



UNIVERSITAS INDONESIA

**IDENTIFIKASI KAPANG ENDOFIT ES5, ES6, ES7, DAN ES8
DARI *Broussonetia papyrifera* Vent. DAN PENGUJIAN
AKTIVITAS ANTIMIKROBA**

SKRIPSI

**KENARDO
0706263965**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**IDENTIFIKASI KAPANG ENDOFIT ES5, ES6, ES7, DAN ES8
DARI *Broussonetia papyrifera* Vent. DAN PENGUJIAN
AKTIVITAS ANTIMIKROBA**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains**

**KENARDO
0706263965**

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

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Kenardo

NPM : 0706263965

Tanda Tangan : 

Tanggal : 11 Juli 2011


HALAMAN PENGESAHAN

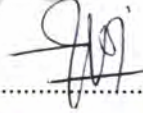
Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Kenardo
NPM : 0706263965
Program Studi : Biologi
Judul Skripsi : Identifikasi Kapang Endofit ES5, ES6, ES7, dan ES8
dari *Broussonetia papyrifera* Vent. dan Pengujian
Aktivitas Antimikroba


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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Ariyanti Oetari, Ph.D (.....)

Pembimbing II : Prof. Dr. Atiek Soemiati (.....)

Penguji I : Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D (.....)

Penguji II : Dr. rer.nat. Yasman, M.Sc (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 11 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kepada Tuhan Yesus Kristus, karena hanya oleh kasih dan anugerahNya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. PertolonganNya tidak pernah terlambat. Ia tak henti-hentinya menegur penulis apabila penulis melakukan kesalahan dan mengangkat penulis apabila penulis jatuh.

Selanjutnya penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Ariyanti Oetari, Ph.D. selaku dosen pembimbing I dan Ibu Prof. Dr. Atiek Soemiati selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan dalam pengerjaan penelitian dan waktu, tenaga, saran, dan kritik untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini.
2. Hibah Riset Unggulan Bidang Prioritas (RUBP) *Indigenous Studies* tahun 2010 atas nama Ariyanti Oetari, Ph.D. yang telah membiayai penelitian ini.
3. Ibu Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. selaku dosen penguji I dan Bapak Dr. rer.nat Yasman, M.Sc. selaku dosen penguji II atas kesediaannya menguji penulis dan memberikan saran, kritik, dan dukungan tentang penelitian dan penulisan skripsi.
4. Bapak Dr. Wibowo Mangunwardoyo atas kesediaannya menjadi Ketua Dewan Sidang penulis dan telah memberikan saran, kritik, dukungan selama penulis melakukan penelitian dan menulis skripsi.
5. Ibu Dr. Nisyawati selaku Penasihat Akademik atas saran, kritik, dan dukungan selama masa perkuliahan penulis.
6. Ibu Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi, Dr.rer.nat Mufti Petala Patria, M.Sc. selaku Kepala Departemen Biologi, dan Bapak Drs. Wisnu Wardhana M.Si. yang telah mengatur registrasi sidang penulis.
7. Bapak Dr. Anom Bowolaksono, Ibu Dr. Luthfirda Sjahfirdi, dan Bapak Dr. Abinawanto sebagai koordinator seminar yang telah mengatur registrasi dan pelaksanaan UP dan seminar penulis.
8. Nagao dan Bank Indonesia atas beasiswa yang telah diberikan bagi penulis.
9. Ayah dan Ibu atas doa, dukungan, dan perhatiannya. Mereka adalah orang tua

yang luar biasa.

10. Rendi, Imora, dan Kirana sebagai teman seperjuangan saat penelitian dan penulisan skripsi karena mereka adalah pemicu semangat belajar penulis.
11. Bapak Ahmad Supriadi S.IP atas bantuan dan dukungannya selama penelitian.
12. Mbak Dalia, Mbak Reno, Bu Retno, Ka Dafina, dan ka Novia atas saran dan bantuannya selama penelitian dan penulisan skripsi.
13. Mbak Asri atas bantuannya memeriksa kelengkapan UP, seminar, dan sidang penulis.
14. Michael, Arkies, Dedi, Roni, Samuel, Teguh, Ola, Grace, Gaby, El Bram, Sarwa, Pida, Bella, Imel, Metha, Gabe, Itop, Alvin, Erni, Kezia, Chrisna, ka Frank, Hesty, Echi, Santy, Joseph, Steven, Abdiel, Alvie, Ivan, Wileam, Edo, Jeff, Messi, Rolanda, Eron, Agnes, Epin, Yunita, Bunga, Cindy, Tami, Umbu, Hendry, Ririn, Tasha, Dito, Timot dan saudara-saudari Persekutuan Oikumene Universitas Indonesia atas doa, persekutuan, perhatian, dan dukungannya.
15. Om dan Tante Mandey, Ko Yusak, Tante Tuti, Ci Debby, Ko Dedi, dan jemaat GPdI Graha Indah atas doa, perhatian, dan dukungannya.
16. Deviana, Krisna, Adityo, Kezia, Eva, dan semua teman dari SMA Regina Pacis Bogor atas doa, perhatian, dan dukungannya.
17. Bama, Doni, Galuh, Estri, Ine, Bregas, Niar, Eja, Diana, Irvan, Edvan, Desy, Michele, Chir, Rere, Odiet, Grand, Okta, Seyla, Hanum, Nur El, Savit, Roesli, Fathon, dan Sentot atas kebersamaan dan persahabatannya di Laboratorium Mikrobiologi dan CoE IBR-GS.
18. Gita, Ade, Karno, Putsan, Pepep, Fajar, Tami, Iik, Adisty, Piko, dan saudara-saudari Blossom, Felix, Bee05phere, Biosentris, Zygomorph atas perhatian dan dukungannya.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Penulis

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Kenardo
NPM : 0706263965
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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

Identifikasi Kapang Endofit ES5, ES6, ES7, dan ES8 dari *Broussonetia papyrifera* Vent. dan Pengujian Aktivitas Antimikroba

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 11 Juli 2011

Yang menyatakan



(Kenardo)

ABSTRAK

Nama : Kenardo
Program studi : Biologi
Judul : Identifikasi Kapang Endofit ES5, ES6, ES7, dan ES8 dari *Broussonetia papyrifera* Vent. dan Pengujian Aktivitas Antimikroba terhadap Mikroba Uji

Penelitian bertujuan mengisolasi dan mengidentifikasi kapang endofit dari *Broussonetia papyrifera*, serta mengetahui aktivitas antimikroba kapang endofit terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, dan *Candida albicans* UICC Y-29. Hasil identifikasi konvensional berdasarkan karakter morfologi menunjukkan kapang-kapang endofit terdiri dari *Aspergillus flavus* ES6, *Aspergillus sparsus* ES5, *Penicillium chrysogenum* ES8, dan *Mycelia sterilia* ES7. Pengujian dengan blok agar memperlihatkan kapang *A. flavus* ES6 memiliki aktivitas antimikroba terhadap *C. albicans* dan kapang *P. chrysogenum* ES8 memiliki aktivitas antimikroba terhadap *B. subtilis*, sedangkan kapang *A. sparsus* ES5 dan *mycelia sterilia* ES7 tidak memperlihatkan aktivitas antimikroba.

Kata kunci:

Antimikroba, *Aspergillus*, *Broussonetia papyrifera*, blok agar, kapang endofit, *Penicillium*.

ABSTRACT

Name : Kenardo
Program Study : Biology
Title : Identification of ES5, ES6, ES7, and ES8 Fungal Endophytes from *Broussonetia papyrifera* Vent. and Their Antimicrobial Test

This research was to isolate endophytic fungi from *Broussonetia papyrifera*, to identify the isolates, and to investigate their antimicrobial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and *Candida albicans* UICC Y-29. Endophytic fungi were identified by conventional method and they were *Aspergillus flavus* ES6, *Aspergillus sparsus* ES5, *Penicillium chrysogenum* ES8, and *Mycelia sterilia* ES7. Agar block test results of *A. flavus* ES6 showed antimicrobial activity against *C. albicans* and *P. chrysogenum* ES8 against *B. subtilis*. *Aspergillus sparsus* ES5 and *Mycelia sterilia* ES7 showed no antimicrobial activity.

Keyword:

Agar block, antimicrobial activity, *Aspergillus*, *Broussonetia papyrifera*, endophytic fungi, *Penicillium*.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
1. PENDAHULUAN.....	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Fungi.....	4
2.2 Fungi Endofit.....	5
2.3 Isolasi Fungi Endofit	8
2.4 Identifikasi Kapang Endofit Secara Konvensional	8
2.5 Metabolit Sekunder	13
2.6 Senyawa Antimikroba Kapang Endofit.....	17
2.6.1 Senyawa Antibakteri.....	17
2.6.2 Senyawa Antifungi	18
2.7 Mikroba Uji.....	19
2.8 Blok Agar	22
2.9 <i>Broussonetia papyrifera</i> Vent	22
3. METODE PENELITIAN.....	25
3.1 Lokasi dan Waktu.....	25
3.2 Alat.....	25
3.3 Bahan.....	25
3.3.1 Mikroorganisme.....	25
3.3.2 Sampel Daun.....	26
3.3.3 Medium.....	26
3.3.4 Bahan Kimia	26
3.3.5 Bahan Habis Pakai	26
3.4 Cara Kerja	27
3.4.1 Pembuatan Medium.....	27
3.4.1.1 <i>Plate Count Agar</i> (PCA).....	27
3.4.1.2 <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA)	27
3.4.1.3 <i>Nutrient Agar</i> (NA)	28

