endofit. Akan tetapi dalam pengembangannya masih ada kendala, yaitu rendahnya produksi antimikroorganisme tersebut. Upaya untuk meningkatkan produksi antimikroorganisme kapang endofit dilakukan dengan memanipulasi lingkungan hidupnya, seperti sumber karbon, sumber nitrogen, suhu, dan pH (Atlas 1984; Judoamidjojo *et al.* 1992), serta O₂ (Suryani *et al.* 2000; Sundaran *et al.* 2001).

Penelitian terdiri atas dua bagian yang hasilnya dilaporkan dalam dua makalah, yaitu:

Makalah I: Isolasi, identifikasi, dan skrining kapang endofit

Dendrobium crumenatum Sw. (anggrek merpati) penghasil antimikroorganisme terhadap bakteri dan khamir

Makalah II: Optimasi produksi antikhamir kapang endofit

Fusarium nivale (Fr.) Ces. yang diisolasi dari *Dendrobium crumenatum* Sw. (anggrek merpati)

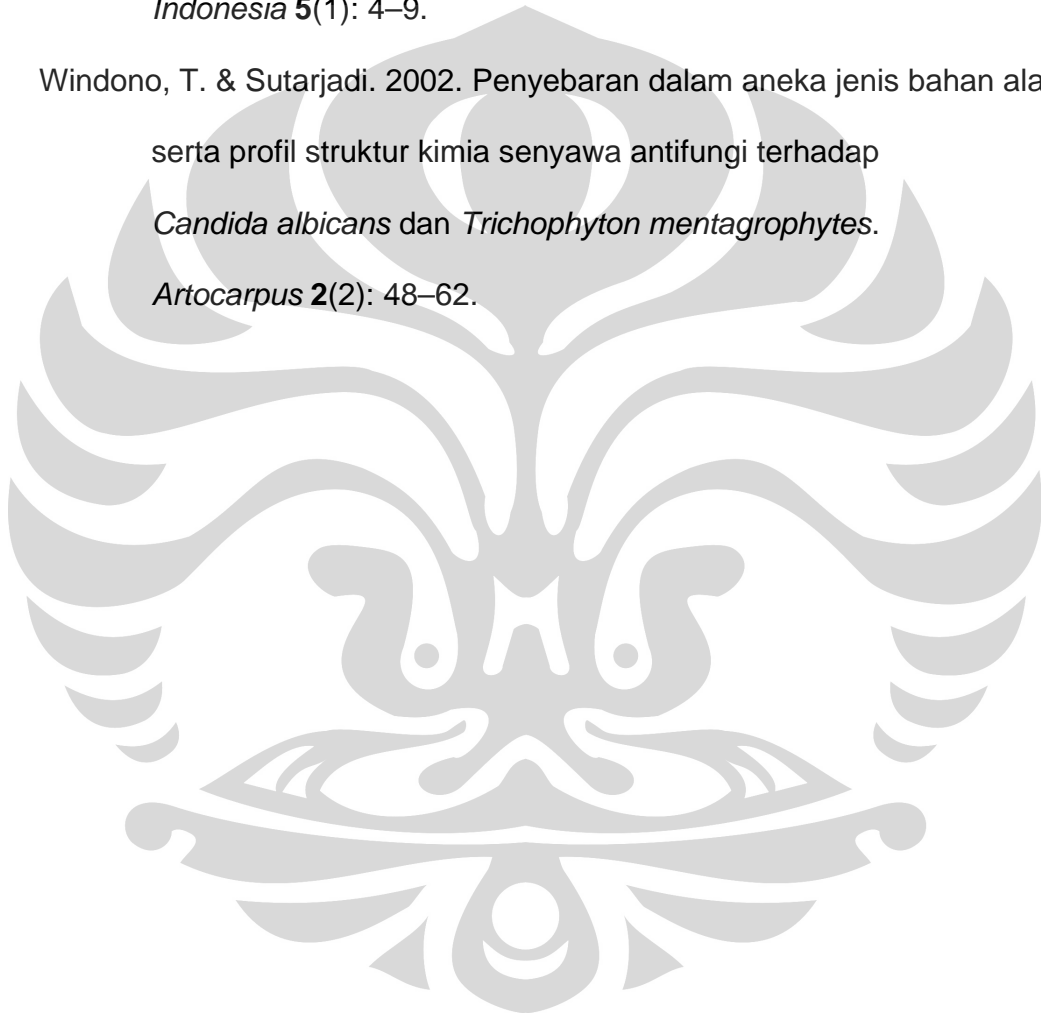
DAFTAR ACUAN

- Atlas, R.M. 1984. *Microbiology: Fundamental and application*. Macmillan Publishing Company, New York: xxi + 879 hlm.
- Bacon, C.W., I.E. Yates, D.M. Hinton, & F. Meredith. 2001. The potential impact of climate variability and change on air pollution-related health effects in the United States. *Environmental Health Perspectives* **109**(suppl.2): 325–332.
- Burkill, I.H. 1935. *A Dictionary of the economic products of the Malay Peninsula*. Millbank, London: xii + 346 hlm.
- Harmita & M. Radji. 2004. *Buku ajar analisis hayati*. Departemen Farmasi FMIPA, UI: 149 hlm.
- Hua Wei Zhang, Y. C. Song, & R. X. Tan. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports* **23**: 753–771.
- Judoamidjojo, M., A.A. Darwis, & E.G. Said. 1992. *Teknologi fermentasi*. CV Rajawali, Jakarta: viii + 333 hlm.
- Lodge, D.J., P.J. Fisher, & B.C. Sutton. 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia* **88**(5): 733–738.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, & J. Parker. 2003. *Broock biology of microorganism*. 9th ed., Prentice Hall International Inc., New Jersey: xxv + 1019 hlm.

- Nakagiri, A., I. Okane, T. Ito, K. Kramadibrata, Suciati, & A. Retnowati. 2005. A Guidebook to identification of fungi inhabiting mangrove and surrounding area in Indonesia. A Report of GTI pilot study on fungal taxonomy: 149 hlm.
- Praptiwi. 2007. Uji aktivitas antibakteri dan sitotoksik ekstrak metanol *Aglaia silvestris* (M. Roemer) Merr. *Biota* **12**(1): 23–27.
- Radji, M. 2005. Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian* **2**(3): 113–126.
- Ren XiangTan & Wen Xin Zou. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*. **18**: 448–459.
- Simanjuntak, P., T. Parwati, Bustanussalam, T. K. Prana, S. Wibowo, & H. Shibuya. 2002. Isolasi dan kultivasi mikrob endofit penghasil senyawa alkaloid kinkona dari *Cinchona* spp. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* **7**(2): 27–30.
- Sudiana, I.M., R.D. Rahayu, H. Imanuddin, & M. Rahmansyah. 2001. Cellulolytic bacteria of soil of Gunung Halimun National Park. Edisi Khusus. *Biodiversitas Taman Nasional Gunung Halimun, Berita Biologi* **5**(6): 703–709.
- Sundaran, B., Y.U.B. Rao, & R. Boopathy. 2001. Process optimization for enhanced production of diphtheria toxin by submerged cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **91**(2): 123–133.

Suryani, A., A. Ismayana, Y. Sutrisna, & Y.R. Pyun. 2000. Kajian teknik kultivasi dan pengaruh luas permukaan media tumbuh pada produksi selulosa menggunakan bakteri isolat lokal. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* **5**(1): 4–9.

Windono, T. & Sutarjadi. 2002. Penyebaran dalam aneka jenis bahan alami serta profil struktur kimia senyawa antifungi terhadap *Candida albicans* dan *Trichophyton mentagrophytes*. *Artocarpus* **2**(2): 48–62.



DISKUSI PARIPURNA

Selain sebagai tanaman obat yang berbunga cantik dan harum, *Dendrobium crumenatum* Sw. (anggrek merpati) dapat menjadi inang kapang endofit. Enam puluh isolat kapang endofit yang terdiri dari 12 spesies yang termasuk dalam 9 genera, berhasil diisolasi dengan metode *direct planting* (Nakagiri *et al.* 2005) dari anggrek merpati yang dikoleksi dari Perumahan Tanah Baru, Kebun Raya Bogor, dan Herbarium Bogoriense, Bogor.

Dua spesies kapang endofit, seperti *Guignardia endophyllicola* Okane, Nakagiri, & Ito 2001 (anamorf: *Phyllosticta capitalensis* P. Herm.) dan *Westerdikella* sp. termasuk dalam Ascomycotina; 10 spesies, yaitu *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, 1952, *Cladosporium sphaerospermum* Penzig, 1882, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Sacc., *Colletotrichum* sp., *Curvularia brachyspora* Boedijn, *Fusarium nivale* (Fr.) Ces., 1895, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., 1881, *Pestalotiopsis* sp., *Scolecobasidium* sp., dan *Xylohypha* sp. termasuk dalam *Mitosporic Fungi*. Selain *Westerdikella* sp., *Scolecobasidium* sp., dan *Xylohypha* sp., kapang lainnya merupakan kapang yang umum dan telah banyak dilaporkan (Lodge *et al.* 1996; Nakagiri *et al.* 2005; Hua Wei Zhang *et al.* 2006). *Westerdikella* sp., *Scolecobasidium* sp., dan *Xylohypha* sp. merupakan informasi baru sebagai kapang endofit pada anggrek merpati.

Spesies, frekuensi kolonisasi, dan dominasi kapang endofit yang diisolasi dari aneka organ anggrek merpati yang berbeda, menunjukkan perbedaan. Kapang endofit yang diisolasi dari akar 6 spesies, dari daun 6 spesies, dari umbi semu 5 spesies, dan dari batang anggrek merpati 3 spesies.

Frekuensi kolonisasi (4,7 %) kapang endofit tertinggi dari anggrek merpati adalah *G. endophyllicola*. Frekuensi kolonisasi (2,7 %) kapang endofit tertinggi yang diisolasi pada akar adalah *C. cladosporioides*, untuk umbi semu *C. gloeosporioides* (6,0 %), untuk batang *C. gloeosporioides* dan *G. endophyllicola*, yaitu masing-masing (1,3 %), dan untuk daun anggrek merpati *G. endophyllicola* (17,3 %). Hasil menunjukkan *G. endophyllicola* adalah kapang endofit dominan pada anggrek merpati. Kapang tersebut dijumpai baik tingkat anamorf maupun tingkat teleomorfnya.

Skrining ke-60 isolat kapang endofit dari anggrek merpati dengan medium fermentasi cair (Judoamidjojo *et al.* 1992), telah diinformasikan dalam makalah I. Skrining menggunakan medium fermentasi *Potato Dextrose Yeast* (PDY) yang mengandung 2 gl⁻¹ *Yeast Extract* (YE) sebagai sumber N, 24 gl⁻¹ kentang-dekstrosa sebagai sumber C, dan 0,5 gl⁻¹ CaCO₃ sebagai bufer. Data yang diperoleh menunjukkan bahwa hanya 1 isolat, yaitu *F. nivale* dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans* dan *Candida tropicalis*. Selain itu, semua isolat kapang endofit tidak menghambat pertumbuhan bakteri Gram-negatif *Escherichia coli* dan Gram-positif *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*.

Fusarium nivale yang menunjukkan antikhmir terhadap *C. albicans* dan *C. tropicalis* diuji pada tahap berikutnya. Empat media fermentasi, yaitu PDY, *Tauge Extract Broth* (TEB), *Malt Extract Broth* (MEB), dan *Potato Dextrose Broth Peptone* (PDBP), serta dua khamir *Candida* diuji terhadap antikhmir. Interaksi antara medium PDY dan *C. albicans* menghasilkan indeks antikhmir tertinggi ($2,30 \pm 0,11$) yang berbeda sangat nyata dengan interaksi lainnya.

Medium PDY yang menghasilkan indeks antikhmir tertinggi diuji lebih lanjut dengan khamir *Candida*. Tiga konsentrasi YE sebagai sumber N (1 gl^{-1} , 2 gl^{-1} , dan 3 gl^{-1}), tiga konsentrasi kentang-dekstrosa sebagai sumber C (20 gl^{-1} , 24 gl^{-1} , dan 28 gl^{-1}), serta dua khamir *Candida* diuji terhadap antikhmir. Interaksi antara medium PDY (1 gl^{-1} YE sebagai sumber N dan 24 gl^{-1} kentang-dekstrosa sebagai sumber C), dan *C. albicans* menghasilkan indeks antikhmir tertinggi ($2,20 \pm 0,25$).

Medium PDY (1 gl^{-1} YE sebagai sumber N dan 24 gl^{-1} kentang-dekstrosa sebagai sumber C) yang menghasilkan indeks antikhmir tertinggi diuji lebih lanjut dengan khamir *Candida*. Empat pH medium, yaitu 4,0, 5,0, 6,0, dan 7,0, serta dua khamir *Candida* diuji terhadap antikhmir. Interaksi antara medium PDY (1 gl^{-1} YE sebagai sumber N dan 24 gl^{-1} kentang-dekstrosa sebagai sumber C) pada pH 6,0, dan *C. albicans* menghasilkan indeks antikhmir tertinggi ($2,12 \pm 0,12$).

Medium PDY (1 gl⁻¹ YE sebagai sumber N dan 24 gl⁻¹ kentang-dekstrosa sebagai sumber C) pada pH 6,0 yang menghasilkan indeks antikhamir tertinggi diuji lebih lanjut dengan khamir *Candida*. Empat suhu medium, yaitu 25, 30, 35, dan 40° C, serta dua khamir *Candida* diuji terhadap antikhamir. Interaksi antara medium PDY (1 gl⁻¹ YE sebagai sumber N dan 24 gl⁻¹ kentang-dekstrosa sebagai sumber C) pada pH 6,0 dan suhu 25° C, serta *C. albicans* menghasilkan indeks antikhamir tertinggi (2,30 ± 0,06) yang berbeda sangat nyata dengan interaksi lainnya.

Medium PDY (1 gl⁻¹ YE sebagai sumber N dan 24 gl⁻¹ kentang-dekstrosa sebagai sumber C) pada pH 6,0 dan suhu 25° C yang menghasilkan indeks antikhamir tertinggi diuji lebih lanjut dengan khamir *Candida*. Empat agitasi medium, yaitu 0, 80, 90, dan 100 rpm, serta dua khamir *Candida* diuji terhadap antikhamir. Kecuali dengan interaksi antara agitasi medium 100 rpm dan *C. albicans*, interaksi antara agitasi medium PDY 90 rpm (1 gl⁻¹ YE sebagai sumber N dan 24 gl⁻¹ kentang-dekstrosa sebagai sumber C) pada pH 6,0 dan suhu 25° C, dan *C. albicans* menghasilkan indeks antikhamir tertinggi (2,30 ± 0,04) yang berbeda sangat nyata dari interaksi lainnya.

Data optimasi medium untuk produksi antikhamir (medium PDY yang mengandung 1 gl⁻¹ YE sebagai sumber N dan 24 gl⁻¹ kentang-dekstrosa sebagai sumber C pada pH 6,0, suhu 25° C, dan agitasi 90 rpm) digunakan untuk membuat kurva produksi dan pertumbuhan *F. nivale*. Indeks antikhamir

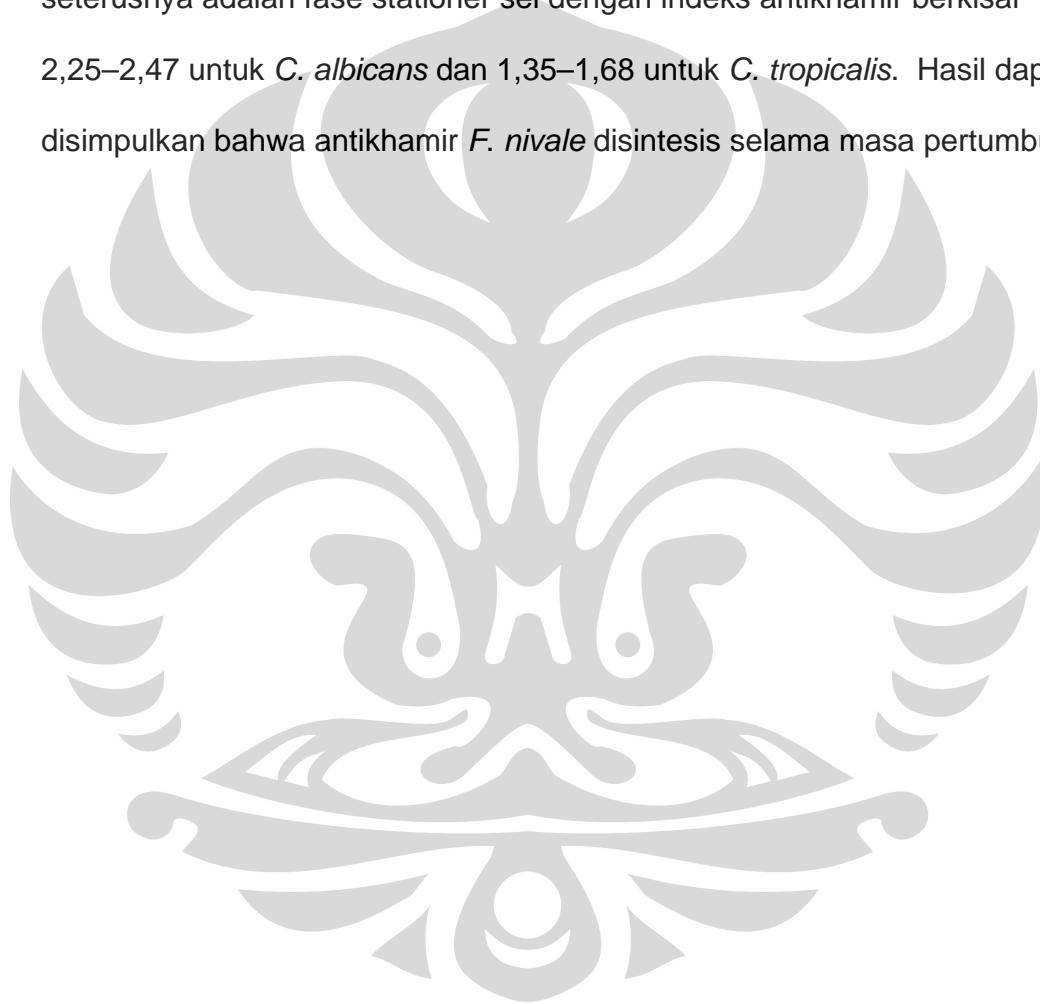
tertinggi terhadap *C. albicans* ($2,47 \pm 0,12$) dan *C. tropicalis* ($1,65 \pm 0,08$) dihasilkan masing-masing pada waktu inkubasi 9 hari.

Korelasi yang sangat nyata antara perubahan pH medium dan indeks antikhmir, baik terhadap *C. albicans* ($Y = 0,704 X - 3,49$; $r^2 = 0,81$) maupun *C. tropicalis* ($Y = 0,49 X - 2,43$; $r^2 = 0,78$) menunjukkan adanya peranan perubahan pH medium terhadap indeks antikhmir. Perubahan pH dimulai pada hari ke-0 sampai ke-1, yaitu terjadi penurunan pH medium menjadi 4,66–4,96 dari pH awal 6,0. Penurunan pH medium bersamaan dengan indeks antikhmir belum dihasilkan. Hari ke-1 sampai ke-4 mulai terjadi kenaikan pH medium kembali menjadi pH 7,48–7,85. Kenaikan pH medium bersamaan dengan indeks antikhmir sudah dihasilkan, yaitu 1,93–2,25 (*C. albicans*) dan 1,41–1,64 (*C. tropicalis*). Hari ke-4 dan seterusnya kenaikan pH berkisar 7,24–8,39, sedangkan indeks antikhmir berkisar 2,0–2,47 (*C. albicans*) dan 1,35–1,68 (*C. tropicalis*).

Adanya korelasi yang sangat nyata antara perubahan pH medium dan berat biomassa *F. nivale* ($Y = 0,06 X - 0,27$; $r^2 = 0,76$) menunjukkan peranan perubahan pH medium terhadap berat biomassa kapang. Penurunan pH 4,81 dari pH awal 6,0 terjadi pada fase lag sel, yaitu hari ke-0 sampai ke-1. Hari ke-1 dan seterusnya terjadi kenaikan pH medium (7,85–8,39). Kenaikan pH medium terjadi baik pada fase eksponensial maupun fase stationer sel.

Korelasi yang sangat nyata antara berat biomassa *F. nivale* dan indeks antikhmir baik terhadap *C. albicans* ($Y = 9,77 X - 0,16$; $r^2 = 0,80$) maupun *C. tropicalis* ($Y = 6,75 X - 0,07$; $r^2 = 0,76$) menunjukkan peranan

berat biomassa kapang terhadap indeks antikhamir. Indeks antikhamir belum dihasilkan (0) pada fase lag sel (hari ke-0 sampai ke-1). Hari ke-1 sampai hari ke-4, yaitu fase eksponensial sel, indeks antikhamir sudah dihasilkan, yaitu 1,93–2,25 untuk *C. albicans* dan 1,41–64 untuk *C. tropicalis*. Hari ke-4 dan seterusnya adalah fase stationer sel dengan indeks antikhamir berkisar 2,25–2,47 untuk *C. albicans* dan 1,35–1,68 untuk *C. tropicalis*. Hasil dapat disimpulkan bahwa antikhamir *F. nivale* disintesis selama masa pertumbuhan.





Lampiran I.1. *Dendrobium crumenatum* Sw. (angrek merpati)

Makalah I

ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN SKRINING KAPANG ENDOFIT *Dendrobium crumenatum* Sw. (ANGGREK MERPATI) PENGHASIL ANTIMIKROORGANISME TERHADAP BAKTERI DAN KHAMIR

Suciatmih

ABSTRACT

Endophytic microorganisms are found in orchid such as *Dendrobium crumenatum* Sw. (pigeon orchid), an orchid sometimes used in traditional medicine. Moulds were isolated from roots, bulbouses, stems, and leaves of *D. crumenatum* collected from Tanah Baru Housing area, Botanical Garden Bogor, and Herbarium Bogoriense, respectively. Twelve species were identified from 60 isolates obtained. *Guignardia endophyllicola* Okane, Nakagiri, & Ito (anamorph: *Phyllosticta capitalensis* P. Herm.) was the dominant endophytic mould. Screening of the antimicroorganism activity of the isolates proved that *Fusarium nivale* (Fr.) Ces. inhibited *Candida albicans* ATCC 2091 and *Candida tropicalis* LIPIMC 203. All isolates did not inhibit the growth of *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25022, and *Staphylococcus aureus* ATCC 25023.