3.4.1.4 <i>Yeast-extract Malt-extract Agar</i> (YMA)	28
3.4.2 Isolasi Kapang Endofit	28
3.4.3 Pemurnian Kapang Endofit	29
3.4.4 Pembuatan <i>Stock</i> dan <i>Working Culture</i>	29
3.4.5 Identifikasi Kapang Endofit	29
3.4.6 Pengujian Aktivitas Antimikroba Kapang Endofit	30
3.4.7 Analisis Data	31
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Isolasi Kapang Endofit	32
4.2 Identifikasi Kapang Endofit	33
4.2.1 <i>Aspergillus flavus</i> ES6	33
4.2.2 <i>Aspergillus sparsus</i> ES5	37
4.2.3 <i>Penicillium chrysogenum</i> ES8	40
4.2.4 <i>Mycelia sterilia</i> ES7	44
4.3 Pengujian Aktivitas Antimikroba Kapang Endofit	46
5. KESIMPULAN DAN SARAN	51
5.1 Kesimpulan	51
5.2 Saran	51
DAFTAR REFERENSI	52
LAMPIRAN.....	60

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.4.1 Beberapa bentuk askus	9
Gambar 2.4.2 Contoh zigospora	10
Gambar 2.4.3 Beberapa bentuk konidia.....	10
Gambar 2.4.4 <i>Aspergillus clavatus</i> Desm.....	11
Gambar 2.4.5 <i>Eurotium rubrum</i> Jos. König dkk.....	12
Gambar 2.4.6 Contoh <i>mycelia sterilia</i>	13
Gambar 2.7.1 <i>Escherichia coli</i>	20
Gambar 2.7.2 <i>Bacillus subtilis</i>	21
Gambar 2.7.3 <i>Candida albicans</i>	21
Gambar 2.9.1 Tumbuhan <i>Broussonetia papyrifera</i>	24
Gambar 4.1.1 Hasil pengamatan isolasi kapang endofit dari daun <i>B. papyrifera</i>	32
Gambar 4.2.1.1 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik <i>A. flavus</i> ES6 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang	34
Gambar 4.2.1.2 <i>Aspergillus flavus</i>	35
Gambar 4.2.1.3 Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik <i>A. flavus</i> ES6 umur 14 hari medium PDA pada suhu ruang	35
Gambar 4.2.2.1 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik <i>A. sparsus</i> ES5 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang.....	38
Gambar 4.2.2.2 <i>Aspergillus sparsus</i>	38
Gambar 4.2.2.3 Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik <i>A. sparsus</i> ES5 umur 14 hari medium PDA pada suhu ruang.....	39
Gambar 4.2.3.1 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik <i>P. chrysogenum</i> ES8 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang	41
Gambar 4.2.3.2 <i>Penicillium chrysogenum</i>	42
Gambar 4.2.3.3 Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik <i>P. chrysogenum</i> ES8 umur 14 hari medium PDA pada suhu ruang	42
Gambar 4.2.4.1 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik <i>mycelia sterilia</i> ES7 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang	45
Gambar 4.2.4.2 Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik <i>mycelia sterilia</i> ES7 umur 14 hari medium PDA pada suhu ruang	45
Gambar 4.3.1 Hasil pengamatan uji aktivitas antimikroba <i>A. flavus</i> ES6 terhadap <i>C. albicans</i> dengan blok agar.....	46
Gambar 4.3.2 Hasil pengamatan uji aktivitas antimikroba <i>A. flavus</i> ES6 terhadap <i>C. albicans</i> dengan blok agar	47

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.2.1.1 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik <i>A. sparsus</i> ES5 dan <i>A. flavus</i> ES6 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang	36
Tabel 4.2.1.2 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik <i>A. flavus</i> ES6 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang	36
Tabel 4.2.2.1 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik <i>A. sparsus</i> ES5 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang	39
Tabel 4.2.3.1 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik <i>P. chrysogenum</i> ES8 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang	43
Tabel 4.2.3.2 Hasil pengamatan ukuran karakter morfologi secara mikroskopik <i>P. chrysogenum</i> ES8 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang	43
Tabel 4.3.1 Hasil pengujian aktivitas antimikroba kapang endofit dengan blok agar	48

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Skema kerja.....	60
Lampiran 2 Standar warna Faber Castell.....	61



BAB 1 PENDAHULUAN

Mikroorganisme endofit adalah mikroorganisme yang hidup di dalam jaringan tumbuhan. Mikroorganisme tersebut dapat menggunakan sebagian atau seluruh masa hidupnya di dalam jaringan hidup dari tanaman inangnya tanpa menyakiti tanaman inang (Tan dan Zuo 2001: 448). Fungi merupakan mikroorganisme endofit yang paling banyak ditemukan (Strobel dan Daisy 2003: 493). Fungi endofit berperan dalam menginisiasi degradasi biologis bagian-bagian tumbuhan yang mati (Strobel 2001: 14) dan melindungi inangnya dari hama serangga, mikroorganisme patogen, dan hewan herbivora (Khan *dkk.* 2007: 2233 dan 2237) dengan cara menghasilkan senyawa metabolit yang dapat bersifat antibiosis (Vega *dkk.* 2008: 79). Tumbuhan inang berperan dalam menyediakan tempat tinggal (Carlile *dkk.* 2001: 405) dan nutrisi yang baik bagi fungi endofit (Strobel 2001: 14). Contoh kapang endofit adalah *Taxomyces andreana* Strob. yang diisolasi dari tumbuhan *Taxus brevifolia* Nutt. (Tan dan Zou 2001: 455). Kapang *Rhizopus* diisolasi dari tumbuhan *Broussonetia papyrifera* (de Errasti *dkk.* 2010: 29).

Tumbuhan *B. papyrifera* di Jawa Barat disebut saeh, di Jawa Tengah disebut dluwang, di Madura disebut dlubheng, dan di Sulawesi Selatan disebut ranta (Permadi 2005: 3). Tumbuhan tersebut di Hawaii disebut wauke, sedangkan di China disebut chu. Persebaran *B. papyrifera* di Indonesia yaitu Sumatera, Jawa, Sulawesi, Kepulauan Sunda Kecil, Flores, dan Maluku (Kehati 2010: 1), sedangkan persebarannya di dunia meliputi Jepang, Taiwan, Asia Timur, kepulauan-kepulauan Samudra Pasifik, Hawaii (Whistler dan Elevitch 2006: 1), Amerika Serikat bagian selatan, Eropa, India (Dweck 2003: 1), dan Argentina (de Errasti *dkk.* 2010: 29). *Broussonetia papyrifera* hidup di daerah beriklim tropis dengan ketinggian 0--1.500 meter di atas permukaan air laut (Whistler dan Elevitch 2006: 1) dan memiliki habitat di daerah dataran rendah dan pegunungan (Kehati 2010: 1).

Gangadevi *dkk.* (2008: 5) telah melaporkan potensi fungi endofit sebagai penghasil senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif tersebut berupa antibiotik,

mikotoksin (Hanson 2008: 32), dan asam organik (Dijksterhuis dan Samson 2007: 267) yang merupakan contoh kelompok senyawa kimia bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, kumarin, dan terpen (Nostro *dkk.* 2000: 381). Bakteri endofit *Serratia marcescens* Bizio yang diisolasi dari tumbuhan *Rhynchollaxis penicillata* Matthiesen, dapat menghasilkan senyawa *oocydin* yang memiliki komponen klorin mikrosiklik lakton. Senyawa tersebut digunakan di bidang agrikultur sebagai kontrol terhadap hama *Pythium* Pringsheim dan *Phytophthora* Bary (Strobel dan Daisy 2003: 493 dan 495).

Fungi endofit dapat menghasilkan enzim hidrolase yang berfungsi sebagai mekanisme pertahanan tumbuhan untuk menghadapi mikroorganisme patogen yang menginvasi tumbuhan tersebut. Fungi endofit juga dilaporkan dapat menghasilkan pektinase, selulase, esterase, lipase, proteinase, α -1,4-glukan liase, dan fosfatase (Tan dan Zou 2001: 458). Reddy *dkk.* (1996: 1215) melaporkan bahwa fungi endofit dari tumbuhan *Poa* L. dapat menghasilkan senyawa proteinase.

Fungi endofit terdapat di dalam jaringan tumbuhan, seperti jaringan daun, batang, dan akar. Metode isolasi yang dapat digunakan untuk mengisolasi fungi endofit adalah *surface sterilization*. Fungi endofit tersebut dapat diidentifikasi secara konvensional apabila fungi telah bersporulasi (Mueller *dkk.* 2004: 242, 244, dan 247). Identifikasi konvensional pada fungi dapat dilakukan berdasarkan pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik, antara lain ada tidaknya alat reproduksi seksual dan aseksual fungi tersebut dan dibandingkan dengan monograf (Gandjar *dkk.* 2000: 4 dan 6).

Metode blok agar dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas antimikroba suatu isolat kapang. Medium agar yang telah ditumbuhi kapang hingga bersporulasi dipotong dan diletakkan pada medium yang telah diinokulasikan mikroba uji. Prinsip dari metode tersebut adalah difusi senyawa antimikroba dari blok agar ke medium uji sehingga menghasilkan zona bening (Nedialkova dan Naidenova 2005: 30). Zona bening mengindikasikan penghambatan pertumbuhan mikroba uji (Bastos *dkk.* 2009: 3).

Mikroba uji yang sering digunakan adalah *Escherichia coli* (Migula) Castellani dan Chalmers (Mitchell dan Gu 2010: 37), *Bacillus subtilis* Cohn.