Key words: antimicrobial activity, *B. subtilis*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, crude filtrate, *D. crumenatum*, endophytic mould, *E. coli*, screening, *S. aureus*

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi di Indonesia masih mengkhawatirkan kehidupan masyarakat. Salah satu penyebabnya adalah semakin meluasnya resistensi mikroorganisme terhadap obat-obatan yang ada. Keadaan tersebut mendorong upaya penggalian sumber obat-obatan antimikroorganisme yang baru. Kapang endofit mempunyai potensi untuk dikembangkan lebih lanjut pada pengobatan penyakit infeksi, seperti diare, keputihan, dan bronkhitis.

Kapang endofit adalah kapang yang terdapat di dalam tumbuhan. Kapang tersebut dapat dijumpai di berbagai jaringan dalam akar, batang, daun, bunga, buah, dan biji, tanpa menimbulkan gejala penyakit atau kerusakan apa pun pada tumbuhan inangnya. Hua Wei Zhang *et al.* (2006) melaporkan bahwa kapang tersebut mengkolonisasi tumbuhan sehat pada jaringan tertentu dan mampu menghasilkan mikotoksin, enzim, antibiotik, dan metabolit sekunder lainnya, termasuk zat antikanker.

Petrini (1986) menggolongkan kapang endofit dalam kelompok Ascomycotina, Basidiomycotina, Deuteromycotina, dan Oomycotina, meliputi genera *Cladosporium* (Okane *et al.* 1998; Mahesh *et al.* 2005; Rubini *et al.* 2005), *Colletotrichum* (Bayman *et al.* 1997; Okane *et al.* 1998; Cannon & Simmons 2002; Rubini *et al.* 2005), *Curvularia* (Mahesh *et al.* 2005; Nakagiri *et al.* 2005), *Diaporthe* (Agusta *et al.* 2005; Rubini *et al.* 2005; Shibuya *et al.* 2005; Agusta *et al.* 2006), *Fusarium* (Bacon *et al.* 2001; Mahesh *et al.* 2005; Rubini *et al.* 2005; Agusta *et al.* 2006), *Gibberella* (Rubini *et al.* 2005), *Guignardia* (Okane *et al.* 1998), *Nectria* dan *Pleurotus* (Rubini *et al.* 2005), *Pestalotiopsis* (Okane *et al.* 1998; Cannon & Simmons 2002; Mahesh *et al.* 2005; Rubini *et al.* 2005), *Phoma* (Bayman *et al.* 1997; Okane *et al.* 1998; Mahesh *et al.* 2005), *Phomopsis* (Okane *et al.* 1998; Cannon & Simmons 2002; Rubini *et al.* 2005), *Phyllosticta* (Okane *et al.* 2001; Mahesh *et al.* 2005), dan *Xylaria* (Okane *et al.* 1998; Rubini *et al.* 2005).

Petrini (1986) menginformasikan bahwa ada kemungkinan semua tumbuhan menjadi inang kapang endofit, termasuk anggrek. Kapang endofit *Rhizoctonia* sp. dan *Xylaria* spp. diisolasi dari daun dan akar anggrek dari spesies *Lepanthes* (Bayman *et al.* 1997); *Rhizoctonia* spp. pada akar anggrek *Anoectochilus formosanus* Hayata dan *Haemaria discolor* var. *dawsoniana* (Ling Chin Chou & Chi Ning Chang 2004); *Phyllostictina pyriformis* Cash & Watson (syn. *Phyllosticta capitalensis* P. Hrn.) pada anggrek *Cypripedium* sp., *Arundina graminifolia* (Don) Hochr. dan *Dendrobium moniliforme* (L.) Sw. (Okane *et al.* 2003).

Anggrek selain merupakan tanaman yang mempunyai nilai ekonomi cukup baik juga sudah lama dikenal mempunyai khasiat obat. Di Cina, Mongolia, dan Jepang, umbi semu (*pseudo bulbous*) anggrek *Bletilla striata* Reichg. Fil. digunakan untuk mengobati tuberkulosis, pendarahan dan luka pada kaki dan tangan, serta luka pada usus dua belas jari; batang *Dendrobium nobile* Lindley digunakan untuk mengurangi rasa haus dan kekeringan di mulut, mengurangi kegelisahan, dan mempercepat kesembuhan setelah mengalami sakit; dan rizoma, umbi semu, serta batang *Gastrodia elata* Blume sebagai obat sakit kepala, epilepsi, rematik, dan demam (Kong Jin Ming *et al.* 2003). Peneliti yang sama melaporkan bahwa di Amerika, suku Indian, sudah banyak memanfaatkan anggrek *Dichaea muricata* Blume sebagai obat infeksi pada mata; umbi semu *Epidendrum* sp. sebagai obat luka; dan batang

Eriopsis sceptrum (Sw.) Lindley sebagai obat luka pada gusi dan selaput kelenjar pada membran mulut. Ling Chin Chou & Chi Ning Chang (2004) menginformasikan bahwa anggrek *A. formosanus* dan *H. discolor* var. *dawsoniana* dapat melindungi hati, mencegah kanker, mengobati penyakit kardiovaskular, dan menurunkan gula darah pada penderita diabetes. Burkill (1935) melaporkan bahwa orang Melayu dan Jawa pada umumnya menggunakan air perasan umbi semu *D. crumenatum* Sw. (anggrek merpati) (Lampiran I.1) untuk obat tetes telinga. Selain itu, mereka mengobati bisul atau borok dan jerawat dengan tumbukan daun anggrek tersebut.

Anggrek yang berkhasiat obat biasanya mengandung alkaloid dan steroid. Alkaloid *dendrobine* dan *nobilonine* telah diisolasi dari *D. nobile* dan *D. findleyanum* Parr; alkaloid *crepidine* diisolasi dari *D. crepidatum* Lindley (Arditti 1992). *Stigmastane steroid glycoside* telah diisolasi dari *D. ochreatum* Lindley (Arditti 1992).

Tujuan penelitian adalah mengisolasi kapang endofit pada akar, umbi semu, batang, dan daun anggrek merpati yang akan diuji antimikroorganismenya terhadap khamir *Candida albicans* ATCC 2091 dan *Candida tropicalis* LIPIMC 203, bakteri Gram-negatif *Escherichia coli* ATCC 25922, dan Gram-positif *Bacillus subtilis* ATCC 6633 serta *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei–Desember 2007 di Laboratorium Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong.

BAHAN

Tanaman

Akar, umbi semu, batang, dan daun anggrek merpati diperoleh dari Perumahan Tanah Baru, Herbarium Bogoriense, dan Kebun Raya Bogor.

Mikroorganisme

Mikroorganisme yang diuji potensinya yang menghasilkan antimikroorganisme adalah kapang endofit yang diisolasi dari anggrek merpati. Biakan pengujian *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, dan *C. albicans* ATCC 2091 dari Laboratorium Mikrobiologi Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional, Badan POM; serta *C. tropicalis* LIPIMC 203 dari Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah pemutih (Johnson), laktofenol (Merck), laktofenol biru (Merck), kloramfenikol (Oxoid), nistatin (Oxoid), minyak imersi, alkohol 70 %, spirtus bakar, *Yeast Extract* (YE) (Oxoid), CaCO_3 (Oxoid), *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Oxoid), *Potato Dextrose Broth* (PDB) (Oxoid), dan *Mueller Hinton* (MH) (Oxoid).

ALAT

Peralatan yang digunakan dalam penelitian meliputi: mikropipet (Eppendorf), *laminar air flow cabinet* (Holten), timbangan digital (Ohaus), inkubator (Memmert), oven listrik (Memmert), autoklaf (Hirayama), vortex (Fisher Scientific), jangka sorong, pH meter (Toink), *shaker incubator* (Certomat HK), dan sentrifuse (Kubota).

CARA KERJA

Medium isolasi

Potato Dextrose Agar (PDA) 50 %

Masing-masing Erlemeyer 300 ml diisi 4,88 g bubuk PDA dan 250 ml akuades kemudian dipanaskan sampai larut sempurna. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm selama 15 menit.

Selanjutnya medium dituang ke dalam cawan petri diameter 9 cm dan dibiarkan mengeras.

Medium peremajaan dan pemeliharaan

1. Kapang dan khamir

Potato Dextrose Agar (PDA)

Masing-masing Erlemeyer 300 ml diisi 9,75 g bubuk PDA dan 250 ml akuades kemudian dipanaskan sampai larut sempurna. Sebagian medium dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 5 ml. Medium kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C, tekanan 2 atm selama 15 menit. Selanjutnya medium dituang ke dalam cawan petri diameter 5 cm; medium dalam tabung reaksi dimiringkan dan dibiarkan mengeras.

2. Bakteri

Nutrient Agar (NA)

Sebanyak 23,0 g bubuk NA dan 1000 ml akuades dipanaskan sampai larut sempurna. Larutan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 5 ml. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C, tekanan 2 atm selama 15 menit. Selanjutnya tabung reaksi dimiringkan dan dibiarkan mengeras.

Medium perbanyakan

1. Khamir

Potato Dextrose Broth (PDB)

Sebanyak 24,0 g bubuk PDB dan 1000 ml akuades dipanaskan sampai larut sempurna. Larutan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 5 ml, dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2. Bakteri

Nutrient Broth (NB)

Sebanyak 8,0 g bubuk NB dan 1000 ml akuades dipanaskan sampai larut sempurna. Larutan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 5 ml, dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Medium fermentasi

Potato Dextrose Yeast (PDY)

Masing-masing Erlenmeyer 100 ml diisi 0,48 g bubuk PDB, 0,04 g YE, 0,1 g CaCO₃, dan akuades 20 ml (Syarmalina *et al.* 2003; Kumala 2005).

Selanjutnya medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Medium pengujian

Mueller Hinton (MH)

Sebanyak 38,0 g bubuk MH dan 1000 ml akuades dipanaskan sampai larut sempurna. Larutan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 17 ml, dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Isolasi kapang

Organ tanaman anggrek merpati sehat seperti akar, umbi semu, batang, dan daun yang akan digunakan untuk mengisolasi kapang, dicuci dengan air kran hingga bersih. Isolasi kapang dilakukan dari 5 akar, 5 umbi semu, 5 batang, dan 5 daun anggrek sehat. Bagian ujung, pangkal, dan tengah dari akar, umbi semu, batang, dan daun, dipotong

10 mm x 5 mm. Masing-masing potongan dari bagian tanaman dipotong sebanyak 10 subsampel kira-kira 2 mm x 2,5 mm (masing-masing bagian tanaman 50 subsampel). Jumlah keseluruhan subsampel dari masing-masing bagian tanaman yang diamati secara acak 200 potongan. Potongan dari masing-masing organ tanaman kemudian ditempatkan secara terpisah dalam masing-masing Erlemeyer 100 ml (Cannon & Simmon 2002).

Potongan bagian tanaman disterilisasi dengan alkohol 70 % selama 1 menit dan pemutih (mengandung 5,3 % natrium hipoklorit) selama 2 menit. Potongan bagian tanaman kemudian dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali dan dimasukkan ke dalam tissue tebal steril selama 3–4 jam (sampai kering). Isolasi dilakukan dengan teknik *direct planting*, yaitu dengan meletakkan potongan bagian tanaman yang sudah kering (8 potongan) di atas permukaan 50 % medium PDA dalam cawan Petri yang telah ditambahkan 200 mg kloramfenikol (Nakagiri *et al.* 2005).

Seluruh medium yang telah diinokulasi, diinkubasi pada suhu ruang (26–28° C). Morfologi koloni yang warna dan ukurannya sama dianggap isolat yang sama. Setiap koloni representatif dipisahkan menjadi isolat-isolat tersendiri.

Pemurnian kapang

Pemurnian dilakukan dengan cara isolasi spora tunggal (Gandjar *et al.* 1992). Masing-masing biakan kapang endofit, ditanam pada medium PDA miring dan diinkubasi selama 5 hari. Biakan kapang yang telah

berumur 5 hari ditambahkan 4 ml akuades steril. Spora dikerik dengan jarum tanam hingga terlepas dari agar dan divorteks untuk memperoleh suspensi spora. Suspensi spora diencerkan dengan akuades steril sampai mencapai pengenceran 10^{-3} . Sebanyak 0,1 ml suspensi disebarakan secara merata pada permukaan cawan petri berisi medium PDA dan diinkubasi pada suhu ruang ($26-28^{\circ}\text{C}$). Koloni tunggal yang tumbuh kemudian dipindahkan dalam PDA miring untuk *working culture* dan *stock culture*.

Identifikasi kapang

Isolat tunggal dari kapang endofit kemudian diidentifikasi secara morfologi meliputi pengamatan makroskopis dan mikroskopis dengan menggunakan buku identifikasi dari Domsch *et al.* (1980), Ellis (1993), Gandjar *et al.* (1999), dan Nakagiri *et al.* (2005).

Pembuatan inokulum dan enumerasi kapang endofit

Sebanyak 2 ml akuades steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang masing-masing berisi kapang endofit yang telah berumur 7 hari. Biakan kemudian dikerik perlahan dengan menggunakan jarum tanam untuk memperoleh suspensi spora. Suspensi spora divorteks agar homogen dan selanjutnya ditentukan jumlah koloni dengan metode *Colony Forming Unit* (CFU) (Gandjar *et al.* 1992).

Pembuatan inokulum dan enumerasi bakteri dan khamir

Biakan bakteri *B. subtilis*, *E. coli*, dan *S. aureus* diremajakan pada medium NA miring dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam, sedangkan biakan khamir *C. albicans* dan *C. tropicalis* diremajakan pada medium PDA miring dan diinkubasikan pada suhu 30° C selama 48 jam. Biakan bakteri dan khamir yang telah diremajakan, dituangkan masing-masing dengan 5 ml media NB dan PDB (Gandjar *et al.* 1992). Biakan bakteri dan khamir dikerik hati-hati dengan menggunakan jarum ose. Suspensi dituang kembali ke tempat media asalnya kemudian dimasukkan dalam *water bath* pada kecepatan 90 rpm (Agusta *et al.* 2005). Inkubasi untuk bakteri dan khamir pengujian dilakukan masing-masing pada suhu 37 dan 30° C selama 24 jam. Jumlah koloni kelima mikroorganisme tersebut ditentukan dengan metode *Colony Forming Unit* (CFU) (Gandjar *et al.* 1992).

Skrining kapang endofit penghasil antimikroorganisme terhadap bakteri dan khamir

Sebanyak 2 ml suspensi sel masing-masing kapang endofit $(2,4-3,0) \times 10^4$ cfu/ml ditambahkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml yang berisi 20 ml medium PDY (Syarmalina *et al.* 2003; Kumala 2005). Medium diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu ruang (26–28° C) dan kecepatan agitasi 90 rpm selama 5 hari (Agusta *et al.* 2005). Setiap perlakuan kapang dilakukan 3 ulangan. Pemanenan antimikroorganisme dilakukan dengan memisahkan

biomassa sel dengan cara sentrifugasi 6000 rpm selama 10 menit (Prihatiningtias *et al.* 2005). Supernatan digunakan sebagai *crude antimicrobial agent* untuk pengujian *bioassay*.

Setiap tabung yang berisi 17 ml medium MH diinokulasikan 0,2 ml masing-masing suspensi *B. subtilis*, *E. coli* dan, *S. aureus* ($7,1-9,3 \times 10^8$ cfu/ml; *C. albicans* dan *C. tropicalis* ($4,4-6,5 \times 10^7$ cfu/ml, serta divorteks supaya homogen. Medium kemudian dituang dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras. Penentuan aktivitas antimikroorganisme kapang endofit terhadap bakteri dan khamir uji menggunakan teknik kertas cakram *Kirby-Bauer* (Harmita & Radji 2004). Kertas cakram steril yang telah ditetesi 50 μ l supernatan masing-masing kapang endofit dan telah mengering, diletakkan di atas permukaan agar.

Masing-masing cawan petri yang berisi medium MH untuk pengujian bakteri dan khamir berisi 5 kertas cakram, yaitu 3 kertas cakram mengandung masing-masing supernatan hasil fermentasi kapang endofit, 1 kertas cakram mengandung akuades steril (kontrol negatif), dan 1 kertas cakram mengandung antibiotik kloramfenikol 30 μ g (kontrol positif untuk bakteri) dan nistatin 100 μ g (kontrol positif untuk khamir). Inkubasi untuk bakteri dan khamir penguji, masing-masing dilakukan pada suhu 37 dan 30° C selama 24 jam.

Analisis data

Persentase kolonisasi spesies kapang endofit dari masing-masing sampel akar, umbi semu, batang, dan daun anggrek merpati menggunakan perhitungan oleh Cannon & Simmons (2002) sebagai berikut:

$$FK = \frac{\sum \text{potongan organ tanaman yang terkolonisasi spesies kapang}}{\sum \text{total potongan organ tanaman yang diamati}} \times 100\%$$

Keterangan:

FK = Frekuensi kolonisasi spesies kapang

Parameter yang diamati pada uji skrining kapang endofit penghasil antimikroorganisme adalah indeks antimikroorganisme (Sudiana *et al.* 2001). Adanya aktivitas antimikroorganisme ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening di sekeliling kertas cakram. Indeks antimikroorganisme ditentukan oleh besarnya diameter zona bening di sekeliling kertas cakram dibagi diameter terluar kertas cakram.

HASIL

Isolasi dan identifikasi kapang endofit

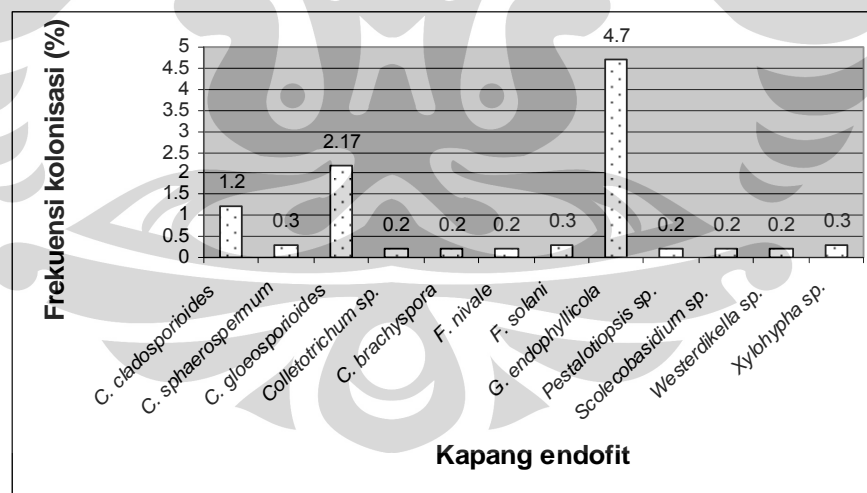
Sebanyak 60 isolat kapang endofit terdiri dari 12 spesies termasuk dalam 9 genera, diisolasi dari anggrek merpati yang dikoleksi dari Perumahan Tanah Baru, Kebun Raya Bogor, dan Herbarium Bogoriense. Dua spesies kapang endofit dari 2 genera termasuk dalam Ascomycotina dan 10 spesies kapang endofit dari 7 genera termasuk dalam *Mitosporic Fungi* (Deuteromycotina) (Lampiran I.2 & I.3).

Kapang endofit yang diisolasi dan telah diidentifikasi adalah *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, 1952, *Cladosporium sphaerospermum* Penzig, 1882, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Sacc., *Colletotrichum* sp., *Curvularia brachyspora* Boedijn, *Fusarium nivale* (Fr.) Ces., 1895, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., 1881, *Guignardia endophyllicola* Okane, Nakagiri, & Ito, 2001 (anamorf: *Phyllosticta capitalensis*), *Pestalotiopsis* sp., *Scolecobasidium* sp., *Westerdikella* sp., dan *Xylohypha* sp. (Lampiran I.4–I.10). Data makroskopis dan mikroskopis kapang tersebut ditampilkan dalam Lampiran I.11 & I.12.

Guignardia dan *Westerdikella* merupakan genera kapang dari Ascomycotina, sedangkan *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Scolecobasidium*, dan *Xylohypha* merupakan genera kapang dari *Mitosporic Fungi*. *Cladosporium*, *Colletotrichum*, dan

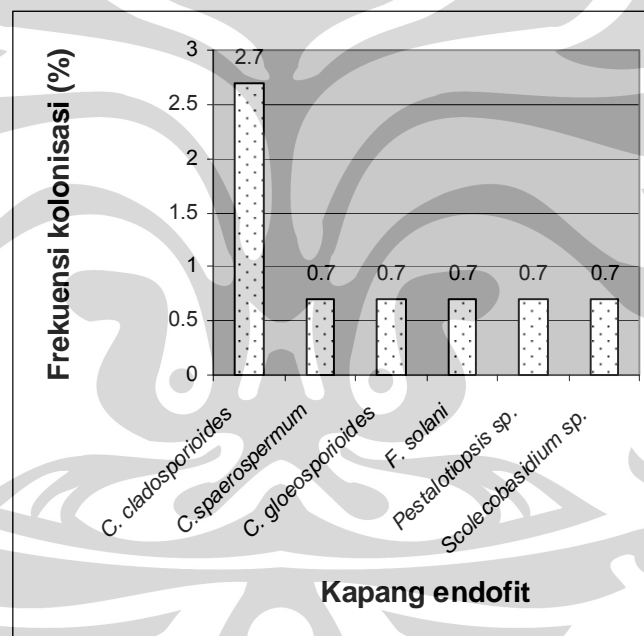
Fusarium merupakan genera kapang yang banyak ditemukan, yaitu masing-masing 2 spesies (Lampiran I.2 & I.3).

Gambar I.1 menggambarkan frekuensi kolonisasi kapang endofit yang diisolasi dari anggrek merpati. Frekuensi kolonisasi *G. endophyllicola* 28 isolat (4,7 %), *C. gloeosporioidese* 13 isolat (2,17 %) dan *C. cladosporioides* 7 isolat (1,2 %) adalah tinggi. Frekuensi kolonisasi kapang endofit lainnya lebih rendah, yaitu berkisar (0,2–0,3) %. Frekuensi kolonisasi *C. sphaerospermum* (2 isolat), *F. solani* (2 isolat), dan *Xylohypha* sp. (2 isolat), yaitu (0,3 %), sedangkan *Colletotrichum* sp. (1 isolat), *C. brachyspora* (1 isolat), *F. nivale* (1 isolat), *Pestalotiopsis* sp. (1 isolat), *Scolecobasidium* sp. (1 isolat) dan *Westerdikella* sp. (1 isolat), yaitu (0,2 %).



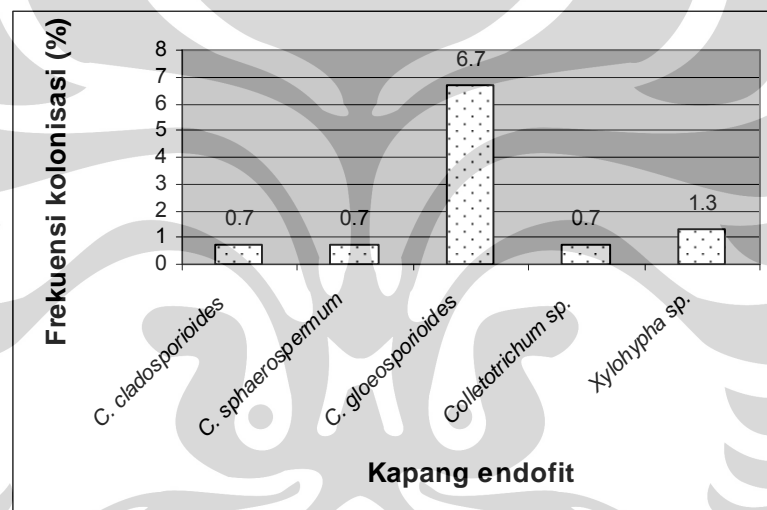
Gambar I.1. Frekuensi kolonisasi kapang endofit pada *D. crumenatum*.

Gambar I.2 menggambarkan kapang endofit yang diisolasi dari akar anggrek merpati. Enam spesies kapang endofit, yaitu *C. cladosporioides* (4 isolat), *C. sphaerospermum* (1 isolat), *C. gloeosporioides* (1 isolat), *F. solani* (1 isolat), *Pestalotiopsis* sp. (1 isolat), dan *Scolecobasidium* sp. (1 isolat), diisolasi dari akar anggrek merpati. Frekuensi kolonisasi masing-masing kapang tersebut berkisar (0,7–2,7) %. Frekuensi kolonisasi 2,7 % tertinggi dihasilkan oleh *C. cladosporioides*.



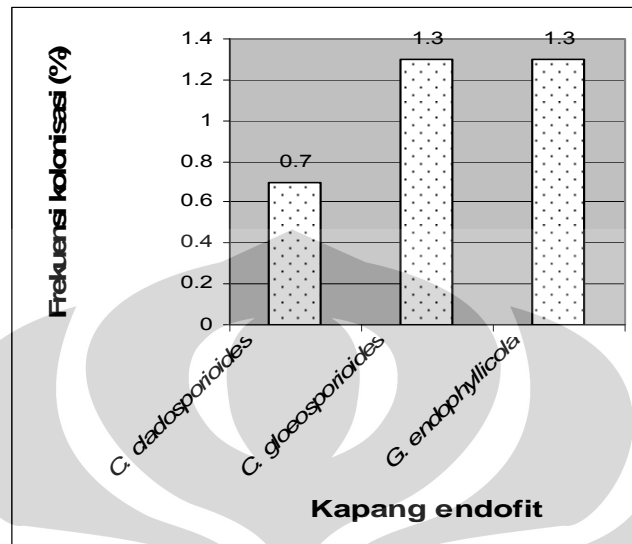
Gambar I.2. Frekuensi kolonisasi kapang endofit pada akar *D. crumenatum*

Lima spesies kapang endofit, seperti *C. cladosporioides* (1 isolat), *C. sphaerospermum* (1 isolat), *C. gloeosporioides* (10 isolat), *Colletotrichum* sp. (1 isolat), dan *Xylohypha* sp. (2 isolat), diisolasi dari umbi semu anggrek merpati. Frekuensi kolonisasi masing-masing spesies berkisar (0,7–6,7) %. Frekuensi kolonisasi 6,7 % tertinggi dihasilkan oleh *C. gloeosporioides* (Gambar I.3).



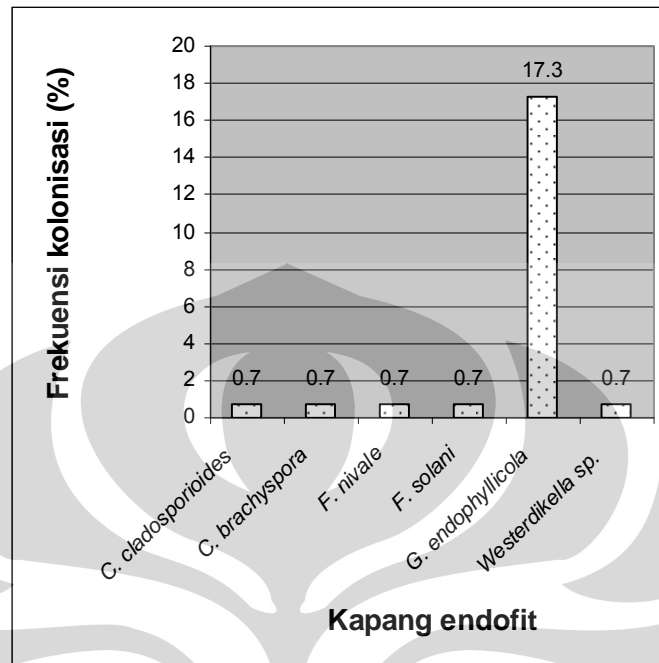
Gambar I.3. Frekuensi kolonisasi kapang endofit pada umbi semu *D. crumenatum*

Cladosporium cladosporioides (1 isolat), *C. gloeosporioides* (2 isolat), dan *G. endophyllicola* (2 isolat), diisolasi dari batang anggrek merpati. Frekuensi kolonisasi spesies tersebut berkisar (0,7–1,3) %. Frekuensi kolonisasi tertinggi dihasilkan oleh *C. gloeosporioides* dan *G. endophyllicola*, yaitu masing-masing 1,3 % (Gambar I.4).



Gambar I.4. Frekuensi kolonisasi kapang endofit pada batang *D. crumenatum*.

Enam spesies kapang endofit, yaitu *C. cladosporioides* (1 isolat), *C. brachyspora* (1 isolat), *F. nivale* (1 isolat), *F. solani* (1 isolat), *G. endophyllicola* (26 isolat) dan *Westerdikella* sp. (1 isolat), diisolasi dari daun anggrek merpati. Frekuensi kolonisasi spesies berkisar (0,7–17,3) %. Frekuensi kolonisasi 17,3 % tertinggi dihasilkan oleh *G. endophyllicola* (Gambar I.5).



Gambar I.5. Frekuensi kolonisasi kapang endofit pada daun *D. crumenatum*

Skrining kapang endofit penghasil antimikroorganisme terhadap bakteri dan khamir

Hanya 1 isolat *F. nivale* (1,7 %) dari 60 isolat kapang endofit yang diuji terhadap antimikroorganisme, dapat menghambat pertumbuhan *C. albicans* dan *C. tropicalis*. Indeks antimikroorganisme kapang tersebut pada *C. albicans* ($1,7 \pm 0,02$) dan *C. tropicalis* ($1,3 \pm 0,06$). Indeks antibiotik kloramfenikol pada *B. subtilis* ($4,8 \pm 0,06$), *E. coli* ($3,2 \pm 0,12$), dan *S. aureus* ($2,8 \pm 0,09$), sedangkan indeks antibiotik nistatin pada *C. albicans* ($4,8 \pm 0,11$) dan *C. tropicalis* ($4,8 \pm 0,13$) (Lampiran I.13).

PEMBAHASAN

Isolasi dan identifikasi kapang endofit

Kapang endofit yang diisolasi dari anggrek merpati tergolong dalam Ascomycotina dan *Mitosporic Fungi*. Kapang endofit yang tergolong dalam Basidiomycotina dan Oomycotina tidak terisolasi dalam penelitian. Medium yang digunakan dalam penelitian mungkin tidak spesifik dan tidak cocok untuk kapang yang tumbuh lambat dan memerlukan faktor pertumbuhan tertentu.

Selain *Scolecobasidium*, *Westerdikella*, dan *Xylohypha*, kapang endofit lainnya, seperti *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Guignardia* (anamorf: *Phyllosticta*), dan *Pestalotiopsis* adalah umum dan telah banyak dilaporkan (Lodge *et al.* 1996; Nakagiri *et al.* 2005; Hua Wei Zhang *et al.* 2006). *Scolecobasidium* sp., *Westerdikella* sp., dan *Xylohypha* sp. merupakan informasi baru sebagai kapang endofit pada anggrek merpati. Askomata *Westerdikella* sp. berbentuk bulat, berwarna coklat gelap sampai hitam dengan hiasan menyudut. Askospora berwarna coklat, berbentuk memanjang sampai elips, berdinding halus, dan berukuran 4–6 x 2–2,5 μm .

Cladosporium, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Guignardia* dan *Pestalotiopsis* yang diisolasi dari anggrek merpati tergolong kapang endofit yang tidak spesifik inang (Petrini 1986). Kapang tersebut diisolasi dari

sejumlah inang dalam familia tumbuhan yang berbeda dan tumbuh di lingkungan yang berbeda. *Cladosporium cladosporioides* diisolasi dari *Juncus* spp. (Cabral *et al.* 1993), dari *Mitracarpus hirtus* (L.) D.C. (Pereira & Barreto 2004), dan dari *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) (Verma *et al.* 2005); *C. sphaerospermum* diisolasi dari *Livistona chinensis* Rebr. (Guo *et al.* 2000) dan dari *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson (Prashanti & Kulkarni 2005); *C. gloeosporioides* diisolasi dari *Rhododendron* spp. (Okane *et al.* 1998), dari 11 spesies tumbuhan yang ada di Nusa Kambangan dan 2 spesies tumbuhan yang ada di Muara Angke (Nakagiri *et al.* 2005); *C. brachyspora* diisolasi dari *Aloe* sp., *Saccharum*, dan *Triticum* (Ellis 1993); *F. solani* diisolasi dari *Glycine max* L. dan *Zea mays* L. (Domsch *et al.* 1980); *F. nivale* diisolasi dari *Agrostis stolonifera* L. (Warnke 2003) dan dari *Festuca arundinacea* Schreb, *G. max*, dan *Triticum aestivum* L. (Pettitt *et al.* 2003); *Pestalotiopsis* spp. diisolasi dari *Rhododendron* spp., dan *Pieris japonica* D. Don ex G. Don (Okane *et al.* 1998), dari *A. indica* (Mahesh *et al.* 2005), dan dari *Theobroma cacao* L. (Rubini *et al.* 2005).

Selain *Guignardia*, komposisi spesies kapang endofit yang diisolasi dari anggrek merpati (*Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Scolecobasidium*, *Westerdikella*, dan *Xylohypha*) berbeda dengan kapang endofit yang diisolasi dari anggrek *Dendrobium* spp. dan anggrek epifit *Lepanthes*. Genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pestalotia*, *Rhizoctonia*, dan *Xylaria* diisolasi dari akar anggrek *Lepanthes* (Bayman *et al.*

1997); *Physalospora* dari *Dendrobium* sp.; *Phomopsis orchidophila* Cash & Watson dari batang, daun, dan kelopak bunga anggrek

Dendrobium atrovioleaceum Rolfe; dan *Septoria selenophomoides* Cash & Watson dari daun anggrek *D. nobile*, dan *D. phalaenopsis* (Cash & Watson 1955).

Spesies dan frekuensi kolonisasi kapang endofit yang diisolasi dari aneka organ anggrek merpati yang berbeda, menunjukkan perbedaan. Habitat yang berkaitan dengan tumbuhan merupakan lingkungan yang dinamis, menyebabkan banyak faktor dapat mempengaruhi komposisi dan frekuensi kolonisasi kapang endofit yang mengkolonisasi akar, umbi semu, batang, dan daun anggrek merpati. Okane *et al.* (1998) melaporkan bahwa komposisi dan frekuensi kolonisasi kapang endofit berkaitan erat dengan tempat dan tumbuhan inang, dan kerapatan kolonisasi pada tumbuhan inang adalah spesifik tempat. Araujo *et al.* (2002 dalam Rubini *et al.* 2005) melaporkan bahwa komunitas kapang endofit mungkin tergantung pada interaksi dengan mikroorganisme endofit atau patogen lainnya. Keberadaan kapang endofit pada tumbuhan tampaknya dipengaruhi oleh variasi musim (Halmschlager *et al.* 1993 dalam Mahesh *et al.* 2005), faktor lingkungan (Clay 1986), dan tipe jaringan tumbuhan inang (Rodrigues 1994 dalam Mahesh *et al.* 2005).

Dibandingkan dengan kapang endofit lainnya, frekuensi kolonisasi

(4,7 %) *G. endophyllicola* (anamorf: *P. capitalensis*) adalah paling tinggi atau kapang tersebut dominan pada anggrek merpati. Kapang tersebut diisolasi dari daun dan batang anggrek tersebut. Hasil yang sama bahwa

Phyllostictina pyriformis (syn: *P. capitalensi*) diisolasi dari kedua organ tanaman yang sama pada *Dendrobium canaliculatum* Rebr., *D. phalaenopsis* Griff. ex Lindley, dan *D. undulatum* Pers. (Cash & Watson 1955). Kapang yang sama diisolasi dari anggrek *Cypripedium* sp., *A. gramminifolia*, dan *D. moniliforme* (Okane *et al.* 2003), dari 64 spesies dan 3 varietas tanaman yang ada di Kyoto Herbal Garden (Okane *et al.* 2003), dari *Rhododendron* spp. dan *P. japonica* (Okane *et al.* 1998), dari 7 spesies tumbuhan yang ada di Muara Angke dan 12 spesies tumbuhan yang ada di Nusa Kambangan (Nakagiri *et al.* 2005). Kapang tersebut dijumpai tingkat anamorf dan tingkat teleomorfnya. Askomata bercampur dengan konidiomata. Askomata berbentuk agak bulat, tunggal atau dalam kelompok, dan berwarna hitam. Askus berbentuk semigada sampai silindris, berukuran 52–98 x 10–14 μm , dan mengandung 8-akospora. Askospora berukuran 12–18 x 3–5 μm , tidak berwarna, berbentuk *fusiform* sampai elips, dan bagian tengahnya lebih lebar. Konidia berbentuk *obovate* atau *pyriform*, berukuran 8–12 x 5–7 μm , mempunyai satu apendiks dengan panjang 3–13 μm . Membentuk tingkat spermatia dengan ukuran 6–9 x 1–2 μm .

Skrining kapang endofit penghasil antimikroorganisme terhadap bakteri dan khamir

Hanya 1 isolat *F. nivale* (1,7 %) dari 60 isolat kapang endofit yang diuji terhadap antimikroorganisme, dapat menghambat pertumbuhan *C. albicans* ($1,7 \pm 0,02$) dan *C. tropicalis* ($1,3 \pm 0,06$). Filtrat *F. nivale* memperlihatkan aktivitas antibiosis yang potensial terhadap mikroorganisme patogen manusia yang digunakan untuk uji *bioassay*. Efek hambatan pada kedua khamir tersebut disebabkan *F. nivale* selama berasosiasi dengan tumbuhan inangnya atau selama pertumbuhan saprofitnya, menghasilkan mikotoksin *nivalenol* dan *fusarenon-x* (Ueno *et al.* 1973), serta *deoxynivalenol* (DON, vomitoxin) (Logrieco *et al.* 1991). Strobel & Daisy (2003) menginformasikan bahwa *Fusarium* sp. yang diisolasi dari *Selaginella pallescens* (Presl.) Spring menghasilkan *pentaketida* yang bersifat antikhamir terhadap *C. albicans*.

Kloramfenikol adalah antibiotik bersepektrum luas, karena dapat membunuh bakteri Gram-negatif dan Gram-positif. Antibiotik kloramfenikol menghambat pertumbuhan *B. subtilis* ($4,8 \pm 0,06$) lebih besar daripada *E. coli* ($3,2 \pm 0,12$) dan *S. aureus* ($2,8 \pm 0,09$) atau *B. subtilis* lebih peka daripada *E. coli* dan *S. aureus* terhadap antibiotik tersebut. Perbedaan respon ketiga bakteri tersebut terhadap antibiotik kloramfenikol mungkin disebabkan oleh spesiesnya berbeda. Indeks antibiotik nistatin terhadap *C. albicans* ($4,8 \pm 0,11$) dan *C. tropicalis* ($4,8 \pm 0,13$) adalah sama, meskipun kedua spesies khamir tersebut berbeda. Kemungkinannya karena antibiotik nistatin mengandung senyawa yang sudah dirancang khusus untuk mengendalikan *Candida* spp.

Indeks antimikroorganisme *F. nivale* pada *C. albicans* lebih besar daripada *C. tropicalis* atau *C. albicans* lebih peka terhadap antimikroorganisme tersebut daripada *C. tropicalis*. Hasil yang sama diperlihatkan *C. tropicalis* yang lebih virulen daripada *C. albicans* pada tikus yang diberi antibiotik dan *cytarabine* (Wingard *et al.* 1982); dan pada tikus yang diberi gentamisin dan *cytarabine*, *C. tropicalis* dapat mempenetrasi *damaged gastrointestinal mucosa* sebanyak 69 %, sedangkan *C. albicans* hanya 23 % (Wingard *et al.* 2001). Kemungkinannya disebabkan karena spesiesnya berbeda.

Ganiswarna *et al.* (1995) melaporkan bahwa ada tiga mekanisme kerja antifungi, yaitu (1) berikatan kuat dengan sterol yang terdapat pada membran sel khamir. Ikatan tersebut akan membuat sel bocor sehingga terjadi kehilangan bahan intraselular dan mengakibatkan kerusakan yang tetap pada sel; (2) masuk ke dalam sel dengan bantuan enzim tertentu dan di dalam sitoplasma bergabung dengan RNA yang kemudian akan menghambat langsung sintesis DNA, sehingga sintesis protein khamir terganggu; dan (3) mengikat enzim sitokrom P 450 sehingga menghambat sintesis ergosterol yang menyebabkan permeabilitas membran sel khamir meningkat yang mengakibatkan membran sel rusak.

Ketidakmampuan spesies kapang endofit lainnya menghambat pertumbuhan *B. subtilis*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *E. coli*, dan *S. aureus*, kemungkinannya tidak mengandung metabolit sekunder yang bersifat antibakteri atau antikhmir atau konsentrasi untuk pengujian terlalu rendah

(50 µl/kertas cakram) sehingga tidak dapat menghambat pertumbuhan ke lima mikroorganisme tersebut. Kemungkinan lainnya, kapang endofit tersebut mengandung metabolit sekunder yang berfungsi lain, seperti antikanker, antimalaria, antioksidan, dan prekursor. *Pestalotiopsis* spp. yang diisolasi dari tumbuhan *Taxus wallichiana* Zucc., menghasilkan senyawa taxol yang berkhasiat antitumor (Mahesh *et al.* 2005), sedangkan *Pestalotiopsis* sp. yang hidup pada *Torreya taxifolia* Arnot, menghasilkan *ambuic acid* yang berkhasiat antifungi (Hua Wei Zhang *et al.* 2006). *Pestalotiopsis microspora* (Speg.) Batista menghasilkan *pestacin* dan *isopestacin* berkhasiat antifungi dan antioksidan (Hua Wei Zang *et al.* 2006). *Colletotrichum* sp. yang diisolasi dari tumbuhan *Artemisia annua* L., menghasilkan metabolit artemisin yang sangat potensial sebagai antimalaria (Strobel & Daisy 2003), antibakteri terhadap bakteri Gram-positif *B. subtilis*, *S. aureus*, dan *Sarcina lutea*, Gram-negatif *Pseudomonas* sp., dan antifungi terhadap *Phytophthora capsici* Lionian, *Rhizoctonia cerealis* Van Der Hoeven, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, dan *Helminthosporium sativum* Pammel, King & Bakke (Ren Xiang Tan & Wen Xin Zou 2001). *Phyllosticta* sp. (teleomorf: *Guignardia*) yang diisolasi dari tumbuhan *Abies balsamea* Miller, menghasilkan *heptelidic acid* dan *hydroheptelidic acid* yang bersifat toksik pada larva *Choristoneura fumiferana* (Ren Xiang Tan & Wen Xin Zou 2001). *Guignardia* sp. yang hidup pada *Spondias mombin* L., menghasilkan prekursor *guignardic acid* (Hua Wei Zhang *et al.* 2006). Alkaloid *asperfumoid*, *aspermigrin A*, dan *aspermigrin* diisolasi dari *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link ex S.O. Gray

yang berinteraksi dengan *Cynodon dactylon* K. Nov. Komponen bioaktif tersebut dapat menghambat *C. albicans* dan sel tumor (Hua Wei Zhang *et al.* 2006).

KESIMPULAN

Sebanyak 60 isolat yang terdiri dari 12 spesies kapang endofit telah diisolasi dari akar, umbi semu, batang, dan daun anggrek merpati. Kapang endofit yang diisolasi dari akar 6 spesies, dari umbi semu 5 spesies, dari batang 3 spesies, dan dari daun tanaman 6 spesies.

Kapang endofit yang berhasil diisolasi ialah *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia brachyspora*, *Fusarium nivale*, *Fusarium solani*, *Guignardia endophyllicola* (anamorf: *Phyllosticta capitalensis*), *Pestalotiopsis* sp., *Scolecobasidium* sp., *Westerdikella* sp., dan *Xylohypha* sp. Kapang endofit *Guignardia endophyllicola* ialah dominan pada anggrek merpati.

Fusarium nivale mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans* dan *Candida tropicalis* dengan indeks antimikroorganisme masing-masing $1,7 \pm 0,02$ dan $1,3 \pm 0,06$. Selain itu, semua isolat kapang endofit tidak menghambat pertumbuhan bakteri Gram-negatif *Escherichia coli* dan Gram-positif *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*.

SARAN

Perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut dengan metode genetika molekular pada kapang endofit anggrek merpati yang belum teridentifikasi sampai spesies.





DAFTAR ACUAN

- Agusta, A., S. Maehara, K. Ohashi, P. Simanjuntak, & H. Shibuya. 2005. Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **53**(12): 1565–1569.
- Agusta, A., K. Ohashi, & H. Shibuya. 2006. Bisanthraquinone metabolites produced by endophytic fungus *Diaporthe* sp. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **54**(4): 579–582.
- Arditti, J. 1992. *Fundamentals of orchid biology*. John Wiley & Sons, New York: xii + 691 hlm.
- Bacon, C.W., I.E. Yates, D.M. Hinton, & F. Meredith. 2001. The potential impact of climate variability and change on air pollution-related health effects in the United States. *Environmental Health Perspectives* **109**(suppl.2): 325–332.
- Bayman, P., L.L. Lebron, R.L. Tremblay, & D.J. Lodge. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytology* **135**: 143–149.
- Burkill, I.H. 1935. *A Dictionary of the economic products of the Malay Peninsula*. Millbank, London: xii + 346 hlm.
- Cabral, D., J.K. Stone, & G.C. Carroll. 1993. The internal mycobiota of *Juncus* spp.: microscopic and cultural observation of infection patterns. *Mycological Research* **97**(3): 367–376.