(Simarmata *dkk.* 2007: 85) dan *Candida albicans* (C. P. Robins) Berkout (Gandjar *dkk.* 2006: 89). *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif dan dapat menyebabkan diare (Mitchell dan Gu 2010: 37 dan 169), *B. subtilis* merupakan bakteri Gram positif (Villa dan Crespo 2010: 223) yang dapat menyebabkan keracunan makanan (Collins *dkk.* 2004: 363), dan khamir *C. albicans* dapat menyebabkan kematian pada penderita AIDS (Kavanagh 2005: 176).

Hingga saat ini penelitian senyawa-senyawa bioaktif yang dihasilkan dari tumbuhan *B. papyrifera* masih dilakukan (Kinghorn *dkk.* 2004: 3). Para ahli memperkirakan bahwa kapang endofit merupakan sumber dari khasiat suatu tanaman sebagai obat. Pencarian tersebut dilakukan untuk menemukan senyawa bioaktif baru yang dapat dimanfaatkan di berbagai bidang seperti kesehatan, agrikultur, dan industri (Strobel dan Daisy 2003: 493). Kapang endofit dari *B. papyrifera* asal Bandung belum diisolasi dan diidentifikasi. Dua isolat telah diperoleh dari koleksi UICC, yaitu ES5 dan ES6, namun identitas kapang-kapang tersebut belum diketahui. Potensi kapang endofit tersebut mengenai aktivitas antimikroba juga belum diketahui. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi kapang endofit dari *B. papyrifera*, mengidentifikasi kapang endofit dari *B. papyrifera*, dan mengetahui aktivitas antimikroba kapang endofit dari *B. papyrifera*. Hipotesis dari penelitian ini adalah kapang endofit dari *B. papyrifera* dapat diisolasi, isolat kapang endofit dapat diidentifikasi hingga tingkat seksi subgenus dan kapang endofit asal tumbuhan *B. papyrifera* memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, dan khamir uji *Candida albicans* UICC Y-29. Target dari penelitian ini untuk jangka panjang adalah senyawa kimia dari kapang endofit tersebut dapat digunakan sebagai obat antibiotik.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 FUNGI

Fungi adalah organisme heterotrof, eukariotik, tidak berklorofil, dan bereproduksi secara aseksual dan seksual (Black 1999: 71, 297, 298; Webster dan Weber 2007: 33). Fungi mencerna makanannya secara ekstraseluler dengan cara menghasilkan enzim ekstraseluler dan mengabsorpsi nutrisi sebagai bahan dasar metabolisme (Gandjar *dkk.* 2006: 23; Webster dan Weber 2007: 2). Peran Fungi di alam adalah sebagai dekomposer. Fungi mengurai makhluk hidup yang mati dan mengolahnya menjadi suatu substansi yang dapat digunakan kembali oleh makhluk hidup lain, terutama tumbuhan dan mikroorganisme lain (Hogg 2005: 394).

Fungi dapat dibagi ke dalam dua kelompok besar berdasarkan ukuran organisme tersebut, yaitu mikrofungi dan makrofungi (Young dan Smith 2005: 2). Mikrofungi adalah fungi yang berukuran mikroskopik (Dijksterhuis dan Samson 2007: 652), sedangkan makrofungi memiliki tubuh buah yang besar (Dijksterhuis dan Samson 2007: 652) sehingga dapat diamati dengan mata telanjang (Young dan Smith 2005: 2). Contoh mikrofungi adalah kapang *Aspergillus* Fr. dan khamir *Candida* Berkhout. (Jordening dan Winter 2005: 216). Contoh makrofungi adalah cendawan *Volvariella volvaceae* Sing. (Gandjar *dkk.* 2006: 214).

Berdasarkan karakteristik morfologi, fungi dikelompokkan ke dalam: khamir (*yeasts*), kapang (*moulds* atau *molds*), dan cendawan (*mushrooms*) (Gandjar *dkk.* 2006: 72). Khamir adalah kelompok fungi uniseluler dan salah satu cara reproduksi aseksualnya adalah dengan membentuk tunas (*budding*) (Gandjar *dkk.* 2006: 65 dan 70). Cendawan adalah makrofungi atau fungi yang memiliki tubuh buah dapat dilihat dengan kasat mata (Gandjar *dkk.* 2006: 65, 70, 84 dan 142). Kapang adalah fungi multiseluler berstruktur seperti filamen (Vaclavik dan Christian 2007: 391). Sebagian besar tubuh kapang terdiri atas benang-benang

yang disebut hifa, yang saling berhubungan menjalin suatu struktur semacam jala, yaitu miselium. Miselium dapat dibedakan atas miselium vegetatif yang berfungsi menyerap nutrisi dari lingkungan dan miselium fertil yang berfungsi dalam bereproduksi, yaitu untuk memproduksi konidia atau spora. Spora aseksual yang dihasilkan oleh kapang antara lain arthrokonidia, blastokonidia, sporangiospora, kladiospora, dan konidia. Spora seksual yang dihasilkan oleh kapang antara lain zigospora dan askospora (Gandjar *dkk.* 1999: 2 dan 5; Gandjar *dkk.* 2006: 56).

Menurut Deacon (2006: 16 dan 21), *Kingdom Fungi* terdiri dari lima filum, yaitu *Glomeromycota*, *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, dan *Basidiomycota*. Habitat *Glomeromycota* adalah di dalam akar tumbuhan. *Glomeromycota* tidak dapat tumbuh selain di dalam jaringan akar tumbuhan sehingga sulit diamati alat reproduksi seksual dan aseksualnya. Hifa *Glomeromycota* menembus sel akar dan membuat struktur arbuskular. *Glomeromycota* dan tumbuhan inangnya saling menyediakan nutrisi sehingga mereka terlibat simbiosis mutualisme. Contoh *Glomeromycota* adalah *Geosiphon pyriforme*. Menurut Gandjar *dkk.* (2006: 74--88), karakteristik khusus dari filum *Chytridiomycota* adalah sel spora aseksual memiliki flagela, yang disebut zoospora. Fungi *Zygomycota* menghasilkan zigospora sebagai spora seksual dan sporangium sebagai spora aseksual. Contoh *Zygomycota* adalah *Botrytis cinerea*. Fungi *Ascomycota* menghasilkan askospora sebagai spora seksual. Contoh fungi *Ascomycota* adalah *Emericella*. Fungi *Basidiomycota* menghasilkan basidiospora sebagai spora seksual. Contoh fungi *Basidiomycota* adalah *Ustilago violaceae* dan *Amanita phalloides*.

2.2 FUNGI ENDOFIT

Mikroorganisme endofit adalah mikroorganisme yang mengkolonisasi jaringan tumbuhan sehat secara interseluler maupun intraseluler tanpa menyebabkan penyakit pada tumbuhan tersebut (de Errasti *dkk.* 2010: 29). Mikroorganisme endofit yang paling sering ditemukan adalah fungi (Strobel dan Daisy 2003: 493). Fungi endofit sangat beragam jenisnya, tetapi pada umumnya

termasuk ke dalam filum Ascomycota (de Errasti *dkk.* 2010: 1). Tumbuhan inang dilaporkan mendapatkan kekebalan terhadap herbivora dan serangga karena keberadaan fungi endofit. Fungi endofit *Neotyphodium coenophialum* Glen., *N. Lolii* Latc., *Epichloe festucae* Leuc., dan *E. typhina* Tul. ditemukan pada rumput-rumputan (*tall fescue* dan *ryegrass*). Fungi tersebut menghasilkan senyawa peramin yang bersifat toksik bagi insekta, namun bersifat nontoksik bagi mamalia (Tan dan Zou 2001: 450). *Muscodor albus* Wora. ditemukan pada tumbuhan kayu manis *Cinnamomum zeylanicum* Blum. dan memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Rhizoctonia solani* Kuhn., *Ustilago hordei* Lagerh., *Cercospora beticola* Sacc., *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus* Fresen. (fungi patogen pada manusia), *Pythium ultimum* Trow. dan *Phytophthora cinnamomi* Rands. (Tejesvi *dkk.* 2007: 20). Fungi endofit mendapatkan nutrisi dari hasil metabolisme tumbuhan inang. Hal tersebut menyebabkan tumbuhan inang dan fungi endofit terlibat simbiosis mutualisme (Simarmata *dkk.* 2007: 86).

Siddiquee *dkk.* (2010: 4081) menyatakan hal yang menentukan bahwa fungi endofit bersifat patogen atau tidak adalah keseimbangan jumlah fungi yang terdapat pada jaringan tumbuhan inang dan respon tumbuhan inang. Apabila keseimbangan tersebut terganggu, maka fungi endofit dapat menjadi patogen. University of Sydney (2004: 1) menyatakan bahwa fungi endofit merupakan evolusi dari fungi patogen dan fungi endofit juga dapat berevolusi menjadi fungi patogen. Photita *dkk.* (2004: 137--138) melaporkan bahwa fungi patogen *Deightonella torulosa* Ellis. ditemukan hidup secara endofitik pada tumbuhan *Musa acuminata* Colla yang sehat. Daun *M. acuminata* sehat yang diinokulasikan fungi endofit tersebut menunjukkan tanda-tanda penyakit. Disimpulkan bahwa fungi patogen dapat bersifat laten dan hidup sebagai fungi endofit.

Fungi endofit hidup di dalam tumbuhan tingkat tinggi dan berpotensi menghasilkan metabolit sekunder baru yang dapat dimanfaatkan di bidang kesehatan, pertanian, atau industri. Saat ini fungi endofit sedang menjadi topik hangat di antara peneliti-peneliti karena jumlah fungi endofit diperkirakan sangat banyak, mengingat banyak tumbuhan tertentu yang tumbuh di daerah yang berbeda-beda (Strobel dan Daisy 2003: 493). Fungi endofit diperkirakan terdapat di setiap tumbuhan terestrial (Larran *dkk.* 2001: 181), walaupun telah ditemukan

fungi endofit pada tumbuhan laut, seperti *Halophila ovalis* Hook. (Devarajan dan Suryanarayanan 2002: 73).