- Cannon, P.F. & C.F. Simmons. 2002. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia* **94**(2): 210–220.
- Cash, E.K. & A.J. Watson. 1955. Some fungi on Orchidaceae. *Mycologia* **47**: 729–747.
- Clay, K. 1986. Grass endophytes. *In*: N.J. Fokkema & J. Van den Heuvel (ed.). *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge: 188–204.
- Domsch, K.H., W. Gams, & T. Anderson. 1980. *Compendium of soil fungi*. Vol I. Academic Press, London: xii + 859 hlm.
- Ellis, M.B. 1993. *Dematiaceous hyphomycetes*. International Mycological Institute, London: viii + 608 hlm.
- Gandjar, I., I.R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo, & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. Jurusan Biologi, FMIPA, UI, Jakarta: vii + 87.
- Gandjar, I., R.A. Samson, K. van den Tweel-Vermeulen, A. Oetari, & I. Santoso. 1999. *Pengenalan kapang tropik umum*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: xiii + 136 hlm.
- Ganiswarna, S.G., S. Rianto, D.S. Frans, & Purwastyastuti. 1995. *Farmakologi dan terapi* edisi IV Jakarta: Bagian Farmakologi Kedokteran UI: x + 643 hlm.

- Guo, L.D., K.D. Hyde, & E.C.Y. Liew. 2000. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist* **147**: 617–630.
- Harmita & M. Radji. 2004. *Buku ajar analisis hayati*. Departemen Farmasi FMIPA, UI: 149 hlm.
- Hua Wei Zhang, Yong Chun Song, & Ren Xiang Tan. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports* **23**: 753–771.
- Kong Jin Ming, Goh Ngoh Khan, Chia Lian Sai, & Chia Tet Fatt. 2003. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacologica Sinica* **24**(1): 7–21.
- Kumala, S. 2005. Isolasi dan penapisan mikroba endofit tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr. serta uji sitotoksik metabolit sekunder terhadap beberapa sel kanker secara invitro. Ringkasan Disertasi. Program Studi Ilmu Biomedik, Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran, UI, Jakarta: 41 hlm.
- Ling Chin Chou & D. Chi Ning Chang. 2004. Asymbiotic and symbiotic germination of *Anoectochilus formosanus* and *Haemaria discolor* and their F1 hybrids. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **45**: 143–147.
- Lodge, D.J., P.J. Fisher, & B.C. Sutton. 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia* **88**(5): 733–738.

- Logrieco, A., R.F. Vesonder, S.W. Peterson, & Bottalico. 1991. Reexamination of the taxonomic disposition and deoxynivalenol production by *Fusarium nivale* NRRL 3289. *Mycologia* **83**(3): 367–370.
- Mahesh, N., M.V. Tejesvi, M.S. Nalini, H.S. Prakash, K.R. Kini, Ven Subbiah, & H.S. Shetty. 2005. Endophytic mycoflora of inner bark of *Azadirachta indica* A. Juss. *Current Science* **88**(2): 218–219.
- Nakagiri, A., I. Okane, T. Ito, K. Kramadibrata, Suciati, & A. Retnowati. 2005. A Guidebook to identification of fungi inhabiting mangrove and surrounding area in Indonesia. A Report of GTI pilot study on fungal taxonomy: 149 hlm.
- Okane, I., A. Nakagiri, & T. Ito. 1998. Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants. *Canadian Journal of Botany* **76**(4): 657–663.
- Okane, I. A. Nakagiri, & T. Ito. 2001. *Surculiseries rugispora* gen. et sp. nov., a new endophytic mitosporic fungus from leaves of *Bruguiera gymnorrhiza*. *Mycoscience* **42**: 115–122.
- Okane, I., S. Lumyong, & A. Nakagiri. 2003. Extensive host range of an endophytic fungus, *Guignardia endophyllicola* (anamorph: *Phyllosticta capitalensis*). *Mycoscience* **44**: 353–363.
- Pereira, O.L. & R.W. Barreto. 2004. The mycobiota of the weed *Mitracarpus hirtus* (L.) DC. in Minas Gerais (Brazil), with particular reference to fungal pathogens for biological control. *Australian Plant Pathology* **34**(1): 41–50.

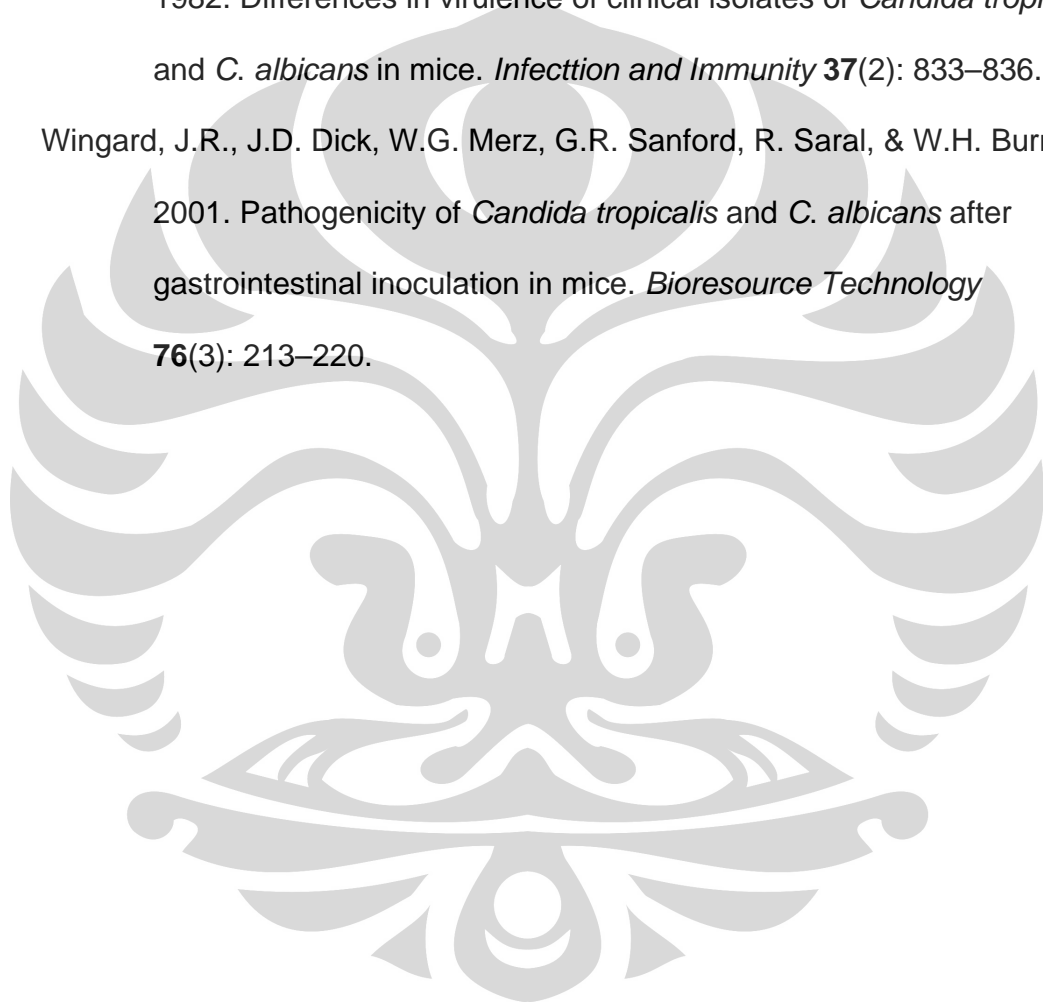
- Petrini, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. *In*: N.J. Fokkema & J. Van den Heuvel (ed.). *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge: 175–187.
- Pettitt, T., Xiang Ming Xu, & D. Parry. 2003. Association of *Fusarium* species in the wheat stem rot complex. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 769–774.
- Prashanthi, S.K. & S. Kulkarni. 2005. *Aureobasidium pullulans*, a potential mycoherbicide for biocontrol of *Eupatorium* (*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson weed. *Current Science* **88**(1): 18–21.
- Prihatiningtias, W., S.M. Widyastuti., & S. Wahyuono. 2005. Senyawa antibakteri dari *Thievalia polygonoperda*, fungi endofit tumbuhan akar kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers). *Pharmakon* **6**(1): 19–22.
- Ren XiangTan & Wen Xin Zou. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*. **18**: 448–459.
- Rubini, M.R., R.T. Silva-Ribeiro, A.W.V. Pomella, C.S. Maki, W.L. Araujo, D.R. dos Santos, & J.L. Azevedo. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches' broom disease. *International Journal of Biological Sciences* **1**: 24–33.

- Shibuya, H., A. Agusta, K. Ohashi, S. Maehara, & P. Simanjuntak. 2005. Biooxidation of (+)-catechin and (-)-epicatechin into 3,4-dihydroxyflavan derivatives by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **53**(7): 866–867.
- Strobel, G. & B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**(4): 491–502.
- Sudiana, I.M., R.D. Rahayu, H. Imanuddin, & M. Rahmansyah. 2001. Cellulolytic bacteria of soil of Gunung Halimun National Park. Edisi Khusus. *Biodiversitas Taman Nasional Gunung Halimun, Berita Biologi* **5**(6): 703–709.
- Syarmalina, Setyorini, & N. Yantih. 2003. Isolasi dan skrining kapang endofitik dari dringo (*Acorus calamus* L.) yang berpotensi sebagai penghasil antimikroba. Prosiding Seminar dan Pameran Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXIII, Jakarta: 169–174.
- Ueno, Y., N. Sato, K. Ishii, K. Sakai, H. Tsunoda, & M. Enomoto. 1973. Biological and chemical detection of trichothecene mycotoxins of *Fusarium* species. *Applied Microbiology* **25**(4): 699–704.
- Verma, V., S. Gond, A. Kumar, R. Kharwar, & G. Strobel. 2005. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varansi (India). *Microbial Ecology* **54**(1): 119–125.

Warnke, S.E. 2003. Creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) In: Casler, M.D. & R.R. Duncan (eds). *Turfgrass biology, genetics, and breeding*. Wiley, Hoboken: 175–185.

Wingard, J.R., J.D. Dick, W.G. Merz, G.R. Sanford, R. Saral, & W.H. Burns. 1982. Differences in virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis* and *C. albicans* in mice. *Infection and Immunity* **37**(2): 833–836.

Wingard, J.R., J.D. Dick, W.G. Merz, G.R. Sanford, R. Saral, & W.H. Burns. 2001. Pathogenicity of *Candida tropicalis* and *C. albicans* after gastrointestinal inoculation in mice. *Bioresource Technology* **76**(3): 213–220.



Lampiran I.2. Frekuensi kolonisasi spesies kapang endofit total dan pada akar *D. crumenatum*

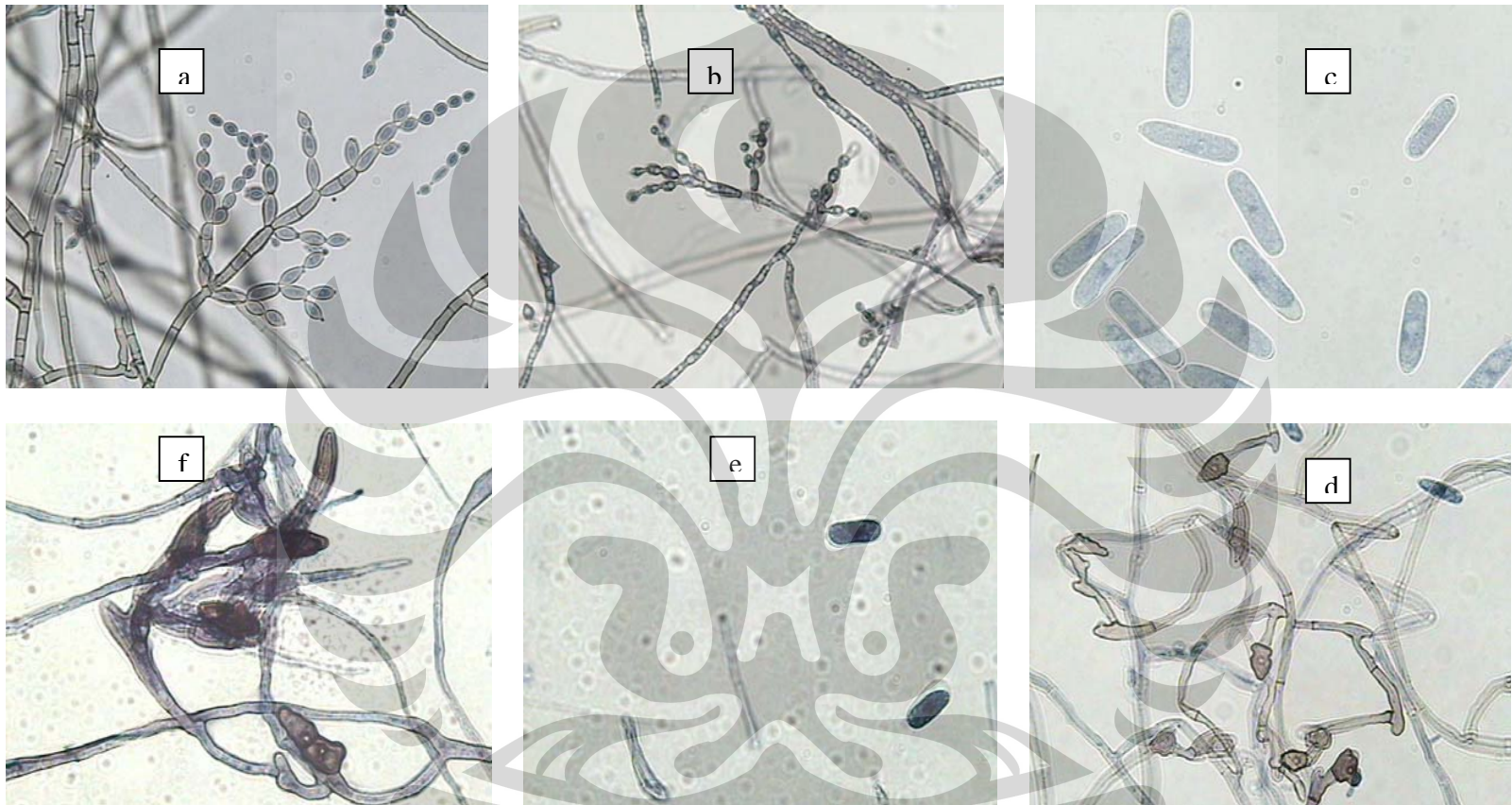
No	Kapang endofit	Anggrek merpati (total)			Akar		
		Kode isolat	FP	FK	Kode isolat	FP	FK
	Ascomycotina						
1.	<i>Guignardia endophyllicola</i>	14T, 15T, 12K, 13K, 14K, 15K, 16K, 17K, 18K, 19K, 20K, 21K, 22K, 23K, 24K, 25K, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H, 8H, 9H, 10H, 11H, 12H, 13H	28	4,7			
2.	<i>Westerdikella</i> sp.	14 H	1	0,2			
	Mitosporic Fungi (Deuteromycotina)						
3.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	15H, 1T, 16T, 1K, 2K, 3K, 4K	7	1,2	1K, 2K, 3K, 4K	4	2,7
4.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	5K, 2T	2	0,3	5K	1	0,7
5.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	3T, 4T, 5T, 6T, 7T, 8T, 9T, 10T, 11T, 17T, 6K, 9K, 11K	13	2,17	6K	1	0,7
6.	<i>Colletotrichum</i> sp.	10K	1	0,2			
7.	<i>Curvularia brachyspora</i>	18T	1	0,2			
8.	<i>Fusarium nivale</i>	26K	1	0,2			
9.	<i>Fusarium solani</i>	16H, 7K	2	0,3	7K	1	0,7
10.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1H	1	0,2	1H	1	0,7
11.	<i>Scolecobasidium</i> sp.	8K	1	0,2	8K	1	0,7
12.	<i>Xylohypha</i> sp.	12T, 13T	2	0,3			
	Jumlah		60	10,17		9	6,2
	Jumlah subsampel		600			150	

Keterangan: FP = Frekuensi per spesies FK = $\frac{FP}{\sum \text{total subsampel}} \times 100 \%$
 FK = Frekuensi kolonisasi

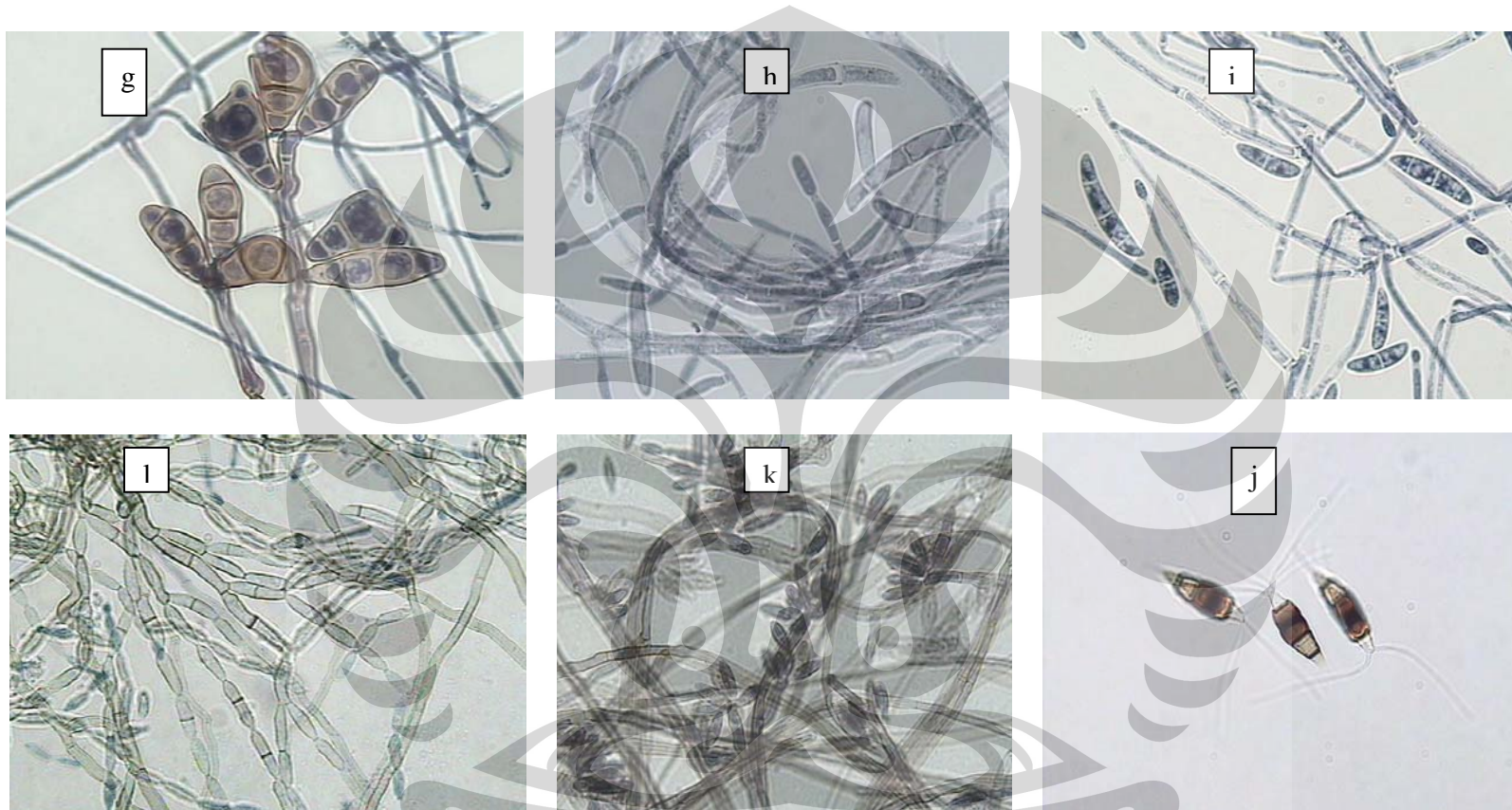
Lampiran I.3. Frekuensi kolonisasi spesies kapang endofit pada umbi semu, batang, dan daun *D. crumenatum*

No	Kapang endofit	Umbi semu			Batang			Daun		
		Kode isolat	FP	FK	Kode isolat	FP	FK	Kode isolat	FP	FK
Ascomycotina										
1.	<i>Guignardia endophyllicola</i>				14T, 15T	2	1,3	12K, 13K, 14K, 15K, 16K, 17K, 18K, 19K, 20K, 21K, 22K, 23K, 24K, 25K, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H, 8H, 9H, 10H, 11H, 12H, 13H	26	17,3
2.	<i>Westerdikella</i> sp.							14H	1	0,7
Mitosporic Fungi (Deuteromycotina)										
3.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1T	1	0,7	16T	1	0,7	15H	1	0,7
4.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	5T	1	0,7						
5.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	6T, 4T, 5T, 6T, 7T, 8T, 9T, 10T, 11T, 9K	10	6,7	17T, 11K	2	1,3			
6.	<i>Colletotrichum</i> sp.	10K	1	0,7						
7.	<i>Curvularia brachyspora</i>							18T	1	0,7
8.	<i>Fusarium nivale</i>							26K	1	0,7
9.	<i>Fusarium solani</i>							16H	1	0,7
10.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.									
11.	<i>Scolecobasidium</i> sp.									
12.	<i>Xylohypha</i> sp.	12T, 13T	2	1,3						
	Jumlah		15	10,1		5	3,3		31	20,8
	Jumlah subsampel		150			150			150	

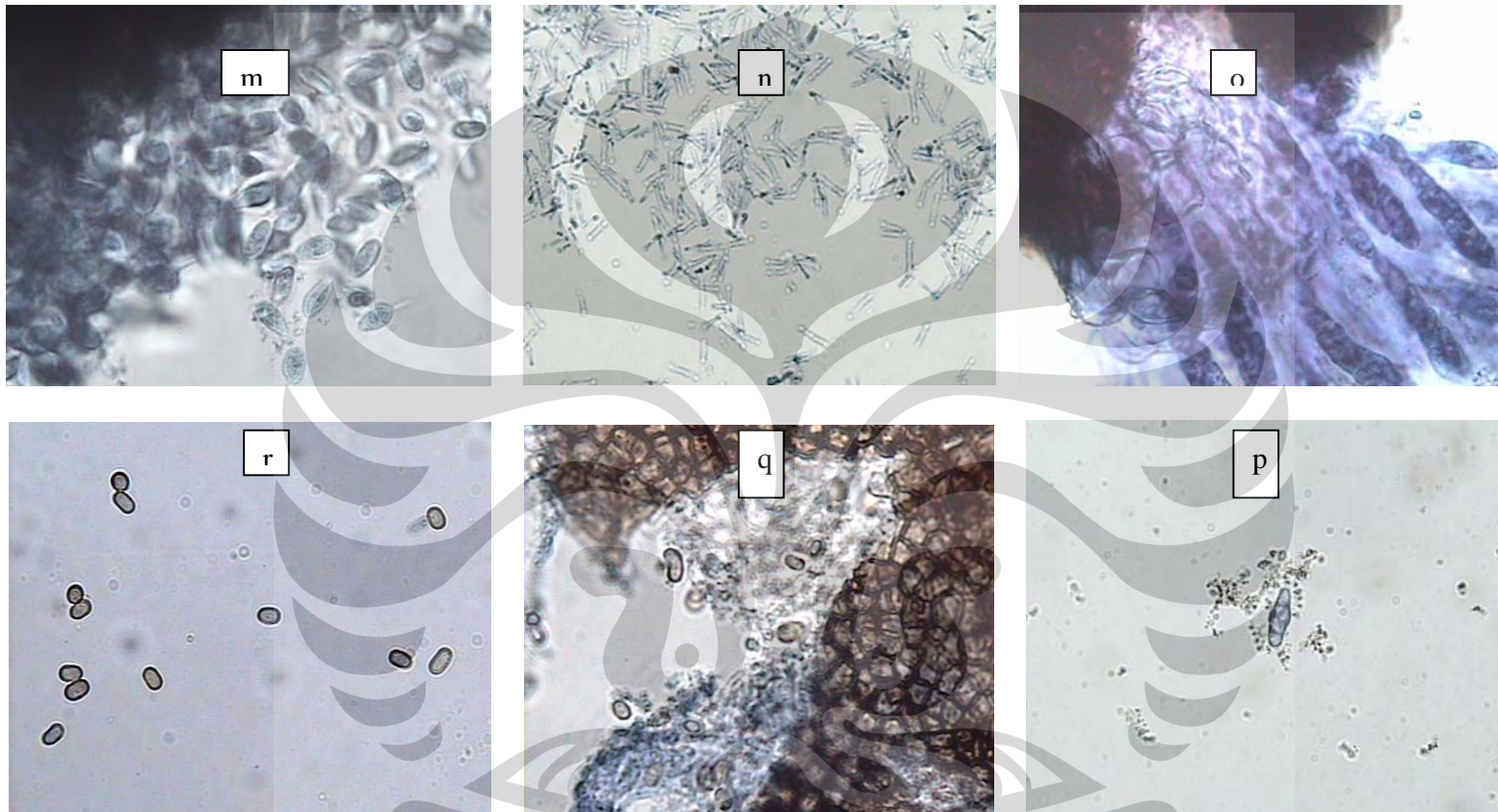
Keterangan: FP = Frekuensi per spesies $FK = \frac{FP}{\sum \text{total subsampel}} \times 100 \%$
 FK = Frekuensi kolonisasi



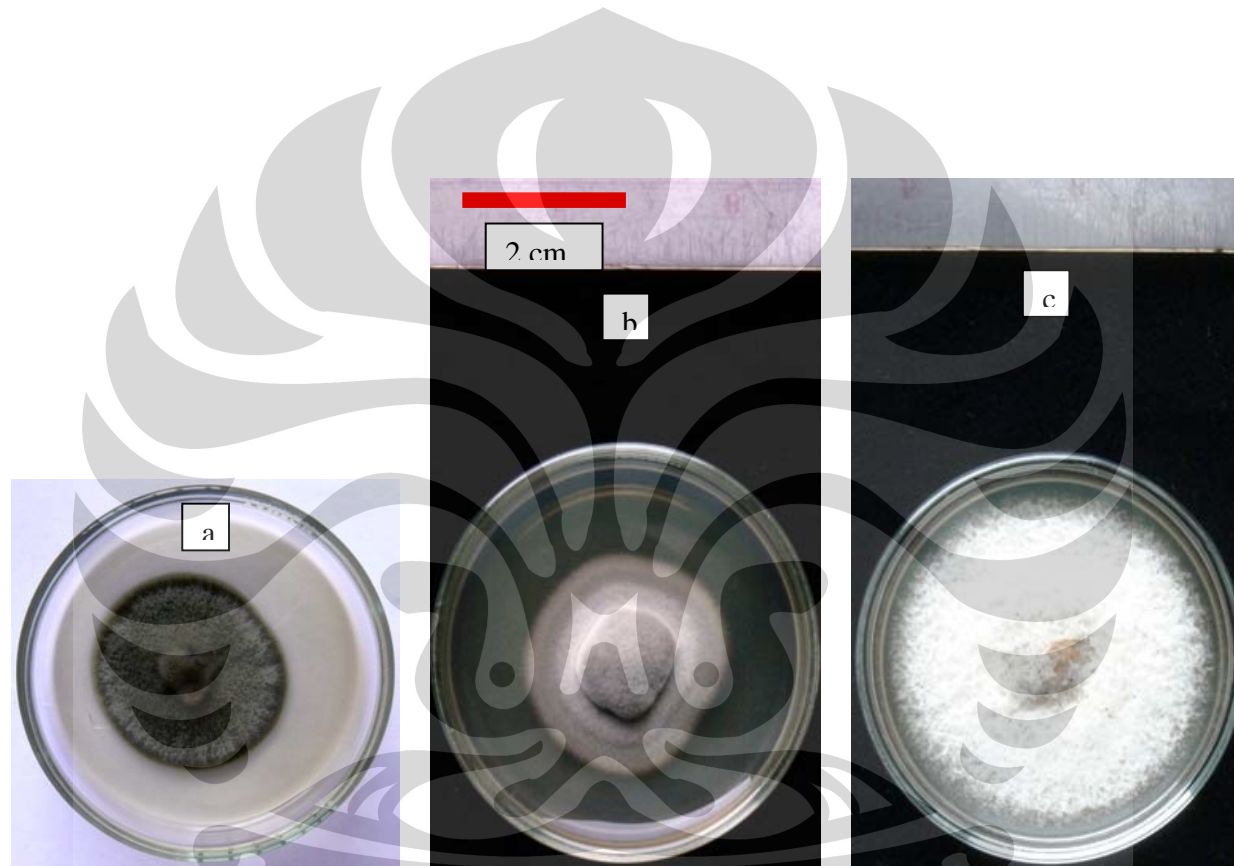
Lampiran I.4. (a) konidia *Cladosporium cladosporioides*; (b) konidia *Cladosporium sphaerospermum*; (c & d) konidia & apresoria *Cladosporium sphaerospermum*; (e & f) konidia & apresoria *Colletotrichum gloeosporioides*; (1000 X)



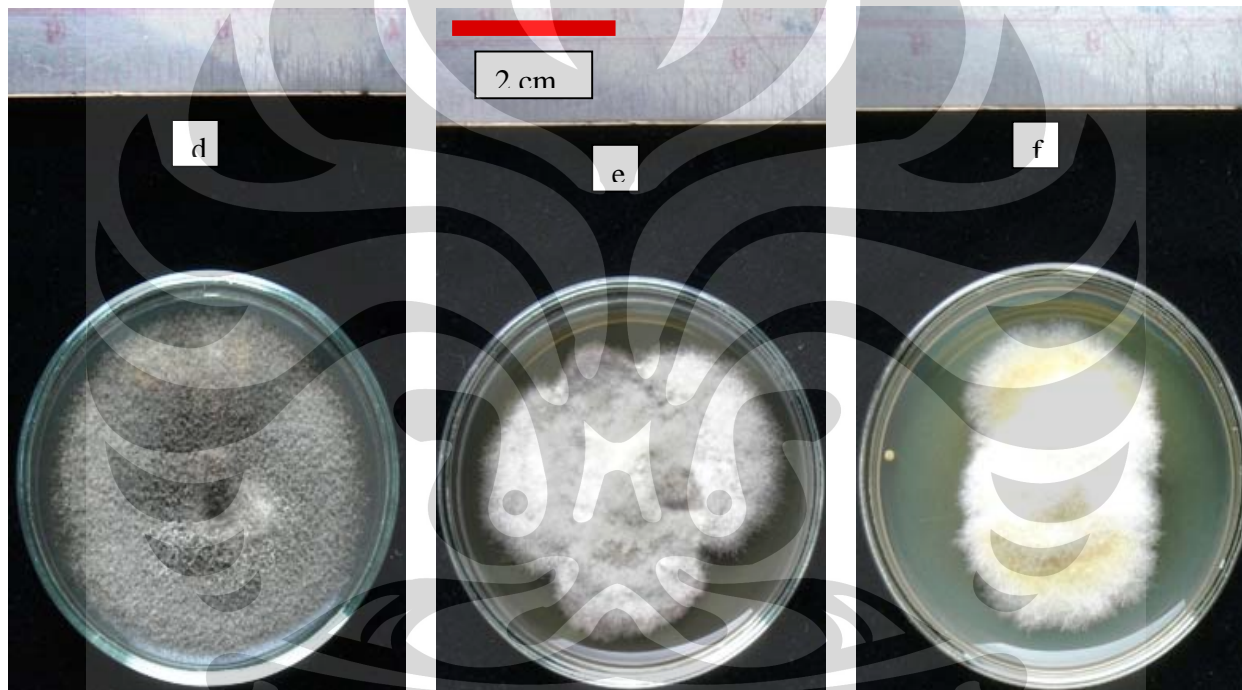
Lampiran I.5. (g) konidia *Curvularia brachyspora*; (h) konidia *Fusarium nivale*; (i) konidia *Fusarium solani*; (j) konidia *Pestalotiopsis* sp.; (k) konidia *Scolecobasidium* sp. (l) konidia *Xylohypha* sp. (1000 X)



Lampiran I.6. (m & n) konidia & spermatia *Phyllosticta capitalensis*; (o & p) askomata, askus & askospora *Guignardia endophyllicola*; (q & r) askomata & askospora *Westerdikella* sp. (1000 X)



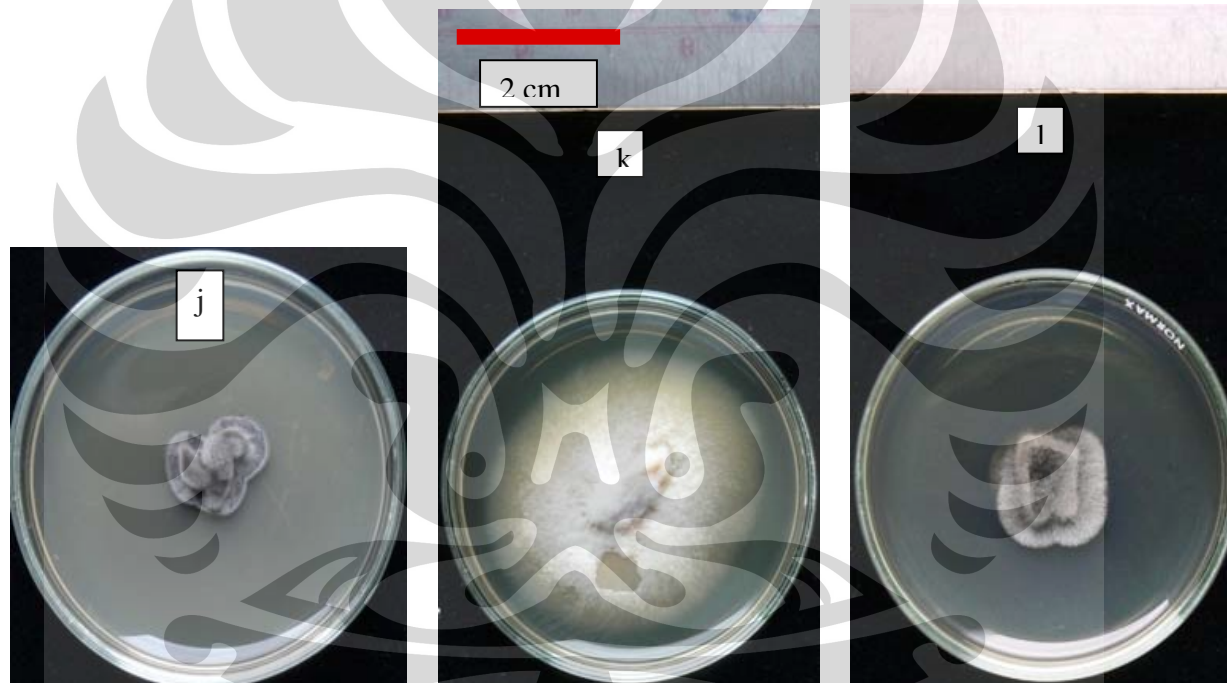
Lampiran I.7. (a) *Cladosporium cladosporioides*; (b) *Cladosporium sphaerospermum*;
(c) *Colletotrichum gloeosporioides*



Lampiran I.8. (d) *Colletotrichum* sp.; (e) *Curvularia brachyspora*;
(f) *Fusarium nivale*



Lampiran I.9. (g) *Fusarium solani*; (h) *Guignardia endophyllicola*; (i) *Pestalotiopsis* sp.



Lampiran I. 10. (j) *Scolecobasidium* sp.; (k) *Westerdikella* sp.; (l) *Xylohypha* sp.

Lampiran I.11. Data pengamatan makroskopis koloni kapang endofit dari *D. crumenatum*

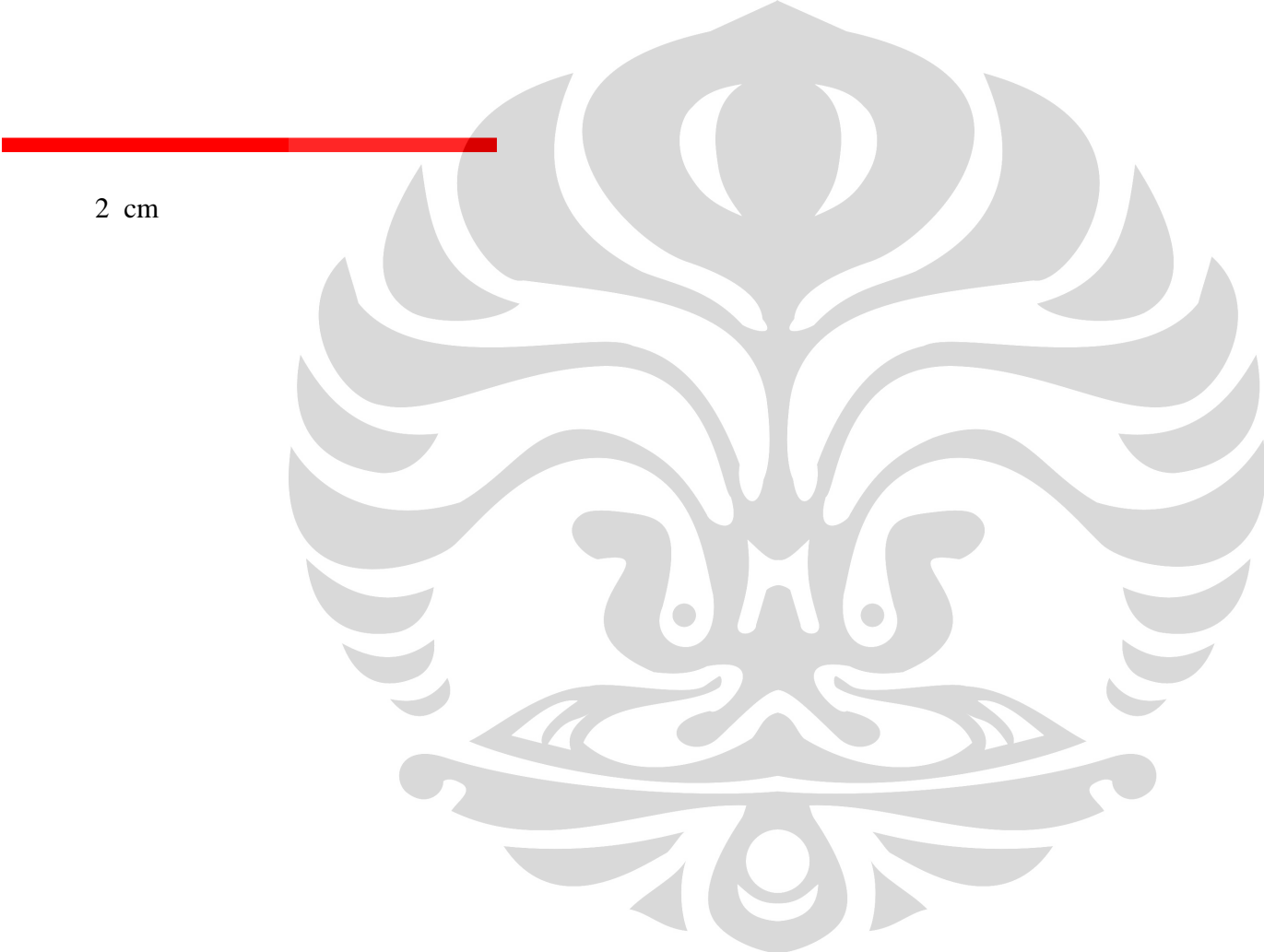
No	Kapang endofit	Kode isolat	Umur (hari)	Diameter (cm)	Warna	Eksudat	Warna sebalik koloni
Ascomycotina							
1.	<i>Guignardia endophyllicola</i> (Anamorf: <i>P. capitalensis</i>)	14T, 15T, 12K, 13K, 14K, 15K, 16K, 17K, 18K, 19K, 20K, 21K, 22K, 23K, 24K, 25K, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H, 8H, 9H, 10H, 11H, 12H, 13H	5	1,6–4,7	Hitam coklat	+	Hitam
2.	<i>Westerdikella</i> sp.	14H	5	3,8–4,1	Putih kuning oranye	-	Kuning oranye
Mitosporic Fungi (Deuteromycotina)							
3.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	15H, 1T, 16T, 1K, 2K, 3K, 4K	5	1,2–2,8	Abu-abu coklat	-	Hitam
4.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	5K, 2T	5	2,6–3,2	Putih biru hijau	-	Biru, tepi kuning oranye
5.	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	3T, 4T, 5T, 6T, 7T, 8T, 9T, 10T, 11T, 17T, 6K, 9K, 11K	5	4,1–4,3	Putih, tengah merah	+	Oranye merah
6.	<i>Colletotrichum</i> sp.	10K	5	3,6–3,9	Hitam putih oranye	+	Hitam oranye
7.	<i>Curvularia brachyspora</i>	18T	5	3,2–4,3	Putih biru hijau	-	Hitam coklat, tepi kuning oranye
8.	<i>Fusarium nivale</i>	26K	5	2,6–4,2	Putih kuning oranye	-	Kuning oranye
9.	<i>Fusarium solani</i>	16H, 7K	5	3,2–4,4	Merah kuning oranye	-	Kuning oranye
10.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1H	5	3,2–4,7	Merah biru hijau	+	Kuning merah
11.	<i>Scolecobasidium</i> sp.	8K	5	1,1–1,4	Hitam putih	-	Hitam
12.	<i>Xylohypha</i> sp.	12T, 13T	5	1,7–2,2	Hitam putih	-	Hitam

Lampiran I.12. Data pengamatan mikroskopis kapang endofit dari *D. crumenatum*

No	Kapang endofit	Kode isolat	Konidia (µm)		Askospora (µm)	Apresoria (µm)	Askus (µm)
			Makrokonidia	Mikrokonidia			
Ascomycotina							
1.	<i>Guignardia endophyllicola</i> (Anamorf: <i>P. capitalensis</i>)	14T, 15T, 12K, 13K, 14K, 15K, 16K, 17K, 18K, 19K, 20K, 21K, 22K, 23K, 24K, 25K, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H, 8H, 9H, 10H, 11H, 12H, 13H	8–12 x 5–7		12–18 x 3–5		52–98 x 10–14
2.	<i>Westerdykella</i> sp.	14H			4–5 x 2–2,5		
Mitosporic Fungi (Deuteromycotina)							
3.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	15H, 1T, 16T, 1K, 2K, 3K, 4K	3–8 x 2–4				
4.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	5K, 2T	3–4,5				
5.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	3T, 4T, 5T, 6T, 7T, 8T, 9T, 10T, 11T, 17T, 6K, 9K, 11K	6–26 x 2,5–4			6–16 x 4,5–6	
6.	<i>Colletotrichum</i> sp.	10K	5–16 x 3–5			12–25 x 5–12	
7.	<i>Curvularia brachyspora</i>	18T	12–27 x 9,5–19				
8.	<i>Fusarium nivale</i>	26K	10–45 x 2,5–4,5				
9.	<i>Fusarium solani</i>	16H, 7K	21–30 x 3–4,5	7–15x 2–3,5			
10.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1H	20–27 x 5–7,5				
11.	<i>Scolecobasidium</i> sp.	8K	7,5–18,5 x 2,5–4				
12.	<i>Xylohypha</i> sp.	12T, 13T	6–20 x 3,5–4				

Lampiran I.13. Skrining kapang endofit penghasil antimikroorganisme terhadap bakteri dan khamir

	Kapang endofit	Kode isolat	Indeks antimikroorganisme				
			<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
	Ascomycotina						
1.	<i>Guignardia endophyllicola</i> (Anamorf: <i>P. capitalensis</i>)	14T, 15T, 12K,13K, 14K, 15K,16K,17K, 18K, 19K, 20K, 21K, 22K, 23K, 24K, 25K, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H, 8H, 9H, 10H, 11H, 12H, 13H	-	-	-	-	-
2.	<i>Westerdykella</i> sp.	14H	-	-	-	-	-
	Mitosporic Fungi						
3.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	15H, 1T, 16T, 1K, 2K, 3K, 4K	-	-	-	-	-
4.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	5K, 2T	-	-	-	-	-
5.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	3T, 4T, 5T, 6T, 7T, 8T, 9T, 10T, 11T, 17T, 6K, 9K, 11K	-	-	-	-	-
6.	<i>Colletotrichum</i> sp.	10K	-	-	-	-	-
7.	<i>Curvularia brachyspora</i>	18T	-	-	-	-	-
8.	<i>Fusarium nivale</i>	26K	-	1,7 ± 0,02	1,3 ± 0,06	-	-
9.	<i>Fusarium solani</i>	16H, 7K	-	-	-	-	-
10.	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1H	-	-	-	-	-
11.	<i>Scolecobasidium</i> sp.	8K	-	-	-	-	-
12.	<i>Xylohypha</i> sp.	12T, 13T	-	-	-	-	-
	Kontrol negatif (air)		-	-	-	-	-
	Kloramfenikol (30µg)		4,8 ± 0,06	-	-	3,2 ± 0,12	2,8 ± 0,09
	Nistatin (100µg)		-	4,8 ± 0,11	4,8 ± 0,13	-	-



2 cm

Makalah II

OPTIMASI PRODUKSI ANTIKHAMIR KAPANG ENDOFIT *Fusarium nivale* (Fr.) Ces. DARI *Dendrobium crumenatum* Sw. (ANGGREK MERPATI)

Suciatmih

ABSTRACT

Fusarium nivale (Fr.) Ces. an endophytic mould was isolated from *Dendrobium crumenatum* Sw. (pigeon orchid) showed an antiyeast activity against *Candida albicans* ATCC 2091 and *Candida tropicalis* LIPIMC 203. Optimum conditions of the medium concerning the concentration of nitrogen and of carbon, pH, temperature, and agitation for the production of the antiyeast agent by *F. nivale* was studied. The optimum conditions were yeast extract (1 g l^{-1}), potato and dextrose (24 g l^{-1}), pH 6,0, temperature 25° C , and agitation of 90 rpm. The antiyeast activity was produced in both exponential and stationary phases. The production of antiyeast activity coincided with the increase in pH from 4.81 to 7.24-8.39. A maximum activity expressed as index of the antiyeast agent during growth of the mould which inhibited *C. albicans* (2.47 ± 0.12) and *C. tropicalis* (1.68 ± 0.04) was on the 9th day incubation respectively.