Para ahli memperkirakan bahwa kapang endofit merupakan sumber dari khasiat suatu tanaman sebagai obat. Suku Aborigin memanfaatkan tumbuhan *Kennedia nigriscans* Lindl. sebagai obat luka dan infeksi. Tumbuhan tersebut ternyata memiliki bakteri endofit, yaitu *Streptomyces* sp. Witt dan Stackebrandt strain NRRL 30562 yang menghasilkan antibiotik *munumbicin* (Strobel dan Daisy 2003: 493--494). Simarmata *dkk.* (2007: 90) melaporkan telah memperoleh 38 isolat bakteri endofit dan 15 isolat kapang endofit dari tanaman sambung nyawa. Delapan bakteri dan satu kapang menghambat pertumbuhan *Candida albicans* Berkhout (fungi patogen), delapan bakteri menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers, delapan bakteri menghambat pertumbuhan *Pseudomonas* Migula, 17 bakteri dan tiga kapang menghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis* Cohn.

Taxomyces andreanae Strobel, A. Stierle, D. Stierle dan W. M. Hess adalah kapang endofit yang hidup pada tumbuhan *Taxus brevifolia* Nutt. (Stierle *dkk.* 1993: 214). *Diplodia seriata* De Notaris dan *Neofusicoccum ribis* Crou. hidup pada tumbuhan *Celtis occidentalis* L. *Rhizopus microsporus* Tiegh. hidup pada tumbuhan *Ligustrum lucidum* W. T. Aiton (de Errasti *dkk.* 2010: 32). *Taxomyces andreanae* dapat menghasilkan senyawa taksol yang berguna sebagai antitumor (Stierle *dkk.* 1993: 214). de Errasti *dkk.* (2010: 32) melaporkan beberapa Fungi endofit dari *Broussonetia papyrifera* asal Argentina, antara lain: *Coprinellus micaceus* (Bull.) Vilgalys, Hopple dan Jacq. Johnson, *Fusarium lateritium* Nees, *Fusarium* Link, *Lecytophora hoffmannii* (J.F.H. Beyma) Gams dan McGinnis, *Libertella* Desm., *Phialophora* Mediar, *Penicillium*, dan *mycelia sterilia*.

Fungi endofit berbeda dari fungi epifit. Fungi endofit tidak memiliki beberapa karakter yang dimiliki oleh fungi epifit, antara lain tidak dapat bertahan dengan situasi lingkungan yang buruk, umumnya tidak menghasilkan pigmen, dan tidak dapat bertahan terhadap sinar ultraviolet. Fungi endofit juga tidak dapat menggunakan lipid dan lapisan lilin pada permukaan daun sebagai bahan metabolisme (University of Sydney 2004: 1).

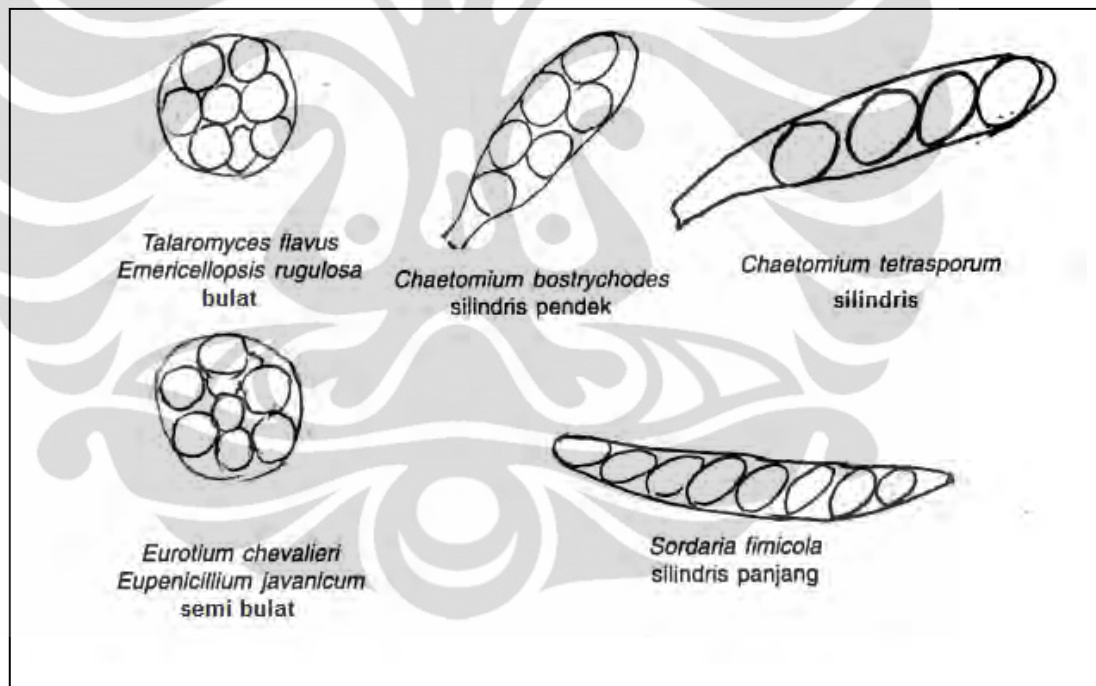
2.3 ISOLASI KAPANG ENDOFIT

Isolasi adalah suatu cara yang digunakan untuk memisahkan mikroorganisme dari lingkungannya (Gandjar *dkk.* 1992: 20). *Surface sterilization* dapat dilakukan untuk mengisolasi fungi endofit (Mueller *dkk.* 2004: 247). *Surface sterilization* bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme yang tidak diinginkan (Ando *dkk.* 2003: 11) atau mikroorganisme epifit. Larutan yang digunakan dalam *surface sterilization* adalah sodium hipoklorit, alkohol, atau merkuri klorida (Larran *dkk.* 2001: 181). Sodium hipoklorit berfungsi untuk mendegradasi dan melarutkan dinding sel mikroorganisme (Griffin 1994: 56). Menurut Valera *dkk.* (2009: 557), NaOCl dapat bereaksi dengan sitoplasma mikroorganisme sehingga membentuk senyawa N-kloro yang bersifat toksik bagi mikroorganisme tersebut. Abdeel-Motaal *dkk.* (2010: 2884 dan 2887) melaporkan telah mengisolasi kapang endofit dari daun *Hyocamus muticus* L. dengan teknik *surface sterilization* menggunakan larutan etanol dan sodium hipoklorit. Kapang endofit yang diisolasi antara lain *Aspergillus flavus* Link dan *Penicillium funiculosum* Thom. Guimarães *dkk.* (2008: 135) melaporkan telah mengisolasi fungi endofit dari daun *Viguiera arenaria* dan *Tithonia diversifolia* dengan teknik *surface sterilization* menggunakan larutan etanol dan sodium hipoklorit. Fungi endofit yang berhasil diperoleh adalah *Fusarium* sp. dan *Diaporthe helianthi* Munt. -Cvetk., Mihaljc. dan M. Petrov.

2.4 IDENTIFIKASI KAPANG ENDOFIT SECARA KONVENSIONAL

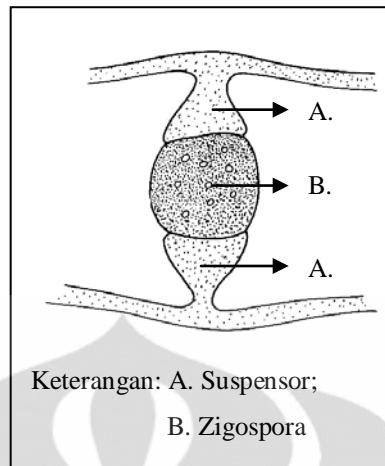
Identifikasi kapang secara konvensional dapat dilakukan dengan mengamati karakter fenotipik morfologi secara mikroskopik dan makroskopik kapang, kemudian dibandingkan dengan monograf. Menurut Gandjar *dkk.* (2000: 4--5) dan Pitt dan Hocking (2009: 53), hal-hal yang perlu diamati pada pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik kapang adalah ada tidaknya spora seksual dan aseksual, tipe spora seksual dan aseksual, bentuk spora seksual (Gambar 2.4.1 dan Gambar 2.4.2), bentuk spora aseksual (Gambar 2.4.3), ukuran spora aseksual dan seksual, tipe *conidiogenous cell*, ada tidaknya septa pada hifa,

dan ukuran lebar hifa. Hal-hal yang perlu diamati pada pengamatan karakter morfologi makroskopik koloni kapang adalah warna koloni, tekstur koloni, keberadaan zonasi, keberadaan garis-garis radial, keberadaan *growing zone*, dan pengamatan sebalik koloni. Apabila hanya ditemukan spora aseksual pada pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik, maka kapang tersebut sedang berada pada fase anamorf (Pitt dan Hocking 2009: 43, 53, dan 54). Apabila ditemukan spora seksual pada pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik, maka kapang tersebut sedang berada pada fase teleomorf (Carlile *dkk.* 2001: 46). Apabila tidak ditemukan spora (aseksual maupun seksual) pada pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik kapang, maka kapang tersebut disebut *Mycelia sterilia* (Barnett dan Hunter 1955: 208).



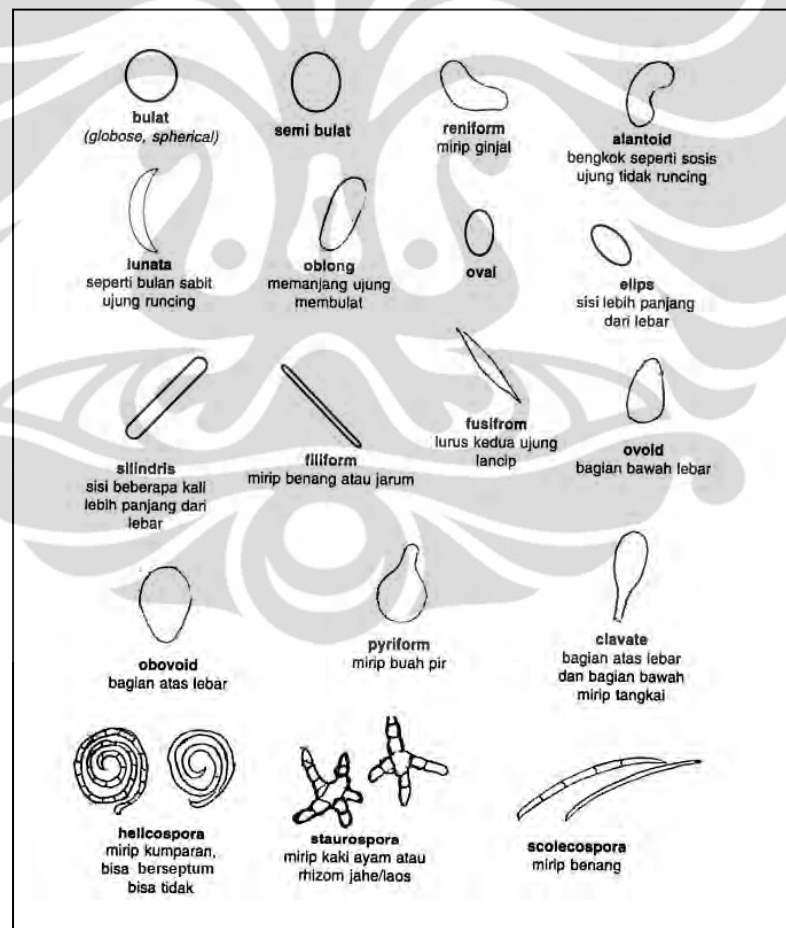
Gambar 2.4.1 Beberapa bentuk askus

[Sumber: Gandjar *dkk.* 2006: 51 dengan modifikasi]



Gambar 2.4.2 Contoh zigospora

[Sumber: Mackean dan Mackean 2011: 1]

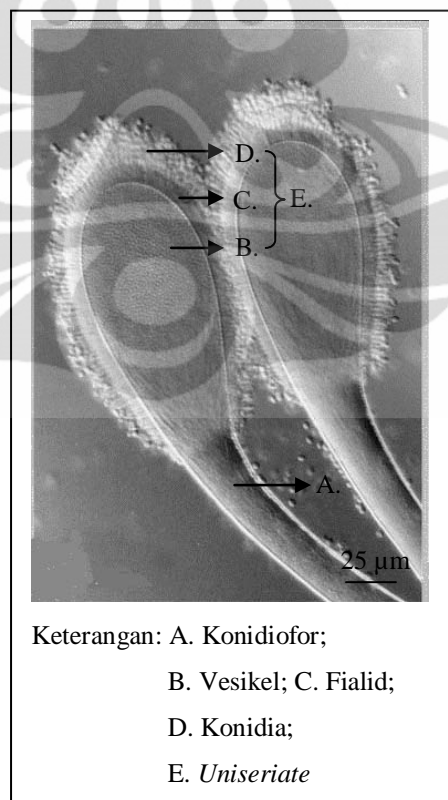


Gambar 2.4.3 Beberapa bentuk konidia

[Sumber: Gandjar *dkk.* 2006: 61]

Kapang pada umumnya termasuk ke dalam filum *Zygomycota* dan *Ascomycota* (Dijksterhuis dan Samson 2007: 53). Contoh kapang *Zygomycota* pada fase anamorf adalah *Syncephalastrum* (Gandjar *dkk.* 2006: 62), sedangkan kapang *Zygomycota* pada fase teleomorf adalah *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Lindt. (Gandjar *dkk.* 2000: 106). Contoh kapang *Ascomycota* pada fase anamorf adalah *Aspergillus* (Samson dan Hoekstra 2004: 64--65), sedangkan contoh kapang *Ascomycota* pada fase teleomorf adalah *Eurotium* Link: Fr. (Pitt dan Hocking 2009: 281).

Menurut Samson dan Hoekstra (2004: 64--65), *Aspergillus* merupakan kapang anamorf (Gambar 2.4.4). Konidiofor *Aspergillus* tidak bercabang dan memiliki ujung membulat yang disebut vesikel. Hifa *Aspergillus* umumnya tidak berseptata. Apabila fialid yang menghasilkan konidia berada langsung pada vesikel, maka kepala konidia disebut *uniseriate*. Apabila fialid yang menghasilkan konidia berada pada metula yang terbentuk pada vesikel, maka kepala konidia disebut *biseriate*. Vesikel, fialid, metula (jika ada), dan konidia membentuk

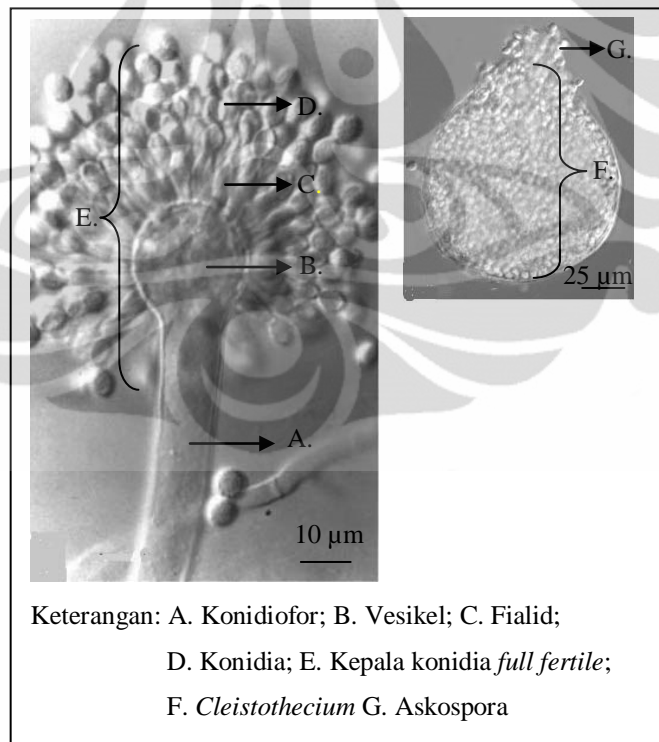


Gambar 2.4.4 *Aspergillus clavatus* Desm.

[Sumber: Pitt dan Hocking 2009: 303]

kepala konidia. Bentuk kepala konidia adalah radial, yaitu jika kepala konidia terdiri dari fialid yang menghasilkan konidia mengelilingi sebagian atau seluruh vesikel, dan kolumnar, yaitu jika kepala konidia terdiri dari fialid yang menghasilkan konidia membentuk kolom yang kompak. Menurut Pitt dan Hocking (2009:), kepala konidia Menurut Samson dan Hoekstra (2004: 64), koloni *Aspergillus* pada umumnya bersporulasi pada usia koloni tujuh hari, berwarna putih, kuning, kuning kecokelatan, coklat kehitaman, atau hijau. Carusso *dkk.* (2000: 7) melaporkan telah mengisolasi fungi endofit *Aspergillus* dari tumbuhan *Taxus*. Khan *dkk.* (2007: 2237) melaporkan telah mengisolasi *Aspergillus* dari tumbuhan *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

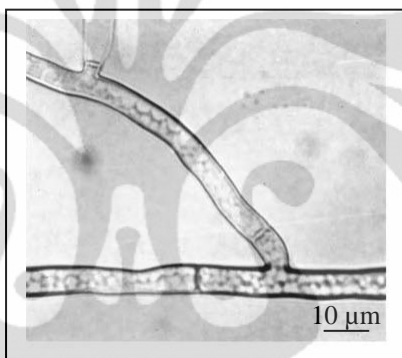
Menurut Pitt dan Hocking (2009: 281), *Eurotium* merupakan kapang *Aspergillus* yang berada dalam fase teleomorf (Gambar 2.4.5). Karakter khusus *Eurotium* adalah memiliki *cleistothecia* berwarna kuning dan berdinding sel halus. *Eurotium* merupakan kapang xerofil.



Gambar 2.4.5 *Eurotium rubrum* Jos. König *dkk.*

[Sumber: Pitt dan Hocking 2009: 290]

Mycelia sterilia adalah fungi yang hanya terdiri dari hifa steril (Gambar 2.4.6) (Uchida 2006: 1). *Mycelia sterilia* tidak memiliki spora seksual maupun aseksual (Barnett dan Hunter 1955: 208). *Mycelia sterilia* tidak memiliki struktur konidiofor (Barnett dan Hunter 1998: 34) dan tidak memiliki konidia (Sugiyama 1987: 278). *Mycelia sterilia* dapat tumbuh menggunakan miselia sebagai alat reproduksi (Osborne 2008: 1). *Mycelia sterilia* dapat diidentifikasi apabila telah bersporulasi. Apabila *Mycelia sterilia* tidak bersporulasi, maka identifikasi dapat dilakukan menggunakan teknik molekular (Guo *dkk.* 1998: 110). Wang *dkk.* (2007: 82) melaporkan telah mengisolasi fungi endofit *Mycelia sterilia* dari *Quercus variabilis*.