Key words: agitation, antiyeast activity, *C. albicans*, *C. tropicalis*, concentration of N & C sources; *F. nivale*, growth phase, media, pH, temperature

PENDAHULUAN

Metabolit sekunder yang dihasilkan mikroorganisme banyak menarik perhatian, khususnya bagi industri farmasi dan pertanian. Mikotoksin adalah salah satu metabolit sekunder berupa senyawa organik kompleks, dihasilkan oleh spesies kapang yang dikeluarkan ke dalam lingkungan mikro, yang dihuni kapang dan mikroorganisme lainnya. Mikotoksin tidak diperlukan

untuk pertumbuhan kapang, namun dapat membantu kapang untuk meningkatkan kemampuannya berkompetisi dengan organisme lain, menginvasi jaringan inang, dan sintasan (Norred & Riley 2001). Meskipun tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan, namun metabolit sekunder dapat juga berfungsi sebagai nutrisi darurat untuk bertahan hidup (Judoamidjojo *et al.* 1992).

Mikotoksin tidak dihasilkan oleh semua kapang. Beberapa spesies kapang hanya menghasilkan satu macam mikotoksin, sedangkan yang lainnya menghasilkan lebih dari satu mikotoksin. Beberapa mikotoksin yang sudah dikenal adalah aflatoksin, *ochratoxin*, *trichothecenes*, *fumonisin*, *zearalenone* and *patulin*. Mikotoksin tersebut dihasilkan oleh kapang dari genera *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps*, dan *Alternaria* (Boutrif & Bessy 2001).

Judoamidjojo *et al.* (1992) menginformasikan bahwa mikotoksin dapat diproduksi dengan metode fermentasi kultur permukaan dan fermentasi kultur rendam (*submerged culture*). Pada metode kultur permukaan, kapang tumbuh di lapisan permukaan medium. Metode kultur rendam memperlihatkan pertumbuhan kapang di bagian dalam permukaan medium di dalam labu kocok, drum berputar atau tangki dalam yang memerlukan agitasi dan aerasi.

Fusarium yang berinteraksi dengan tumbuhan, dapat menimbulkan gejala penyakit maupun tidak. Kapang tersebut mungkin saja sebagai agen utama penyebab penyakit, penginvasi sekunder, atau sebagai endofit.

Kapang endofit, *Fusarium*, yang sinergis dengan tumbuhan inangnya, menghasilkan mikotoksin yang dapat mencegah mikroorganisme lain penyebab penyakit dan hama tanaman. Mikotoksin *8-hydroxycalonectrin* (DHCAL) yang dihasilkan oleh *Fusarium graminearum* Schwabe bersifat toksik pada *Heliophthis zea* (Boddie) dan *Spodoptera frugiperda* (J. Smith) (Dowd *et al.* 1989). *Fusarium nivale* (Fr.) Ces. menghasilkan mikotoksin *nivalenol* yang dapat menghambat sintesis protein (Tatsumo 1968). Kapang yang sama menghasilkan *fusarenon-x* (Ueno *et al.* 1973) dan *deoxynivalenol* (DON, vomitoxin) (Logrieco *et al.* 1991). Dua turunan indol antikanker, *vincristine* dan *chaetoglobosin A*, dihasilkan *Fusarium oxysporum* Schleich. yang diisolasi dari *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Hua Wei Zhang *et al.* 2006). *Cerebrosides* dengan aktivitas antibakterinya, dihasilkan *Fusarium sp.* yang diisolasi dari *Cuercus variabilis* Blume (Hua Wei Zhang *et al.* 2006).

Berbagai faktor dapat mempengaruhi mikroorganisme dalam menghasilkan metabolit sekunder, antara lain sumber karbon, sumber nitrogen, suhu, dan pH (Atlas 1984; Judoamidjojo *et al.* 1992) dan O₂ (Suryani *et al.* 2000; Sundaran *et al.* 2001). Sumber karbon yang dapat digunakan untuk produksi metabolit sekunder, terutama antibiotik, di antaranya glukosa, laktosa, maltosa, pati, sukrosa dan sebagainya (Judoamidjojo *et al.* 1992). Sumber nitrogen yang diberikan ke dalam medium untuk kapang dapat berupa sumber nitrogen organik (asam amino, pepton, ekstrak khamir, dan urea) atau sumber nitrogen anorganik (NaNO₂, NaNO₃, NH₄Cl, dan NH₄NO₃) (Miller & Greenhalgh 1985).

Penelitian bertujuan melakukan pengujian optimasi, seperti pengaruh macam media, konsentrasi sumber karbon (C) dan sumber nitrogen (N) medium, pH, suhu, dan agitasi terhadap produksi antikhmir oleh *F. nivale*.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian dilaksanakan pada bulan Agustus-Desember 2007 di Laboratorium Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor.

BAHAN

Mikroorganisme

Mikroorganisme yang diuji potensinya dalam pengujian antikhmir adalah kapang endofit, *F. nivale*. Biakan khamir yang digunakan adalah *Candida albicans* ATCC 2091 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional, Badan POM; dan *Candida tropicalis* LIPIMC 203 yang diperoleh dari Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

Bahan kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah asam laktat 90 % (Merck),

nistatin 100 µg (Phapros), alkohol 70 %, spirtus bakar, *Yeast Extract* (YE) (Oxoid), CaCO₃, pepton (Oxoid), *Potato Dextrose Broth* (PDB) (Oxoid), *Malt Extract* (ME) (Oxoid), gula pasir, dan *Mueller Hinton* (MH) (Oxoid).

ALAT

Peralatan yang digunakan dalam penelitian meliputi: mikropipet (Eppendorf), *laminar air flow cabinet* (Holten), timbangan digital (Ohaus), inkubator (Mettler), oven listrik (Mettler), autoklaf (Hirayama), vortex (Fisher Scientific), jangka sorong, pH meter (Toink), *shaker incubator* (Certomat HK), dan sentrifuse (Kubota).

CARA KERJA

Medium peremajaan

Potato Dextrose Agar (PDA)

Masing-masing Erlenmeyer 300 ml diisi 9,75 g bubuk PDA dan 250 ml akuades kemudian dipanaskan sampai larut sempurna. Sebagian medium dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 5 ml, dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

Selanjutnya medium dituang ke dalam cawan petri diameter 9 cm; medium dalam tabung reaksi dimiringkan dan dibiarkan mengeras.

Medium perbanyakan

Potato Dextrose Broth (PDB)

Sebanyak 24,0 g bubuk PDB dan 1000 ml akuades dipanaskan sampai larut sempurna. Larutan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 5 ml, dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Medium fermentasi

Potato Dextrose Yeast (PDY)

Masing-masing Erlenmeyer 100 ml diisi 0,48 g bubuk PDB, 0,04 g YE, 0,1 g CaCO₃, dan akuades 20 ml. Selanjutnya medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Tauge Extract Broth (TEB)

Sebanyak 100 g tauge direbus sampai mendidih selama 2–3 jam, disaring dengan kapas, dan ditambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml. Masing-masing Erlenmeyer 100 ml diisi 1,2 g gula pasir, 0,1 g CaCO₃, dan 20 ml ekstrak taoge. Medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Malt Extract Broth (MEB)

Masing-masing Erlenmeyer 100 ml diisi 0,6 g bubuk ME, 0,1 g pepton,

0,1 g CaCO₃, dan akuades 20 ml. Selanjutnya medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Potato Dextrose Broth (PDB) ditambah pepton

Masing-masing Erlenmeyer 100 ml diisi 0,48 g bubuk PDB, 0,04 g pepton, 0,1 g CaCO₃, dan akuades 20 ml. Selanjutnya medium disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Medium pengujian

Mueller Hinton (MH)

Sebanyak 39,0 g bubuk MH dan 1000 ml akuades dipanaskan sampai larut sempurna. Larutan tadi dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 17 ml, dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan inokulum dan enumerasi kapang endofit

Sebanyak 2 ml akuades steril dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi kapang *F. nivale* berumur 7 hari. Biakan kemudian dikerik perlahan menggunakan jarum tanam untuk memperoleh suspensi konidia.

Suspensi konidia divorteks agar homogen dan selanjutnya ditentukan jumlah koloni dengan metode *Colony Forming Unit* (CFU) (Gandjar *et al.* 1992).

Pembuatan inokulum dan enumerasi khamir

Sebanyak 5 ml medium PDB dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi biakan khamir *C. albicans* dan *C. tropicalis* berumur 2 hari. Biakan kemudian dikerik perlahan dengan menggunakan jarum ose untuk memperoleh suspensi sel. Selanjutnya suspensi sel dimasukkan dalam *water bath* pada kecepatan agitasi 90 rpm (Agusta *et al.* 2005) dan suhu 30° C selama 24 jam. Jumlah koloni kedua khamir tersebut ditentukan dengan metode *Colony Forming Unit* (CFU) (Gandjar *et al.* 1992).

Optimasi produksi antikhamir *F. nivale*

1. Pengaruh antara media dan khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

Sebanyak 2 ml suspensi konidia *F. nivale* (2,4–3,0) x 10⁴ cfu/ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml yang masing-masing berisi 20 ml media PDY, TEB, MEB, dan PDBP. Media diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu ruang (26–28° C) dan kecepatan agitasi 90 rpm selama 5 hari (Agusta *et al.* 2005). Setiap perlakuan media dilakukan 6 ulangan.

Pemanenan antikhamir dilakukan dengan memisahkan biomassa sel dengan cara sentrifugasi 6000 rpm selama 10 menit (Prihatiningtias *et al.* 2005).

Supernatan digunakan sebagai *crude antimicrobial agent* untuk pengujian *bioassay*.

Setiap tabung yang berisi 17 ml medium MH diinokulasikan 0,2 ml masing-masing suspensi sel *C. albicans* dan *C. tropicalis* ($4,4-6,5 \times 10^7$ cfu/ml) lalu divorteks supaya homogen. Medium kemudian dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras. Penentuan antikhmir terhadap khamir uji menggunakan teknik kertas cakram *Kirby-Bauer* (Harmita & Radji 2004). Kertas cakram steril yang telah ditetesi 50 μ l supernatan *F. nivale* dan telah mengering, diletakkan di atas permukaan agar.

Cawan petri pertama baik untuk pengujian *C. albicans* maupun *C. tropicalis* berisi 4 kertas cakram, yaitu 2 kertas cakram mengandung masing-masing supernatan hasil fermentasi *F. nivale* yang ditumbuhkan pada media PDY dan TEB, 1 kertas cakram mengandung akuades steril (kontrol negatif), dan 1 kertas cakram mengandung antibiotik nistatin 100 μ g (kontrol positif). Cawan petri kedua berisi 4 kertas cakram, yaitu 2 kertas cakram masing-masing mengandung supernatan hasil fermentasi *F. nivale* yang ditumbuhkan pada media MEB dan PDBP, 1 kertas cakram mengandung antibiotik nistatin 100 μ g (kontrol positif), dan 1 kertas cakram mengandung akuades steril (kontrol negatif). Inkubasi khamir dilakukan pada suhu 30° C selama 24 jam.

2. Pengaruh antara konsentrasi sumber N dan sumber C medium PDY, serta khamir *Candida* terhadap indeks antikhmir *F. nivale*

Medium fermentasi PDY yang menghasilkan antikhmir tertinggi,

diuji lebih lanjut dengan khamir *Candida*. Sebanyak 2 ml suspensi konidia *F. nivale* ($2,4-3,0 \times 10^4$ cfu/ml) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml yang masing-masing berisi 20 ml medium PDY yang mengandung konsentrasi N berupa YE dan konsentrasi C berupa kentang dan dekstrosa, yaitu $N_0 C_0$ (1 gl^{-1} sumber N dan 20 gl^{-1} sumber C), $N_0 C_1$ (1 gl^{-1} sumber N dan 24 gl^{-1} sumber C), $N_0 C_2$ (1 gl^{-1} sumber N dan 28 gl^{-1} sumber C); $N_1 C_0$ (2 gl^{-1} sumber N dan 20 gl^{-1} sumber C), $N_1 C_1$ (2 gl^{-1} sumber N dan 24 gl^{-1} sumber C), $N_1 C_2$ (2 gl^{-1} sumber N dan 28 gl^{-1} sumber C); dan $N_2 C_0$ (3 gl^{-1} sumber N dan 20 gl^{-1} sumber C), $N_2 C_1$ (3 gl^{-1} sumber N dan 24 gl^{-1} sumber C), $N_2 C_2$ (3 gl^{-1} sumber N dan 28 gl^{-1} sumber C). Medium yang telah diinokulasi dengan *F. nivale* kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu ruang ($26-28^\circ \text{C}$) dan kecepatan agitasi 90 rpm selama 5 hari (Agusta *et al.* 2005). Setiap perlakuan konsentrasi sumber N dan sumber C medium dilakukan 5 ulangan.

Pemanenan antikhamir dilakukan seperti pada pengujian No 1 (halaman 60).

Masing-masing tabung berisi 17 ml medium MH diinokulasikan 0,2 ml masing-masing suspensi sel *C. albicans* dan *C. tropicalis* ($4,4-6,5 \times 10^7$ cfu/ml) lalu divorteks supaya homogen. Medium kemudian dituang dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras. Penentuan antikhamir terhadap khamir uji dilakukan seperti pada pengujian No 1 (halaman 61).

3. Pengaruh antara pH medium PDY (1 gl^{-1} sumber N dan 24 gl^{-1} sumber C), serta khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

Medium fermentasi PDY (1 gl^{-1} sumber N dan 24 gl^{-1} sumber C) yang

menghasilkan antikhamir tertinggi, diuji lebih lanjut dengan khamir *Candida*. Sebanyak 2 ml suspensi konidia *F. nivale* ($2,4-3,0$) $\times 10^4$ cfu/ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml yang masing-masing berisi 20 ml medium PDY (1 gl^{-1} sumber N dan 24 gl^{-1} sumber C) pada pH 4,0 (ditambah 300 μl asam laktat 90 %), pH 5,0 (ditambah 180 μl asam laktat 90 %), pH 6,0 (ditambah 40 μl asam laktat 90 %), dan pH 7,0 (tidak ditambah asam laktat 90 %). Medium diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu ruang ($26-28^\circ \text{C}$) dan kecepatan agitasi 90 rpm selama 5 hari (Agusta *et al.* 2005). Setiap perlakuan pH medium dilakukan 6 ulangan. Pemanenan antikhamir dilakukan seperti pada pengujian No 1 (halaman 60).

Masing-masing tabung berisi 17 ml medium MH diinokulasikan 0,2 ml masing-masing suspensi sel *C. albicans* dan *C. tropicalis* ($4,4-6,5$) $\times 10^7$ cfu/ml lalu divorteks supaya homogen. Medium kemudian dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras. Penentuan antikhamir terhadap khamir uji dilakukan seperti pada pengujian No 1 (halaman 61).

4. Pengaruh antara suhu medium PDY (1 gl^{-1} sumber N dan 24 gl^{-1} sumber C) pada pH 6,0, serta khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

Medium fermentasi PDY (1 gl^{-1} sumber N dan 24 gl^{-1} sumber C) pada pH 6,0 yang menghasilkan antikhamir tertinggi, diuji lebih lanjut dengan khamir *Candida*. Sebanyak 2 ml suspensi konidia *F. nivale* ($2,4-3,0$) $\times 10^4$

cfu/ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml yang masing-masing berisi 20 ml medium PDY (1 g^l-1 sumber N dan 24 g^l-1 sumber C) dengan pH 6,0, diinkubasi pada suhu 25, 30, 35, dan 40° C dalam *shaker incubator* pada agitasi 90 rpm selama 5 hari (Agusta *et al.* 2005). Setiap perlakuan suhu medium dilakukan 6 ulangan. Pemanenan antikhmir dilakukan seperti pada pengujian No 1 (halaman 60).

Masing-masing tabung berisi 17 ml medium MH diinokulasikan 0,2 ml masing-masing suspensi sel *C. albicans* dan *C. tropicalis* (4,4–6,5) x 10⁷ cfu/ml lalu divorteks supaya homogen. Medium kemudian dituang dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras. Penentuan antikhmir terhadap khamir uji dilakukan seperti pada pengujian No 1 (halaman 61).

5. Pengaruh antara agitasi medium PDY (1 g^l-1 sumber N dan 24 g^l-1 sumber C) pada pH 6,0 dan suhu 25° C, serta khamir *Candida* terhadap indeks antikhmir *F. nivale*

Medium fermentasi PDY (1 g^l-1 sumber N dan 24 g^l-1 sumber C) pada pH 6,0 dan suhu inkubasi 25° C yang menghasilkan antikhmir tertinggi, diuji lebih lanjut dengan khamir *Candida*. Sebanyak 2 ml suspensi konidia

F. nivale (2,4–3,0) x 10⁴ cfu/ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml yang masing-masing berisi 20 ml medium PDY (1 g^l-1 sumber N dan 24 g^l-1 sumber C) pada pH 6,0, diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 25° C pada kecepatan agitasi 0, 80, 90, dan 100 rpm selama 5 hari. Setiap perlakuan agitasi medium dilakukan 6 ulangan. Pemanenan antikhmir dilakukan seperti pada pengujian No 1 (halaman 60).

Masing-masing tabung berisi 17 ml medium MH diinokulasikan 0,2 ml masing-masing suspensi sel *C. albicans* dan *C. tropicalis* ($4,4-6,5$) $\times 10^7$ cfu/ml lalu divorteks supaya homogen. Medium kemudian dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras. Penentuan antikhamir terhadap khamir uji dilakukan seperti pada pengujian No 1 (halaman 61).

Kurva produksi antikhamir dan berat biomassa *F. nivale*

Kapang endofit *F. nivale* ditumbuhkan pada medium PDY (1 gl⁻¹ sumber N dan 24 gl⁻¹ sumber C) pada pH 6,0, suhu inkubasi 25° C, dan agitasi 90 rpm yang menghasilkan antikhamir tertinggi, dibuat kurva produksi dan berat biomasanya. Sebanyak 2 ml suspensi konidia *F. nivale* ($2,4-3,0$) $\times 10^4$ cfu/ml diinokulasikan ke Erlenmeyer 100 ml yang masing-masing berisi 20 ml medium fermentasi PDY (1 gl⁻¹ sumber N dan 24 gl⁻¹ sumber C) dengan pH 6,0, diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 25° C dan kecepatan agitasi 90 rpm selama 12 hari. Setiap perlakuan dilakukan 3 ulangan. Pemanenan antikhamir dilakukan seperti pada pengujian No 1 (halaman 60).

Tabung yang masing-masing berisi 17 ml medium MH diinokulasikan 0,2 ml masing-masing suspensi sel *C. albicans* dan *C. tropicalis* ($4,4-6,5$) $\times 10^7$ cfu/ml lalu divorteks supaya homogen. Medium kemudian dituang dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras. Penentuan antikhamir terhadap khamir uji dilakukan seperti pada pengujian No 1 (halaman 61).

Pengukuran antikhmir dan berat kering biomassa sel dilakukan pada hari ke: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, dan 12.

Rancangan percobaan dan analisis data

Pengujian media, konsentrasi sumber N dan sumber C medium, pH, suhu, dan agitasi yang dikombinasikan dengan khamir *Candida* dilakukan dengan rancangan acak lengkap pola faktorial (Gomez & Gomez 1984). Faktor pertama adalah media, pH, suhu, dan agitasi, sedangkan faktor kedua khamir *Candida* pada pengujian media, pH, suhu, dan agitasi yang dikombinasikan dengan khamir *Candida*. Faktor pertama adalah konsentrasi sumber N, faktor kedua konsentrasi sumber C, dan faktor ketiga khamir *Candida* pada pengujian konsentrasi sumber N dan sumber C medium yang dikombinasikan dengan khamir *Candida*. Data hasil penelitian dianalisis dengan Analisis Varian (ANOVA) berdasarkan uji F dan perlakuan yang berbeda nyata diuji lebih lanjut dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) (Gomez & Gomez 1984). Uji tersebut untuk mengetahui pengaruh tertinggi dan terendah dari kombinasi antara jenis media, konsentrasi sumber N dan sumber C medium, pH, suhu, dan agitasi dengan khamir *Candida* terhadap indeks antikhmir.

Uji hubungan antara perubahan pH medium dan indeks antikhmir, antara perubahan pH medium dan berat biomassa sel, dan antara berat biomassa sel dan indeks antikhmir menggunakan analisis regresi dan korelasi (Gomez & Gomez 1984).

Parameter

Parameter yang diamati untuk semua pengujian adalah indeks antikhamir (Sudiana *et al.* 2001). Adanya aktivitas antikhamir ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening di sekeliling kertas cakram. Indeks antikhamir ditentukan oleh besarnya diameter zona bening di sekeliling kertas cakram dibagi diameter terluar kertas cakram. Pengukuran zona bening dilakukan dengan menggunakan jangka sorong.

HASIL

Optimasi produksi antikhamir *F. nivale*

1. Pengaruh antara media dan khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

Hasil analisis ANAVA antara media dan khamir *Candida* terhadap

indeks antikhamir menunjukkan pengaruh yang sangat nyata (α 0,01) baik di antara media, di antara khamir *Candida*, maupun di antara interaksi keduanya terhadap indeks antikhamir.