Gambar 2.4.6 Contoh *mycelia sterilia*
[Sumber: Watanabe 2002: 389]

2.5 METABOLIT SEKUNDER

Metabolit sekunder adalah molekul kecil yang memiliki struktur kimia yang sangat beragam, bersifat ekstraseluler, dan berperan dalam interaksi ekologi dengan organisme lain (Pointing dan Hyde 2001: 157--158; Dijksterhuis dan Samson 2007: 121). Fungi dapat menghasilkan satu atau beberapa jenis metabolit sekunder tergantung pada kondisi lingkungan, seperti jumlah nutrisi dan keberadaan air. Metabolit sekunder dapat dihasilkan pada lingkungan yang kurang mendukung, misalnya kekurangan nutrisi. Biakan mikroorganisme di dalam medium cair dapat menghasilkan metabolit sekunder pada saat awal fase

stasioner, ketika jumlah nutrien mulai berkurang dan menjadi semakin sedikit (Dijksterhuis dan Samson 2007: 121 dan 123).

Beberapa jalur pembentukan metabolit sekunder telah dilaporkan. Berdasarkan Lengeler *dkk.* (1999: 627) metabolit sekunder dapat terbentuk melalui kondensasi unit asetat-malonat. Unit asetat-malonat terkondensasi dan membentuk poliketida. Apabila malonat disubstitusi dengan metilmalonat, maka rantai poliketida memiliki cabang-cabang gugus metil. Jalur ini merupakan jalur pembentukan metabolit sekunder dari metabolit primer karbohidrat. Mann (1995: 51) melaporkan bahwa griseofulvin yang dihasilkan oleh *Penicillium griseofulvum* Dierckx terbentuk melalui jalur tersebut.

Berdasarkan Lengeler *dkk.* (1999: 628), jalur pembentukan metabolit sekunder berikutnya adalah kondensasi asam amino menjadi oligopeptida. Metabolit sekunder yang diproduksi melalui jalur tersebut berbasis protein. Jalur tersebut merupakan jalur pembentukan metabolit sekunder dari metabolit primer protein (Lengeler *dkk.* 1999: 628). Mann (1995: 251) melaporkan penisilin yang dihasilkan oleh *Penicillium chrysogenum* Thom terbentuk melalui jalur tersebut.

Berdasarkan Lengeler *dkk.* (1999: 628), jalur pembentukan metabolit sekunder berikutnya adalah kondensasi unit karbohidrat (gula amina) menjadi oligosakarida. Beberapa metabolit sekunder yang berupa antibiotik, memiliki gugus aminosiklitol. Apabila terdapat gugus aminosiklitol yang berikatan dengan sakarida, maka metabolit sekunder disebut pseudosakarida. Jalur ini merupakan jalur pembentukan metabolit sekunder dari metabolit primer karbohidrat.

Berdasarkan Lengeler *dkk.* (1999: 629), jalur pembentukan metabolit sekunder berikutnya berhubungan dengan metabolisme nukleosida. Jalur pembentukan antibiotik melalui metabolisme nukleosida yang paling sering ditemukan adalah modifikasi dari purin atau pirimidin. Proses-proses yang terjadi pada pembentukan metabolit sekunder melalui metode ini antara lain: siklisasi, ribosilasi, dan dekarboksilasi.

Berdasarkan Deacon (2006: 133), jalur pembentukan metabolit sekunder berikutnya adalah sintesis metabolit sekunder yang berhubungan dengan jalur pembentukan lipid. Senyawa volatil *Polyacetylenes* yang terdapat pada tubuh

buah Basidiomycota merupakan contoh metabolit sekunder yang dihasilkan melalui jalur tersebut.

Berdasarkan Agusta (2009: 38--94), metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroorganisme dapat digolongkan menjadi alkaloid, fenolik dan turunannya, flavonoid, isokumarin, kuinon, peptida, terpenoid, dan sebagainya. Golongan senyawa metabolit sekunder alkaloid memiliki beberapa kelompok, antara lain: amina dan amida, indol alkaloid, kuinozolina, kuinolin alkaloid, dan piroлизidina. Contoh metabolit sekunder dari kelompok amina dan amida adalah fomopsikalasin yang dihasilkan oleh fungi endofit *Phomopsis* sp. pada tumbuhan *Salix gracilostyla* Willow var. *melanostachys*. Fomopsikalasin memiliki aktivitas antimikroba terhadap *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Salmonella gallinarum* (Klein) Bergey dkk., dan *C. albicans*. Tan dan Zuo (2001: 452) melaporkan fungi endofit *Colletotrichum* sp. Corda pada tumbuhan *Artemisia annua* L. menghasilkan metabolit sekunder dari kelompok indol alkaloid, yaitu 6-isoprenilindol-3-asam karboksilik. Metabolit sekunder tersebut memiliki aktivitas antimikroba terhadap *B. subtilis* dan *Pseudomonas* sp.

Berdasarkan Agusta (2009: 52--94), fungi endofit *Eupenicillium* sp. F. Ludwig pada *Glochidion ferdinandi* (Muell.Arg.) F.M.Bailey dapat menghasilkan metabolit sekunder fenolik, yaitu eupenoksidan. Eupenoksidan memiliki aktivitas antimikroba terhadap *E. coli* ATCC 25922 dan *C. albicans* ATCC 10231. Fungi endofit *Neotypodium typhonium* pada *Poa ampla* Merr. dapat menghasilkan metabolit sekunder flavonoid, yaitu trisin. Trisin memiliki efek toksik terhadap larva nyamuk *Culex pipiens* Linnaeus. Fungi endofit *Geotrichum* sp. Link. pada *Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S.Moore menghasilkan tiga senyawa metabolit sekunder turunan isokumarin yang belum teridentifikasi. Senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas antimalaria, anti-TBC, dan antifungi. Fungi endofit *Penicillium janthinellum* Biourge pada *Melia azedarach* L. dapat menghasilkan emodin yang termasuk ke dalam golongan kuinon. Emodin memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula dan *B. subtilis*. Leusinostatin A merupakan peptida umum yang dihasilkan oleh *Paecilomyces* Bainier dan *Penicillium*. Metabolit sekunder tersebut memiliki aktivitas antifungi dan antikanker. Fungi endofit *Penicillium*

sp. pada *M. azedarch* dapat menghasilkan austinoneol yang termasuk golongan terpenoid. Austinoneol memiliki efek antimikroba bakteriostatik terhadap *E. coli*. Taksol merupakan senyawa diterpena alkaloid yang dihasilkan oleh fungi endofit *Taxomyces andreanae* dari *Taxus brevifolia* dan memiliki aktivitas antikanker.

Metabolit sekunder tidak berfungsi secara langsung untuk pertumbuhan produsen metabolit tersebut tetapi dapat berfungsi untuk memenangkan kompetisi dengan organisme lain (Dijksterhuis dan Samson 2007: 121 dan 124). Contohnya adalah fungi endofit *Pestalotia* sp. De Notaris dari alga *Rosenvingea* sp. Børgesen dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* (Zhang dkk. 2009: 98). Namun demikian, penelitian lebih lanjut melaporkan bahwa metabolit sekunder dapat berguna untuk pertumbuhan, fisiologis, dan reproduksi produsen metabolit tersebut (Dijksterhuis dan Samson 2007: 123). Menurut Agusta (2009: 34--36), metabolit sekunder berhubungan dengan pertumbuhan fungi, yaitu metabolit sekunder sebagai aktivator proses sporulasi, metabolit sekunder sebagai pigmen, dan metabolit sekunder sebagai senyawa bioaktif. Asam 6-metilsalisilat dan griseofulvin adalah dua metabolit sekunder yang dibutuhkan untuk memicu sporulasi pada *Penicillium urticae* Bainier. Pigmen seperti melanin diproduksi untuk melindungi spora dari paparan sinar ultraviolet. Menurut Dijksterhuis dan Samson (2007: 123 dan 199), senyawa bioaktif tersebut dapat berupa antibiotik, mikotoksin, asam organik, dan enzim.

Gangadevi dkk. (2008: 5) melaporkan fungi endofit dapat menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat bioaktif terhadap mikroba lain. *Chaetomium* sp. Kunze dan *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Saccardo dari tumbuhan *Acalypha indica* L. dapat menghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan, dan *Staphylococcus aureus*. Agusta (2009: 38) melaporkan fungi endofit *Phomopsis* sp. (Saccardo) Bubak dari tumbuhan *Salix gracilostyla* Willow dapat menghasilkan senyawa fomopsikalasin yang dapat menghambat pertumbuhan *Bacillus subtilis*, *Salmonella gallinarum*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans*. Menurut Dijksterhuis dan Samson 2007: 135), senyawa bioaktif yang telah dimanfaatkan dalam bidang industri antara lain senyawa penisilin yang dihasilkan oleh *Penicillium chrysogenum*.

2.6 SENYAWA ANTIMIKROBA KAPANG ENDOFIT

Senyawa antimikroba merupakan salah satu senyawa yang dapat dihasilkan oleh fungi endofit (Radji *dkk.* 2011: 103). Senyawa antimikroba adalah senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Contoh senyawa antimikroba yang dapat dihasilkan fungi adalah griseofulvin, yang dihasilkan oleh *Penicillium griseofulvum* dan penisilin, yang dihasilkan oleh *Penicillium chrysogenum* (Hogg 2005: 355).

2.6.1 Senyawa antibakteri

Senyawa antibakteri adalah senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Senyawa antibakteri dapat dihasilkan oleh fungi. Contoh *cephalosporin* yang dihasilkan oleh fungi *Cephalosporium Corda* (Playfair 2004: 62 dan 229).