Berdasarkan uji BNT, ada perbedaan yang sangat nyata (α 0,01) antara medium PDY dan *C. albicans* dengan masing-masing media TEB, MEB, dan PDBP dengan *C. albicans* dan *C. tropicalis* terhadap indeks antikhamir. Interaksi antara medium PDY dan *C. albicans* menghasilkan indeks antikhamir tertinggi ($2,30 \pm 0,11$) (Tabel II.1).

Tabel II.1. Pengaruh antara media dan khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

Media	Spesies <i>Candida</i>	Indeks antikhamir
PDY	<i>Candida albicans</i>	$2,30 \pm 0,11$ a
TEB		$1,65 \pm 0,05$ d
MEB		$2,16 \pm 0,08$ b
PDBP		$1,96 \pm 0,08$ c
PDY	<i>Candida tropicalis</i>	$1,63 \pm 0,08$ de
TEB		$1,30 \pm 0,00$ f
MEB		$1,56 \pm 0,08$ e
PDBP		$1,35 \pm 0,08$ f

Kontrol negatif (air)		0
Kontrol positif (nistatin 100 µg)		4,80 ± 0,02

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda sangat nyata pada taraf 1 %; PDY= *Potato Dextrose Yeast*; TEB= *Taoge Extract Broth*; MEB= *Malt Extract Broth*; PDBP= *Potato Dextrose Broth Pepton*

2. Pengaruh antara konsentrasi sumber N dan sumber C medium PDY, serta khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

Analisis ANAVA antara konsentrasi sumber N dan sumber C medium PDY, dan khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir menunjukkan pengaruh yang sangat nyata ($\alpha 0,01$) baik di antara konsentrasi sumber N, di antara konsentrasi sumber C, maupun di antara khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir. Selain interaksi antara sumber C dan khamir *Candida*, interaksi lainnya, seperti interaksi antara sumber N dan sumber C, interaksi antara sumber N dan khamir *Candida*, dan interaksi antara ketiganya (sumber N, sumber C, dan khamir *Candida*) tidak berbeda nyata ($\alpha 0,05$) terhadap indeks antikhamir.

Hasil uji BNT menunjukkan bahwa antikhamir *F. nivale* menghambat pertumbuhan *C. albicans* lebih besar dan berbeda sangat nyata ($\alpha 0,01$) dibandingkan *C. tropicalis*. Konsentrasi sumber N (1 gl^{-1}) menghasilkan indeks antikhamir tertinggi dan berbeda sangat nyata ($\alpha 0,01$) dengan konsentrasi sumber N lainnya. Konsentrasi sumber C (24 gl^{-1}) menghasilkan indeks antikhamir tertinggi dan berbeda sangat nyata ($\alpha 0,01$) dengan konsentrasi sumber C lainnya. Interaksi antara sumber N (1 gl^{-1}) dan sumber

C (24 gl^{-1}) medium PDY, serta *C. albicans* menghasilkan indeks antikhamir tertinggi ($2,20 \pm 0,25$), tetapi tidak berbeda nyata ($\alpha 0,05$) dengan interaksi lainnya (Tabel II.2).

Tabel II.2. Pengaruh antara konsentrasi sumber N dan sumber C medium PDY, serta khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

N (gl^{-1})	C (gl^{-1})	Spesies <i>Candida</i>	Indeks antikhamir
1	20	<i>Candida albicans</i>	$1,60 \pm 0,13$
	24		$2,20 \pm 0,25$
	28		$2,00 \pm 0,00$
2	20		$1,80 \pm 0,16$
	24		$2,10 \pm 0,24$
	28		$1,90 \pm 0,09$
3	20		$1,80 \pm 0,13$
	24		$2,10 \pm 0,26$
	28		$1,80 \pm 0,11$
1	20	<i>Candida tropicalis</i>	$1,54 \pm 0,15$
	24		$1,58 \pm 0,05$
	28		$1,52 \pm 0,11$
2	20		$1,40 \pm 0,12$
	24		$1,50 \pm 0,16$

	28		1,42 ± 0,11
3	20		1,38 ± 0,08
	24		1,46 ± 0,15
	28		1,30 ± 0,00
Kontrol negatif (air)			0
Kontrol positif (nistatin 100 µg)			4,80 ± 0,05

3. Pengaruh antara pH medium PDY (1 gl⁻¹ sumber N dan 24 gl⁻¹ sumber C), serta khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

Analisis ANAVA antara pH medium PDY (1 gl⁻¹ sumber N dan 24 gl⁻¹ sumber C) serta khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir menunjukkan bahwa selain interaksi antara pH medium dan khamir *Candida*, ada pengaruh yang sangat nyata (α 0,01) di antara pH medium dan di antara khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir.

Hasil uji BNT menunjukkan bahwa antikhamir *F. nivale* menghambat pertumbuhan *C. albicans* lebih besar dan berbeda sangat nyata (α 0,01) dibandingkan *C. tropicalis*. *Fusarium nivale* yang ditumbuhkan pada pH 6,0, menghasilkan indeks antikhamir tertinggi dan berbeda sangat nyata dengan pH lainnya. Interaksi antara pH medium 6,0 dan *C. albicans* menghasilkan indeks antikhamir tertinggi (2,12 ± 0,12), tetapi tidak berbeda nyata (α 0,05) dengan interaksi lainnya (Tabel II.3).

Tabel II.3. Pengaruh antara pH medium dan khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

pH	Spesies <i>Candida</i>	Indeks antikhamir
----	------------------------	-------------------

4,0	<i>Candida albicans</i>	1,60 ± 0,06
5,0		1,83 ± 0,17
6,0		2,12 ± 0,12
7,0		1,73 ± 0,10
4,0	<i>Candida tropicalis</i>	1,20 ± 0,06
5,0		1,33 ± 0,14
6,0		1,42 ± 0,15
7,0		1,25 ± 0,05
Kontrol negatif (air)		0
Kontrol positif (nistatin 100 µg)		4,80 ± 0,02

4. Pengaruh antara suhu medium PDY (1 gl⁻¹ sumber N dan 24 gl⁻¹ sumber C) pada pH 6,0, serta khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

Analisis ANAVA antara suhu medium PDY (1 gl⁻¹ sumber N dan 24 gl⁻¹ sumber C) pada pH 6,0, dan khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir menunjukkan pengaruh yang sangat nyata (α 0,01) baik di antara suhu medium, di antara khamir *Candida*, maupun di antara interaksi keduanya terhadap indeks antikhamir.

Berdasarkan uji BNT, interaksi antara suhu medium 25° C dan *C. albicans* menghasilkan indeks antikhamir tertinggi (2,30 ± 0,06) dan berbeda sangat nyata (α 0,01) dengan interaksi lainnya. Interaksi antara

masing-masing suhu medium 35 dan 40° dengan *C. albicans* dan *C. tropicalis* tidak berbeda sangat nyata terhadap indeks antikhamir (Tabel II.4).

Tabel II.4. Pengaruh antara suhu medium dan khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

Suhu (° C)	Spesies <i>Candida</i>	Indeks antikhamir
25	<i>Candida albicans</i>	2,30 ± 0,06 a
30		2,10 ± 0,15 b
35		0,71 ± 0,00* d
40		0,71 ± 0,00* d
25	<i>Candida tropicalis</i>	1,58 ± 0,08 c
30		1,47 ± 0,15 c
35		0,71 ± 0,00* d
40		0,71 ± 0,00* d
Kontrol negatif (air)		0
Kontrol positif (nistatin 100 µg)		4,80 ± 0,04

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda sangat nyata pada taraf 1 %; * dikonversi dengan $\sqrt{x + 0,5}$,

5. Pengaruh antara agitasi medium PDY (1 gl⁻¹ sumber N dan 24 gl⁻¹ sumber C) pada pH 6,0 dan suhu 25° C, serta khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

Analisis ANAVA antara agitasi medium PDY (1 gl⁻¹ sumber N dan 24 gl⁻¹ sumber C) pada pH 6,0 dan suhu 25° C, serta khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir menunjukkan pengaruh yang sangat nyata (α 0,01) baik di antara agitasi, di antara khamir *Candida*, maupun di antara interaksi keduanya terhadap indeks antikhamir.

Berdasarkan uji BNT, kecuali dengan interaksi antara agitasi medium 100 rpm dan *C. albicans*, interaksi antara agitasi medium 90 rpm dan

C. albicans, berbeda sangat nyata (α 0,01) dengan interaksi lainnya terhadap indeks antikhamir. Interaksi antara agitasi medium 90 rpm dan *C. albicans* menghasilkan indeks antikhamir tertinggi ($2,30 \pm 0,04$) (Tabel II.5).

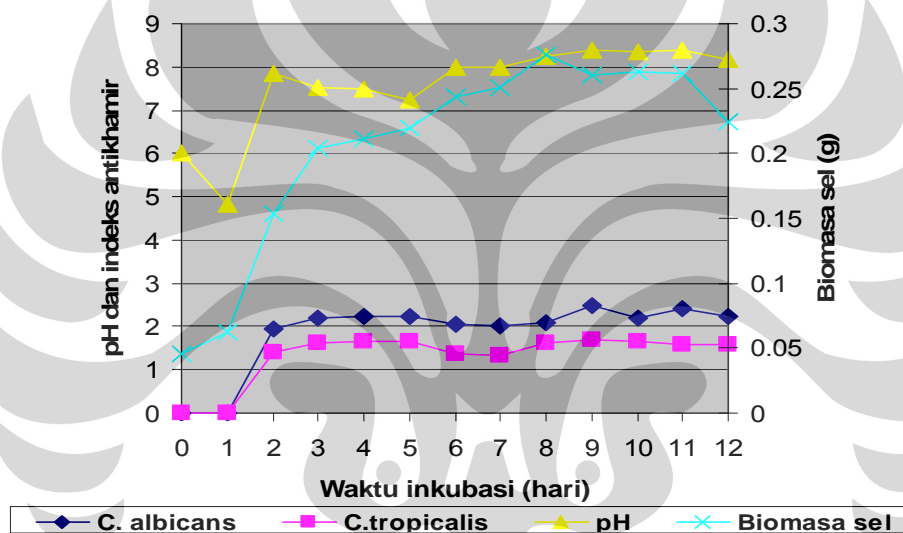
Tabel II.5. Pengaruh antara agitasi dan khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

Agitasi (rpm)	Spesies <i>Candida</i>	Indeks antikhamir
0	<i>Candida albicans</i>	$1,57 \pm 0,21$ c
80		$2,03 \pm 0,20$ b
90		$2,30 \pm 0,04$ a
100		$2,13 \pm 0,16$ ab
0	<i>Candida tropicalis</i>	$1,28 \pm 0,04$ d
80		$1,45 \pm 0,14$ cd
90		$1,58 \pm 0,08$ c
100		$1,50 \pm 0,15$ cd
Kontrol negatif (air)		0
Kontrol positif (nistatin 100 μ g)		$4,80 \pm 0,06$

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda sangat nyata pada taraf 1 %

Kurva produksi antikhmir dan berat biomassa *F. nivale*

Hasil optimasi medium adalah medium PDY (1 gl^{-1} sumber N dan 24 gl^{-1} sumber C) pada pH 6,0, suhu 25° C, dan agitasi 90 rpm; yang diinkubasi selama 12 hari, digunakan untuk membuat kurva produksi antikhmir dan berat biomassa *F. nivale* (Gambar II.1).



Gambar II.1. Kurva perubahan pH medium, biomassa, dan indeks antikhmir *F. nivale* terhadap *C. albicans* dan *C. tropicalis*, pada waktu inkubasi 12 hari

Tabel II.6 memperlihatkan korelasi yang sangat nyata antara perubahan pH medium dan indeks antikhmir, baik terhadap *C. albicans* maupun *C. tropicalis*; antara perubahan pH medium dan berat biomassa sel; serta antara berat biomassa sel dan indeks antikhmir, baik terhadap *C. albicans* maupun *C. tropicalis*.

Tabel II.6. Korelasi antara pH medium dan indeks antikhmir, antara pH medium dan biomassa sel, dan antara biomassa sel dan indeks antikhmir

No	Parameter	Persamaan garis	r hitung	r tabel (1 %)
1.	pH x indeks antikhmir (<i>Candida albicans</i>)	$Y = 0,70 x - 3,49$ ($r^2 = 0,80$)	0,90**	0,418
2.	pH x indeks antikhmir (<i>Candida tropicalis</i>)	$Y = 0,49 x - 2,43$ ($r^2 = 0,78$)	0,89**	0,418
3.	pH x biomassa sel	$Y = 0,06 x - 0,27$ ($r^2 = 0,76$)	0,87**	0,418
4.	Biomassa sel x indeks antikhmir (<i>Candida albicans</i>)	$Y = 9,77 x - 0,16$ ($r^2 = 0,80$)	0,90**	0,418
5.	Biomassa sel x indeks antikhmir (<i>Candida tropicalis</i>)	$Y = 6,75 x - 0,07$ ($r^2 = 0,76$)	0,87**	0,418

Keterangan: ** = berbeda sangat nyata pada taraf 1 %

PEMBAHASAN

Optimasi produksi antikhmir *F. nivale*

1. Pengaruh antara media dan khamir *Candida* terhadap indeks antikhmir *F. nivale*

Adanya interaksi antara media dan khamir *Candida* yang sangat nyata, mengindikasikan bahwa antara media dan khamir *Candida* tidak saling bebas, satu sama lain berpengaruh terhadap indeks antikhmir (Tabel II.1). Perbedaan komposisi nutrisi yang terkandung dalam media dan perbedaan respon khamir *Candida* menyebabkan indeks antikhmir berbeda.

Interaksi antara medium PDY dan *C. albicans* menghasilkan indeks antikhmir tertinggi dan berbeda sangat nyata dengan media TEB, MEB, dan PDBP. Kemungkinannya sumber N berupa YE dan sumber C berupa kentang-dekstrosa yang terkandung dalam medium PDY merupakan sumber N dan sumber C yang baik untuk pertumbuhan dan produksi antikhmir oleh *F. nivale*. Poedjiadi (1994) menginformasikan bahwa kentang atau amilum terdiri dari dua macam polisakarida, yaitu amilosa dan amilopektin. Medium PDY dapat digunakan sebagai medium fermentasi yang selama ini digunakan untuk pengujian metabolit sekunder oleh kapang endofit (Syarmalina *et al.* 2003; Kumala 2005). Medium lainnya, seperti TEB mengandung sumber C berupa sukrosa dan sumber N berupa tauge, medium MEB mengandung sumber C berupa ME dan sumber N berupa pepton, dan medium PDBP mengandung sumber C berupa kentang-dekstrosa dan sumber N berupa pepton. Dawes & Sutherland (1992) melaporkan bahwa komposisi ME adalah glukosa, fruktosa, maltosa, dan maltotriosa (trisakarida), sehingga pada medium MEB mengandung 4 sumber C tersebut. Judoamidjojo *et al.* (1992) menginformasikan bahwa selama proses fermentasi, sumber karbon pada medium akan dimanfaatkan untuk pembentukan biomassa sel dan senyawa metabolit sekunder. Peneliti yang sama melaporkan bahwa apabila terdapat dua sumber karbon yang berbeda di dalam medium maka sumber karbon tersebut akan digunakan secara bertahap, yaitu sumber karbon dengan bobot molekul lebih rendah akan digunakan terlebih dahulu untuk proses

metabolisme, sedangkan sumber karbon dengan bobot molekul lebih besar akan digunakan setelah sumber karbon pertama telah habis.

Kandungan sumber N yang berbeda dalam medium dapat mempengaruhi indeks antikhmir. *Yeast extract* sebagai sumber N yang terkandung dalam medium PDY mempunyai peranan meningkatkan indeks antikhmir oleh *F. nivale*. Kemungkinannya karena YE tidak hanya mengandung nitrogen organik tetapi juga vitamin, mineral, dan gula (de Roubin *et al.* 1991) serta kofaktor (O'Connor-Cox *et al.* 1991). Hasil yang sama pada penggunaan YE sebagai sumber N dilaporkan pada produksi *compactin* oleh *Penicillium brevicompactum* Dierckx (Konya *et al.* 1998) dan produksi *hepatitis B virus pre-S₂ antigen* oleh *Hansenula polymorpha* (de Roubin *et al.* 1991).

Candida albicans dan *C. tropicalis* mempunyai respon yang berbeda terhadap antikhmir. *Candida albicans* lebih peka daripada *C. tropicalis* terhadap antikhmir. Hasil yang sama diperlihatkan *C. tropicalis* yang lebih virulen daripada *C. albicans* pada tikus yang diberi antibiotik dan *cytarabine* (Wingard *et al.* 1982); dan pada tikus yang diberi gentamisin dan *cytarabine*, *C. tropicalis* dapat mempenetrasi *damaged gastrointestinal mucosa* sebanyak 69 %, sedangkan *C. albicans* hanya 23 % (Wingard *et al.* 2001). Perbedaan respon kedua khamir tersebut mungkin disebabkan oleh spesiesnya berbeda. Strobel & Daisy (2003) menginformasikan bahwa *Fusarium* sp. yang diisolasi dari *Selaginella pallescens* (Presl.) Spring menghasilkan *pentaketida* yang bersifat antikhmir terhadap *C. albicans*.

2. Pengaruh antara konsentrasi sumber N dan sumber C medium PDY, serta khamir *Candida* terhadap indeks antikhmir *F. nivale*

Interaksi antara konsentrasi sumber N dan sumber C medium PDY, serta khamir *Candida* yang tidak berpengaruh nyata, mengindikasikan bahwa antara sumber N dan sumber C medium PDY, serta khamir *Candida* saling bebas mempengaruhi indeks antikhmir. Interaksi antara konsentrasi sumber N (1 gl^{-1}) dan sumber C (24 gl^{-1}) dalam medium PDY, dan *C. albicans* menghasilkan indeks antikhmir tertinggi ($2,20 \pm 0,25$).

Konsentrasi sumber N yang berbeda dalam medium PDY dapat mempengaruhi indeks antikhmir. Konsentrasi sumber N (1 gl^{-1}) berupa YE menghasilkan indeks antikhmir tertinggi dan berbeda sangat nyata dengan konsentrasi sumber N lainnya. Kemungkinannya konsentrasi sumber N (1 gl^{-1}) berupa YE merupakan konsentrasi yang baik untuk pertumbuhan dan produksi antikhmir oleh *F. nivale*. Apabila dibandingkan dengan konsentrasi sumber N yang terkandung pada medium PDY (2 gl^{-1}) (Syarmalina *et al.* 2003; Kumala 2005), hasil tersebut dapat menghemat penggunaan sumber N sebanyak 1 gl^{-1} N (50 %). Konsentrasi YE 1,25 % (w/v) adalah sangat nyata meningkatkan produksi etanol oleh khamir *Saccharomyces cerevisiae*, sedangkan pada konsentrasi YE yang lebih tinggi (1,5 %), produksi etanol oleh khamir tersebut menurun (O'Connor-Cox *et al.* 1991).

Konsentrasi sumber C yang berbeda dalam medium PDY dapat mempengaruhi indeks antikhmir. Konsentrasi sumber C (24 gl^{-1}) berupa kentang-dekstrosa menghasilkan indeks antikhmir tertinggi dan berbeda

sangat nyata dengan konsentrasi sumber C lainnya. Kemungkinannya konsentrasi sumber C (24 gl^{-1}) berupa kentang-dekstrosa merupakan konsentrasi yang baik untuk pertumbuhan dan produksi antikhmir oleh *F. nivale*. Hasil tersebut menguatkan bahwa konsentrasi sumber C yang terkandung dalam medium PDY (24 gl^{-1}) dapat digunakan sebagai konsentrasi sumber C dalam medium PDY yang selama ini digunakan untuk pengujian metabolit sekunder oleh kapang endofit (Syarmalina *et al.* 2003; Kumala 2005). Konsentrasi glukosa 1 % adalah sangat efektif untuk pertumbuhan dan produksi *eicosapentaenoic acid* (EPA) oleh *Pythium irregulare* Buisman, sedangkan pada konsentrasi glukosa yang lebih tinggi (2 %), pertumbuhan dan produksi EPA kapang tersebut menurun (Stinson *et al.* 1991).

Hubungan atau kontak antara enzim dan substrat menyebabkan terjadinya kompleks enzim-substrat. Kompleks tersebut bersifat aktif, sementara, dan akan terurai lagi apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi. Pada konsentrasi substrat rendah (20 gl^{-1} sumber C), kecepatan reaksi tergantung pada konsentrasi substrat. Namun pada konsentrasi substrat tinggi ($> 1 \text{ gl}^{-1}$ sumber N; $> 24 \text{ gl}^{-1}$ sumber C), kecepatan reaksi tidak lagi tergantung pada konsentrasi substrat atau kecepatan reaksi tidak dipengaruhi lagi oleh penambahan konsentrasi substrat. Enzim seolah-olah telah jenuh dengan substrat atau tidak dapat lagi menampung substrat (Poedjadi 1994).

3. Pengaruh antara pH medium PDY (1 g^l-1 sumber N dan 24 g^l-1 sumber C), serta khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

Interaksi antara pH medium dan khamir *Candida* yang tidak nyata, mengindikasikan bahwa antara pH medium dan khamir *Candida* saling bebas mempengaruhi indeks antikhamir. Perlakuan interaksi antara pH 6,0 dan *C. albicans* menghasilkan indeks antikhamir tertinggi (2,12 ± 0,11).

Tingkat keasaman medium dapat memengaruhi indeks antikhamir. *Fusarium nivale* yang ditumbuhkan pada pH 6,0, menghasilkan indeks antikhamir tertinggi dan berbeda sangat nyata dengan pH medium lainnya. Kemungkinannya karena pH optimum untuk pertumbuhan kapang tersebut adalah 5,8–6,3 (Schumann 2000). pH optimum adalah pH yang diperlukan oleh enzim untuk mencapai aktivitas maksimumnya. Aktivitas enzim dapat turun pada pH lebih asam atau lebih basa dari pH optimumnya. pH yang lebih asam atau lebih basa menyebabkan membran sitoplasma larut sehingga sel mengalami lisis (Madigan 2003). Kemungkinan lainnya karena rantai asam amino pada sisi aktif enzim dapat bersifat ion positif, ion negatif atau ion bermuatan ganda (*zwitter ion*). Ionisasi dari rantai amino memiliki peran penting dalam mempertahankan struktur protein, sehingga perubahan ionisasi atau pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat (Poedjadi 1994).

4. Pengaruh antara suhu medium PDY (1 gl⁻¹ sumber N dan 24 gl⁻¹ sumber C) pada pH 6,0, dan khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

Adanya pengaruh interaksi antara suhu medium dan khamir *Candida* yang sangat nyata, mengindikasikan bahwa antara suhu medium dan khamir *Candida* tidak saling bebas, satu sama lain berpengaruh terhadap indeks antikhamir. Perbedaan suhu medium dan perbedaan respon khamir *Candida* menyebabkan indeks antikhamir berbeda. Interaksi antara suhu medium 25° C dan *C. albicans*, menghasilkan indeks antikhamir tertinggi (2,30 ± 0,06).

Suhu medium yang berbeda dapat mempengaruhi indeks antikhamir. Judoamidjojo *et al.* (1992) menginformasikan bahwa pertumbuhan dan pembentukan produk mikrobial adalah hasil rantai reaksi kimia yang kompleks, dan seperti juga pada semua reaksi kimia, reaksi-reaksi tersebut dipengaruhi oleh suhu. *Fusarium nivale* yang ditumbuhkan pada suhu 25° C menghasilkan indeks antikhamir tertinggi dan berbeda sangat nyata dengan suhu medium lainnya. Kemungkinannya karena *F. nivale* merupakan kapang psikrofil yang mempunyai suhu optimum untuk pertumbuhan 20–22,5° C (Schumann 2000) dan suhu optimum untuk produksi konidia 26° C (Xiang Ming Xu 2003). Suhu optimum adalah suhu yang diperlukan oleh enzim untuk mencapai aktivitas maksimumnya. Aktivitas enzim dapat turun pada suhu lebih rendah atau lebih tinggi dari suhu optimumnya.

Fusarium nivale yang ditumbuhkan dalam medium yang diinkubasi pada suhu 35 dan 40° C, tidak menghasilkan indeks antikhamir (0 atau 0,71 setelah mengalami konversi dengan $\sqrt{x + 0,5}$), sehingga tidak dapat menghambat pertumbuhan *C. albicans* dan *C. tropicalis*. Kemungkinannya pada suhu tinggi (melebihi suhu optimum) enzim dan protein kapang psikrofil mengalami denaturasi, sehingga terhentinya proses metabolisme sel tersebut (Madigan *et al.* 2003). Peneliti yang sama menginformasikan bahwa suhu tinggi menyebabkan membran sitoplasma kapang tersebut larut dan sel mengalami lisis. Judoamidjojo *et al.* (1992) melaporkan bahwa dalam suatu proses fermentasi, kalau suhu dinaikkan maka produksi sel akan menurun karena sebagian media digunakan untuk mempertahankan hidup atau kebutuhan untuk mempertahankan diri meningkat.

5. Pengaruh antara agitasi medium PDY (1 gl⁻¹ sumber N dan 24 gl⁻¹ sumber C) pada pH 6,0 dan suhu inkubasi 25° C, serta khamir *Candida* terhadap indeks antikhamir *F. nivale*

Adanya pengaruh interaksi antara agitasi medium dan khamir *Candida*, mengindikasikan bahwa antara agitasi dan khamir *Candida* tidak saling bebas, satu sama lain berpengaruh terhadap indeks antikhamir. Perbedaan agitasi dan perbedaan respon khamir *Candida* menyebabkan indeks antikhamir berbeda. Interaksi antara agitasi medium 90 rpm dan *C. albicans* menghasilkan indeks antikhamir tertinggi (2,30 ± 0,04). Hasil tersebut menguatkan bahwa agitasi medium 90 rpm dapat digunakan untuk

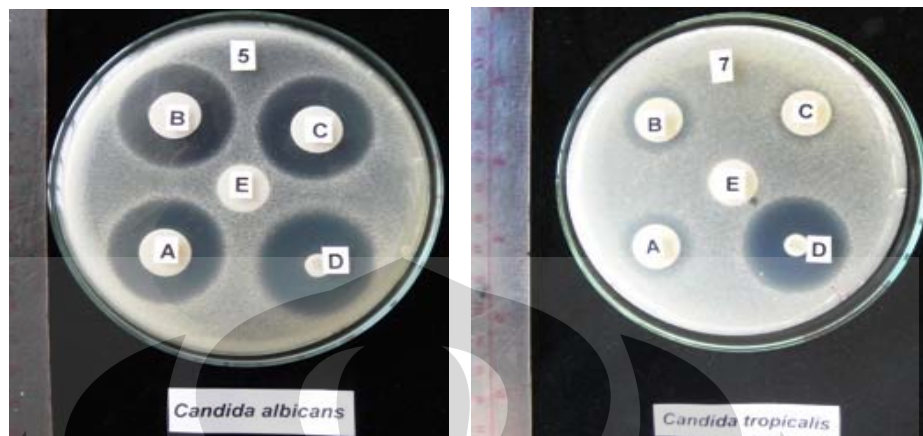
memproduksi metabolit sekunder oleh kapang endofit yang selama ini digunakan (Agusta *et al.* 2005).

Agitasi medium yang berbeda dapat mempengaruhi indeks antikhmir. Agitasi medium 90 rpm menghasilkan indeks antikhmir tertinggi dan berbeda sangat nyata dengan agitasi lainnya. Kemungkinannya agitasi 90 rpm merupakan agitasi yang baik untuk pertumbuhan dan produksi antikhmir oleh *F. nivale*. Agitasi medium 0, 80, dan 100 rpm menghasilkan indeks antikhmir lebih rendah. Kemungkinannya pada agitasi 0 dan 80 rpm, kurang dapat mencegah agregasi konidia sehingga menyulitkan konidia kontak dengan nutrient medium (Balasubramanian & Manocha (1986) dan oksigen (Roukas 1991). Sedangkan pada agitasi medium 100 rpm, kemungkinannya menyebabkan kerusakan hifa sehingga kapang tidak dapat tumbuh dengan baik (Gura & Rau 1993).

Kurva produksi antikhmir dan berat biomassa *F. nivale*

Korelasi yang sangat nyata antara perubahan pH medium dan indeks antikhmir, baik terhadap *C. albicans* maupun *C. tropicalis* menunjukkan adanya peranan perubahan pH medium terhadap produksi antikhmir. Setiap taraf perubahan pH meningkat 1 unit, maka indeks antikhmir akan meningkat 0,70 unit (*C. albicans*) dan 0,49 unit (*C. tropicalis*) (Tabel II.6). Perubahan pH dimulai pada hari ke-0 sampai ke-1, yaitu terjadi penurunan pH medium menjadi 4,66–4,96 dari pH awal 6,0. Penurunan pH

medium bersamaan dengan indeks antikhamir belum dihasilkan. Hari ke-1 sampai ke-4 mulai terjadi kenaikan pH medium kembali menjadi pH 7,48–7,85. Kenaikan pH medium bersamaan dengan indeks antikhamir sudah dihasilkan, yaitu 1,93–2,25 (*C. albicans*) dan 1,41–1,64 (*C. tropicalis*). Hari ke-4 dan seterusnya kenaikan pH berkisar 7,24–8,39, sedangkan indeks antikhamir berkisar 2,0–2,47 (*C. albicans*) dan 1,35–1,68 (*C. tropicalis*). Indeks antikhamir tertinggi untuk *C. albicans* ($2,47 \pm 0,12$) dan *C. tropicalis* ($1,68 \pm 0,04$), masing-masing dihasilkan pada waktu inkubasi 9 hari (Gambar II.1 & II.2). Pemanenan antikhamir dapat dilakukan pada hari ke-3 karena indeks antikhamir pada hari ke-3 untuk *C. albicans* ($2,25 \pm 0,06$) dan *C. tropicalis* ($1,61 \pm 0,02$) tidak berbeda nyata ($\alpha 0,05$) dengan indeks antikhamir pada hari ke-9 untuk *C. albicans* ($2,47 \pm 0,12$) dan *C. tropicalis* ($1,68 \pm 0,04$).



Gambar II.2. Daerah hambatan pertumbuhan pada *C. albicans* dan *C. tropicalis*; (A, B, & C) antikhmir *F. nivale* (50 µl/kertas cakram); (E) kontrol negatif; (D) kontrol positif (nistatin 100 µg/kertas cakram)

Korelasi yang sangat nyata antara perubahan pH medium dan biomassa sel menunjukkan adanya peranan perubahan pH medium terhadap biomassa sel. Setiap taraf perubahan pH meningkat 1 unit, maka biomassa sel akan meningkat 0,06 unit (Tabel II.4). Penurunan pH 4,81 dari pH awal 6,0 terjadi pada fase lag sel, yaitu hari ke-0 sampai ke-1. Hari ke-1 sampai ke-4 mulai terjadi kenaikan pH medium kembali menjadi pH 7,48–7,85, yaitu pada fase eksponensial. Hari ke-4 dan seterusnya kenaikan pH medium berkisar 7,24–8,39, yaitu pada fase stationer (Gambar II.1). Madigan *et al.* (2003) mengatakan bahwa kurva pertumbuhan dibagi menjadi fase lag, fase eksponensial, fase stationer, dan fase kematian.

Penelitian tersebut memperlihatkan perubahan pH medium yang cenderung menjadi basa (Gambar II.1). Hasil yang sama diperoleh pada produksi toksin dipteria (Sundaran *et al.* 2001). Kemungkinannya disebabkan

oleh kombinasi berbagai faktor, meliputi pelepasan gugus amino dari asam amino (Judoamidjojo *et al.* 1992; Han *et al.* 1999), asimilasi asam-asam organik (Hassan & Fridovich 1978; Han *et al.* 1999) dan pemberian bufer CaCO_3 (Judoamidjojo *et al.* 1992; Han *et al.* 1999; Purwoko & Pramudyanti 2004).

Korelasi yang sangat nyata antara berat biomassa sel dan indeks antikhmir, baik pada *C. albicans* maupun *C. tropicalis* menunjukkan adanya peranan berat biomassa sel terhadap indeks antikhmir. Setiap taraf perubahan berat biomassa sel meningkat 0,1 unit, maka indeks antikhmir meningkat 0,98 unit (*C. albicans*) dan 0,68 unit (*C. tropicalis*). Indeks antikhmir belum dihasilkan (0) pada fase lag (hari ke-0 sampai ke-1). Indeks antikhmir sudah dihasilkan, yaitu 1,93–2,25 (*C. albicans*) dan 1,41–1,64 (*C. tropicalis*) pada hari ke-1 sampai hari ke-4, yaitu fase eksponensial. Hari ke-4 dan seterusnya adalah fase stationer dengan indeks antikhmir berkisar 2,25–2,47 (*C. albicans*) dan 1,35–1,68 (*C. tropicalis*). Hasil tersebut menunjukkan bahwa antikhmir disintesis dalam masa pertumbuhan. Kemungkinannya *F. nivale* menghasilkan metabolit berupa asam-asam organik sehingga dapat menghambat pertumbuhan *C. albicans* dan *C. tropicalis* (Hidayat *et al.* 2006). *Fusarium verticilloides* (Sacc.) Nirenberg (syn. *Fusarium moniliforme* Sheldon) menghasilkan *fusaric acid* yang bersifat antagonis terhadap *Bacillus mojavensis* (Bacon *et al.* 2004).

KESIMPULAN

Kondisi fermentasi dengan menggunakan medium PDY (1 gl⁻¹ YE dan 24 gl⁻¹ kentang-dekstrosa) pada pH 6,0, suhu inkubasi 25° C, dan agitasi 90 rpm, merupakan kondisi yang optimal bagi *Fusarium nivale* untuk menghasilkan antikhmir.

Indeks antikhmir tertinggi untuk *Candida albicans* (2,47 ± 0,12) dan *Candida tropicalis* (1,68 ± 0,04), masing-masing diperoleh pada waktu inkubasi 9 hari.

Ada korelasi yang sangat nyata antara perubahan pH medium dan indeks antikhmir, baik terhadap *Candida albicans* maupun *Candida tropicalis*, antara perubahan pH medium dan berat biomassa sel, dan antara berat biomassa sel dan indeks antikhmir, baik untuk *Candida albicans* maupun untuk *Candida tropicalis*.

SARAN

Perlu dilakukan penentuan dan analisis kimiawi zat aktif dari antikhmir yang dihasilkan oleh *Fusarium nivale*.



DAFTAR ACUAN

- Agusta, A., S. Maehara, K. Ohashi, P. Simanjuntak, & H. Shibuya. 2005. Stereoselective oxidation at C-4 of flavans by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. isolated from a tea plant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **53**(12): 1565–1569.
- Atlas, R.M. 1984. *Microbiology: Fundamental and application*. Macmillan Publishing Company, New York: xxi + 879 hlm.
- Bacon, C.W., D.M. Hinton, J.K. Porter, A.E. Glenn, & G. Kuldau. 2004. Fusaric acid, a *Fusarium verticilloides* metabolite, antagonistic to the endophytic biocontrol bacterium *Bacillus mojavensis*. *Canadian Journal of Botany* **82**(7): 878–885.
- Balasubramanian, R. & M.S. Manocha. 1986. Proteinase, chitinase, and chitosanase activities in germinating spores of *Piptocephalis virginiana*. *Mycologia* **78**(2): 157–163.
- Boutrif, E. & C. Bessy. 2001. Global significance of mycotoxins and phycotoxins. In: W.J. de Koe, R.A. Samson, H.P. van Egmond, J. Gilbert, & M. Sabino. *Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium*. Posen & Looyen, Wageningen: 3–16.
- Dawes, I.W. & I.W. Sutherland. 1992. *Microbial physiology*. 2nd rev. ed. Blackwell Scientific Publications, Berlin: xiv + 188 hlm.

- de Roubin, M.R., L. Bastien, S.H. Shen, & D. Groleau. 1991. Fermentation study for the production of hepatitis B virus pre-S2 antigen by the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Journal of Industrial Microbiology* **8**: 147–156.
- Dowd, P.F., J.D. Miller, & R. Greenhalgh. 1989. Toxicity and interaction of some *Fusarium graminearum* metabolites to caterpillars. *Mycologia* **81**(4): 646–650.
- Gandjar, I., I.R. Koentjoro, W. Manguwardoyo, & L. Soebagya. 1992. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Dasar*. Jurusan Biologi, FMIPA, UI, Jakarta: vii + 87.
- Gomez, K.A. & A.A. Gomez. 1984. *Statistical procedures for agricultural research*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., Canada: xvi + 680 hlm.
- Gura, E. & U. Rau. 1993. Comparison of agitators for the production of branched β -1,3-D-glucans by *Schizophyllum commune*. *Journal of Biotechnology* **27**: 193–201.
- Han, B., J.L. Kiers, & R.M.J. Nout. 1999. Solid-substrate fermentation of soybean with *Rhizopus* spp.: comparison of discontinuous rotation with stationary bed fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **88**(2): 205–209.
- Harmita & M. Radji. 2004. *Buku ajar analisis hayati*. Departemen Farmasi FMIPA, UI: 149 hlm.

- Hassan, H.M. & I. Fredovich. 1978. Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **253**(18): 6445–6450.
- Hidayat, N., M.C. Padaga, & S. Suhartini. 2006. *Mikrobiologi industri*. Penerbit Andi, Yogyakarta: xvi + 198.
- Hua Wei Zhang, Yong Chun Song, & Ren Xiang Tan. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports* **23**: 753–771.
- Judoamidjojo, M., A.A. Darwis, & E.G. Said. 1992. *Teknologi fermentasi*. CV Rajawali, Jakarta: viii + 333 hlm.
- Konya, A., A. Jekkel, J. Suto, & J. Salat. 1998. Optimization of compactin fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **20**: 150–152.
- Kumala, S. 2005. Isolasi dan penapisan mikroba endofit tanaman *Brucea javanica* (L.) Merr. serta uji sitotoksik metabolit sekunder terhadap beberapa sel kanker secara invitro. Ringkasan Disertasi. Program Studi Ilmu Biomedik, Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran, UI, Jakarta: 41 hlm.
- Logrieco, A., R.F. Vesonder, S.W. Peterson, & Bottalico. 1991. Reexamination of the taxonomic disposition of and deoxynivalenol production by *Fusarium nivale* NRRL 3289. *Mycologia* **83**(3): 367–370.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, & J. Parker. 2003. *Broock biology of microorganism*. 9th ed., Prentice Hall International Inc., New Jersey: xxv + 1019 hlm.

- Miller, J.D. & R. Greenhalgh. 1985. Nutrient effects on the biosynthesis of trichothecenes and other metabolites by *Fusarium graminearum*. *Mycologia* **77**(1): 130–136.
- Norred, W.P. & R.T. Riley. 2001. Toxicology and mechanism of action of selected mycotoxins. *In*: W.J. de Koe, R.A. Samson, H.P. van Egmond, J. Gilbert, & M. Sabino. *Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium*. Posen & Looyen, Wageningen: 211–222.
- O'connor-Cox, E.S.C., J. Paik, & W.M. Ingledew. 1991. Improved ethanol yields through supplementation with excess assimilable nitrogen. *Journal of Industrial Microbiology* **8**: 45–52.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar biokimia*. UI-Press, Jakarta: ix + 472 hlm.
- Prihatiningtias, W., S.M. Widyastuti., & S. Wahyuono. 2005. Senyawa antibakteri dari *Thievalia polygonoperda*, fungi endofit tumbuhan akar kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers). *Pharmakon* **6**(1): 19–22.
- Purwoko, T. & I.R. Pramudyanti. 2004. Pengaruh CaCO₃ pada fermentasi asam laktat oleh *Rhizopus oryzae*. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* **9**(1): 19–22.
- Roukas, T. 1991. Influence of impeller speed on citric acid production and selected enzyme activities of the TCA cycle. *Journal of Industrial Microbiology* **7**: 221–226.

- Schumann, G. 2000. Biology of *Microdochium nivale* and management of *Fusarium* patch (pink snow mold) in New England. Project Report, University of Massachusetts: 12 hlm.
- Stinson, E.E., R. Kwoczak, & M.J. Kurantz. 1991. Effect of cultural conditions in production of eicosapentaenoic acid by *Pythium irregulare*. *Journal of Industrial Microbiology* **8**: 171–178.
- Strobel, G. & B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**(4): 491–502.
- Sudiana, I.M., R.D. Rahayu, H. Imanuddin, & M. Rahmansyah. 2001. Cellulolytic bacteria of soil of Gunung Halimun National Park. Edisi Khusus. *Biodiversitas Taman Nasional Gunung Halimun, Berita Biologi* **5**(6): 703–709.
- Sundaran, B., Y.U.B. Rao, & R. Boopathy. 2001. Process optimization for enhanced production of diphtheria toxin by submerged cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **91**(2): 123–133.
- Suryani, A., A. Ismayana, Y. Sutrisna, & Y.R. Pyun. 2000. Kajian teknik kultivasi dan pengaruh luas permukaan media tumbuh pada produksi selulosa menggunakan bakteri isolat lokal. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* **5**(1): 4–9.

- Syarmalina, Setyorini, & N. Yantih. 2003. Isolasi dan skrining kapang endofitik dari dringo (*Acorus calamus* L.) yang berpotensi sebagai penghasil antimikroba. Prosiding Seminar dan Pameran Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXIII, Jakarta: 169–174.
- Tatsumo, T. 1968. Toxicologic research on substances from *Fusarium nivale*. *Cancer Research* **28**: 2393–2396.
- Ueno, Y., N. sato, K. Ishii, K. Sakai, H. Tsunoda, & M. Enomoto. 1973. Biological and chemical detection of trichothecene mycotoxins of *Fusarium* species. *Applied Microbiology* **25**(4): 699–704.
- Wingard, J.R., J.D. Dick, W.G. Merz, G.R. Sanford, R. Saral, & W.H. Burns. 1982. Differences in virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis* and *C. albicans* in mice. *Infection and Immunity* **37**(2): 833–836.
- Wingard, J.R., J.D. Dick, W.G. Merz, G.R. Sanford, R. Saral, & W.H. Burns. 2001. Pathogenicity of *Candida tropicalis* and *C. albicans* after gastrointestinal inoculation in mice. *Bioresource Technology* **76**(3): 213–220.
- Xiang Ming Xu. 2003. Effects of environmental conditions on the development of *Fusarium* ear blight. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 683–689.

RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

Sebanyak 60 isolat yang terdiri dari 12 spesies kapang endofit diisolasi dari akar, umbi semu, batang, dan daun *Dendrobium crumenatum* Sw. (anggrek merpati) yang dikoleksi dari Perumahan Tanah Baru, Kebun Raya Bogor, dan Herbarium Bogoriense, Bogor. Kapang endofit yang diisolasi dari akar 6 spesies, dari daun 6 spesies, dari umbi semu 5 spesies, dan dari batang anggrek merpati 3 spesies.

Kapang endofit yang berhasil diisolasi adalah *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* sp., *Curvularia brachyspora*, *Fusarium nivale*, *Fusarium solani*, *Guignardia endophyllicola* (anamorf: *Phyllosticta capitalensis*), *Pestalotiopsis* sp., *Scolecobasidium* sp., *Westerdikella* sp., dan *Xylohypha* sp. *Guignardia endophyllicola* adalah kapang endofit dominan pada anggrek merpati.

Fusarium nivale mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans* dan *Candida tropicalis* dengan indeks antimikroorganisme masing-masing ($1,7 \pm 0,02$) dan ($1,3 \pm 0,06$). Selain itu, semua isolat kapang endofit tidak menghambat pertumbuhan bakteri Gram-negatif *Escherichia coli* dan Gram-positif *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*.

Kondisi fermentasi dengan menggunakan medium PDY (1 gl⁻¹ YE dan 24 gl⁻¹ kentang-dekstroza) pada pH 6,0, suhu inkubasi 25° C, dan agitasi 90 rpm, merupakan kondisi yang optimal bagi *Fusarium nivale* untuk menghasilkan antikhmir.

Indeks antikhmir tertinggi untuk *Candida albicans* (2,47 ± 0,12), dan *Candida tropicalis* (1,65 ± 0,04), masing-masing diperoleh pada waktu inkubasi 9 hari.

Ada korelasi yang sangat nyata antara perubahan pH medium dan indeks antikhmir, baik terhadap *Candida albicans* maupun *Candida tropicalis*, antara perubahan pH medium dan berat biomassa sel, dan antara berat biomassa sel dan indeks antikhmir, baik untuk *Candida albicans* maupun *Candida tropicalis*.

SARAN

Perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut dengan metode genetika molekular pada kapang endofit yang belum teridentifikasi sampai spesies. Perlu dilakukan pula penentuan dan analisis kimiawi zat aktif dari antikhmir yang dihasilkan oleh *Fusarium nivale*.