Senyawa antibakteri dapat dikelompokkan menurut efek senyawa tersebut terhadap bakteri, yaitu senyawa antibakteri bakteriostatik dan senyawa antibakteri bakterisidal. Menurut Hogg (2005: 427), senyawa antibakteri bakteriostatik dapat menghambat pertumbuhan bakteri, tetapi tidak dapat membunuh bakteri. Menurut Collins *dkk.* (2001: 168), senyawa antibakteri bakterisidal adalah senyawa antibakteri yang dapat membunuh 99,9% bakteri. Menurut Mayer (2010: 1), contoh senyawa antibakteri bakteriostatik adalah tetrasiklin. Menurut Hogg (2005: 345), contoh senyawa antibakteri bakterisidal adalah kloramin.

Menurut Hogg (2005: 358--364), mekanisme penghambatan pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat dikelompokkan menjadi empat kelompok, antara lain: menghambat sintesis dinding sel, menghancurkan membran sel, menghambat sintesis protein, dan menghambat sintesis asam nukleat. Senyawa antimikroba dapat menghambat sintesis dinding sel dengan berikatan dengan cara berikatan dengan enzim transpeptidase sehingga sintesis peptidoglikan terhambat dan dinding sel bakteri menjadi lemah. Hal tersebut mengakibatkan air masuk ke dalam sel bakteri sehingga sel bakteri mengalami lisis. Contoh senyawa antibakteri yang dapat menghambat sintesis dinding sel bakteri adalah penisilin.

Senyawa antibakteri dapat menghancurkan membran sel dengan merusak struktur fosfolipid pada membran sel bakteri sehingga komponen-komponen pada sel bakteri keluar dari sel. Contoh senyawa antibakteri yang dapat menghancurkan membran sel adalah polimiksin. Senyawa antibakteri dapat menghambat sintesis protein dengan berikatan dengan 30S subunit ribosom bakteri dan mencegah 30S subunit ribosom berikatan dengan 50S subunit ribosom sehingga mencegah proses inisiasi pada sintesis protein bakteri. Bakteri tidak dapat menghasilkan protein sehingga komponen-komponen sel tidak dapat terbentuk. Contoh senyawa antibakteri yang dapat menghambat sintesis protein adalah tetrasiklin. Senyawa antibakteri dapat menghambat sintesis DNA dengan menonaktifkan enzim RNA polimerase sehingga produksi mRNA terhambat. Sel bakteri tidak dapat menghasilkan DNA sehingga pertumbuhannya terhambat. Contoh senyawa antibakteri yang dapat menghambat sintesis DNA adalah rifamisin.

2.6.2 Senyawa antifungi

Senyawa antifungi adalah senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan fungi. Fungi dapat menghasilkan senyawa antifungi. Contoh senyawa antifungi adalah griseofulvin yang dihasilkan oleh *Penicillium griseofulvum* (Hogg 2005: 369).

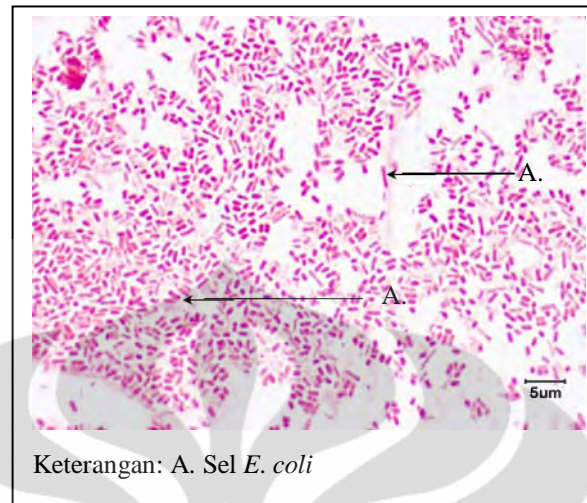
Senyawa antifungi dapat dikelompokkan menurut efek senyawa tersebut terhadap fungi, yaitu senyawa antifungi fungistatik dan senyawa antifungi fungisidal. Menurut Carlile *dkk.* (2001: 179), senyawa antifungi fungistatik dapat menghambat pertumbuhan fungi, tetapi tidak dapat membunuh fungi. Senyawa antifungi fungisidal senyawa antifungi yang dapat membunuh fungi. Contoh senyawa antibakteri bakteriostatik adalah fenilmorfolin. Contoh senyawa antibakteri bakterisidal adalah amphotericin B.

Menurut Bossche (1997: 45), mekanisme penghambatan pertumbuhan fungi oleh senyawa antifungi dapat dikelompokkan menjadi empat kelompok, antara lain: menghambat sintesis DNA dan RNA sel fungi, menghambat sintesis ergosterol pada membran sel fungi, dan menghambat mitosis sel fungi. Menurut Ghannoum dan Rice (1999: 504, 509, dan 513), senyawa antifungi dapat

menghambat sintesis DNA dan RNA dengan menjadi *inhibitor* bagi enzim timidilat sintase yang berperan dalam sintesis DNA dan pembelahan inti sel fungi. Pertumbuhan sel fungi menjadi terhambat. Contoh senyawa antifungi yang dapat menghambat sintesis DNA dan RNA adalah 5-fluorositosin. Senyawa antifungi juga dapat merusak membran sel dengan membuat pori-pori pada membran sel sehingga komponen sitoplasma keluar dari sel dan sel fungi mati. Contoh senyawa antifungi yang dapat merusak membran sel adalah *nystatin*. Senyawa antifungi juga dapat menghambat sintesis ergosterol dengan menjadi *inhibitor* bagi enzim 14 α -demetilase yang berperan dalam sintesis ergosterol. Hal tersebut membuat transportasi air, nutrisi, dan sebagainya pada membran sel fungi menjadi tidak teratur sehingga sel fungi mati. Contoh senyawa antifungi yang dapat menghambat sintesis ergosterol adalah mikonazol. Menurut Bossche (1997: 48), senyawa antifungi dapat menghambat mitosis sel fungi dengan mengganggu proses *sliding* mikrotubulus yang diperlukan untuk pemisahan kromosom pada saat mitosis. Pertumbuhan sel fungi menjadi terhambat. Contoh senyawa antifungi yang dapat menghambat mitosis fungi adalah griseofulvin.

2.7 MIKROBA UJI

Beberapa mikroba uji adalah *Escherichia coli* (Gambar 2.7.1) (Mitchell dan Gu 2010: 37), *Bacillus subtilis* (Simarmata dkk. 2007: 85) dan *Candida albicans* (Gandjar dkk. 2006: 89). *Escherichia coli* berasal dari filum *Proteobacteria* (Hogg 2005: 161), famili *Enterobacteriaceae* (Barrow dan Feltham 1993: 135), merupakan bakteri Gram negatif (Mitchell dan Gu 2010: 169), berukuran 3 x 1 μm (Tortora dkk. 2001: 373), berbentuk batang (Madigan dkk. 2000: 58) bersifat motil, dapat memfermentasi laktosa (Collins dkk. 2004: 287), menghasilkan hasil positif yaitu warna merah pada uji indol dan hasil positif yaitu warna merah pada uji metil merah, menghasilkan hasil negatif warna kuning kecokelatan pada uji Voges-Proskauer dan hasil negatif yaitu warna hijau pada uji sitrat (Volk dan Wheeler 1990: 263), dan berwarna hijau metalik bila ditumbuhkan pada medium *Eosin Methylene Blue* (EMB) (Brock dan Madigan 1991: 472). Umumnya *E. coli* terdapat pada saluran pencernaan manusia, namun

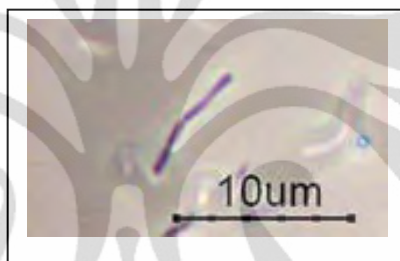
Gambar 2.7.1 *Escherichia coli*

[Sumber: Kaiser 2004: 1]

E. coli juga merupakan mikroorganisme oportunistik yang dapat menyebabkan penyakit seperti diare, meningitis, pneumonia, dan infeksi luka (Wilson 2005: 303; Mitchell dan Gu 2010: 37). *Escherichia coli* serotype O157:H7 dapat menyebabkan keram perut dan diare berdarah (Mitchell dan Gu 2010: 42). *Escherichia coli* ATCC 25922 memiliki biosafety level 1, yang berarti tidak dapat menyebabkan penyakit pada manusia dewasa pada umumnya. *Escherichia coli* ATCC 25922 merupakan isolat klinis (ATCC (1) 2011: 1). de Siquira dkk. (2011: 2) melaporkan bahwa *E. coli* ATCC 25922 digunakan sebagai mikroba uji pada uji aktivitas antimikroba kapang endofit asal *Lippia sidoides* Cham. Johann dkk. (2007: 682) melaporkan bahwa *E. coli* ATCC 25922 digunakan sebagai mikroba uji pada aktivitas antimikroba *Citrus* spp.

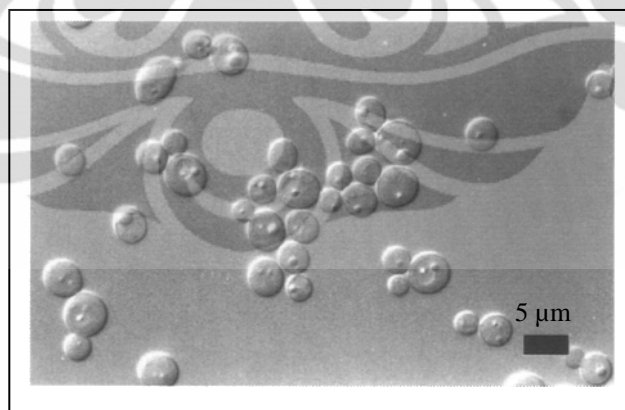
Bacillus subtilis (Gambar 2.7.2) berasal dari filum *Firmicutes* (Hogg 2005: 189), famili *Bacillaceae* (Buchanan dan Gibbons 1974: 531), merupakan bakteri Gram positif (Villa dan Crespo 2010: 223), berukuran $(0,7-0,8) \times (2-3) \mu\text{m}$, berbentuk batang (Buchanan dan Gibbons 1974: 531 dan 533), bersifat motil, memiliki endospora, bersifat aerob, dapat memetabolisme H_2O_2 (Collins dkk. 2004: 362 dan 364), dapat memetabolisme kasein (Barrow dan Feltham 1993: 88) dan pati, koloni berbentuk bulat, tebal, permukaan kusam, dapat hidup pada suhu maksimum 55°C dan suhu minimum 5°C (Buchanan dan Gibbons 1974: 533),

menghasilkan hasil positif yaitu warna merah pada uji Voges-Proskauer, menghasilkan hasil negatif yaitu warna kuning uji indol (Barrow dan Feltham 1993: 88). Bakteri tersebut umum ditemukan pada sayur dan buah yang rusak (Collins *dkk.* 2004: 363 dan 365). *Bacillus subtilis* merupakan mikroorganisme yang normal terdapat pada kulit manusia (Wilson 2005: 77). *Bacillus subtilis* ATCC 6633 memiliki *biosafety level* 1 (ATCC (2) 2011: 1). Radji *dkk.* (2011: 104) melaporkan penggunaan *B. subtilis* ATCC 6633 sebagai mikroba uji pada aktivitas antimikroba kapang endofit asal *Garcinia mangostana* L. Can-Aké *dkk.* (2004: 12) melaporkan penggunaan *B. subtilis* ATCC 6633 sebagai mikroba uji pada aktivitas antimikroba daun dan akar *Jatropha gaueri* Greenm.



Gambar 2.7.2 *Bacillus subtilis*

[Sumber: Rutgers 2011: 1]



Gambar 2.7.3 *Candida albicans*

[Sumber: Kurtzman dan Fell 1998: 478]

Khamir *C. albicans* (Gambar 2.7.3) berasal dari filum *Ascomycota* (Webster dan Weber 2007: 226), berbentuk oval hingga bulat dengan ukuran (3,5-6) x (4--8) µm (Kurtzman dan Fell 1998: 477), dapat tumbuh pada suhu 20--40°

C dan pH 2--8, bereproduksi dengan *budding* dan hifa (dimorfisme), bersifat anaerob fakultatif, dapat mengkatabolisme glukosa, sukrosa, maltosa, galaktosa, dan xilosa, merupakan fase anamorf, dan koloni dapat berwarna putih atau hialin (Webster dan Weber 2007: 226, 276 dan 278). *Candida albicans* dapat menyebabkan penyakit *candidiasis* (Gandjar *dkk.* 2006: 205).

2.8 BLOK AGAR

Metode blok agar dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas antimikroba suatu isolat kapang. Medium agar yang telah ditumbuhi kapang hingga bersporulasi dipotong dan diletakkan pada medium yang telah diinokulasikan mikroba uji. Prinsip dari metode ini adalah difusi senyawa antimikroba dari blok agar ke medium uji sehingga menghasilkan zona bening. Zona bening mengindikasikan kapang memiliki aktivitas antimikroba (Nedialkova dan Naidenova 2005: 30)

Zhang *dkk.* (2009: 100) dan Stern *dkk.* (2006: 3112) melaporkan penggunaan blok agar sebagai metode uji aktivitas antimikroba. Zhang *dkk.* (2009: 100) melaporkan sejumlah 43 isolat fungi diujikan terhadap enam mikroba uji dengan metode blok agar. Sejumlah 79,1 % isolat memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram positif. Sejumlah 62,8 % isolat memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram negatif. Sejumlah 37,2 % isolat memiliki aktivitas antimikroba terhadap *C. albicans*. Stern *dkk.* (2006: 3112) melaporkan blok agar dari *Lactobacillus salivarius* memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Campylobacter jejuni*.

2.9 *Broussonetia papyrifera* Vent.

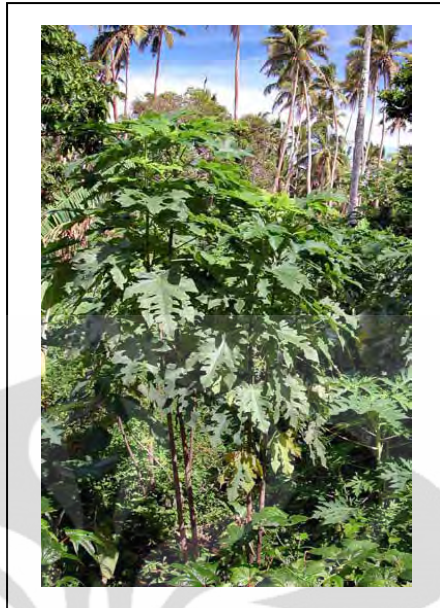
Broussonetia papyrifera di Jawa Barat disebut tumbuhan saeh (Permadi 2005: 3). Persebaran tumbuhan tersebut di Indonesia yaitu Sumatera, Jawa, Sulawesi, Kepulauan Sunda Kecil, Flores, dan Maluku (Kehati 2010: 1). *Broussonetia papyrifera* hidup di daerah beriklim tropis dengan ketinggian 0--1.500 meter di atas permukaan air laut (Whistler dan Elevitch 2006: 1) dan

memiliki habitat di daerah dataran rendah dan pegunungan (Kehati 2010: 1). *Broussonetia papyrifera* dapat dilihat pada Gambar 2.9.1.

Broussonetia papyrifera termasuk dalam famili *Moraceae*. Tinggi *B. papyrifera* dapat mencapai 15 meter (Backer dan Brink 1965: 16), umumnya hanya mencapai sekitar 3 meter (Aubertin 2004: 228). Bunga dari tumbuhan tersebut merupakan bunga majemuk. Bunga jantan dari *B. papyrifera* berbentuk silinder, berduri, memiliki empat buah stamen, sedangkan bunga betina membulat, ovul subapikal. Daunnya berbentuk ovatus membelah yang terdiri dari 3--5 lobus, akuminatus, tepi daun tipe serratus, bagian bawah daun berambut. Panjang daun dari 7--20 cm dan lebar daun 5--15 cm. Buah tumbuhan tersebut berbentuk globus hingga oval (*club shaped*) dengan diameter 1--2,5 cm dan bertipe drupa. *Broussonetia papyrifera* dapat dikembangbiakan secara vegetatif yaitu dengan stek batang atau akar (Whistler dan Elevitch 2006: 3 dan 5).

Broussonetia papyrifera dimanfaatkan untuk obat-obat tradisional (Dweck 2003: 1). Daun *B. papyrifera* digunakan untuk obat pencahar anak-anak (Kehati 2010: 1), menghentikan muntah darah, pendarahan berlebihan saat menstruasi, luka berdarah, dan perut berdarah. Getah dari daunnya digunakan untuk membersihkan nanah (Dweck 2003: 3).

Ekstrak tumbuhan *B. papyrifera* dilaporkan juga dapat dimanfaatkan. *Broussonetia papyrifera* dilaporkan dapat menghasilkan senyawa *broussonin A*, sejenis fitoalexin, yang dapat berguna sebagai senyawa antimikroba dan belum dipasarkan ke masyarakat. Selain itu, *kazinol F* yang dihasilkan dari *B. papyrifera* dapat berguna untuk depigmentasi kulit. Depigmentasi kulit berarti tidak mengubah warna kulit, seperti mencegah munculnya bintik-bintik di kulit wajah, noda penuaan kulit, dan perubahan warna kulit karena kehamilan (Dweck 2003: 4--5). *Broussonetia papyrifera* dilaporkan memiliki senyawa sejenis flavonoid, penghambat enzim aromatase (penyebab penyakit kanker) (Kinghorn *dkk.* 2004: 3).



Gambar 2.9.1 Tumbuhan *Broussonetia papyrifera*

[Sumber: Whistler dan Elevitch 2006: 1]

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 LOKASI DAN WAKTU

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

3.2 ALAT

Alat-alat yang digunakan adalah cawan Petri, tabung reaksi, Erlenmeyer (ukuran 1L dan 100 mL), *beaker glass*, gelas ukur, batang pengaduk, skalpel, spatula, spatel *Drygalski*, gunting, jarum tanam tajam, jarum tanam bulat, pembakar spiritus, *lighter*, autoklaf [Hirayama HA 240 MIV dan Hirayama HL 36 AE], oven [Heraeus], lemari pendingin [Gassio], kompor listrik [Sanyo], pemanas air [Sharp], timbangan digital [And EW-300 G], timbangan analitik [Sartorius], mikropipet P1000, P200 dan P20 [Gilson], tips mikropipet, tabung *Eppendorf*, tabung *polypropylene*, *transfer box*, vorteks [Bio-Rad dan Heidolph], mikroskop trinokular [Carl-Zeiss], mikroskop cahaya [Eurommex], dan jangka sorong [Tekimen].

3.3 BAHAN

3.3.1 Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan adalah koleksi UICC yang diisolasi dari daun *B. papyrifera* asal Kecamatan Trowulan Kota Mojokerto, dua isolat kapang endofit yang diisolasi dari daun *B. papyrifera* asal Kota Bandung, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, dan khamir uji *Candida albicans*

UICC Y-29. Kode isolat-isolat kapang endofit koleksi UICC adalah ES5 dan ES6. Kode isolat-isolat kapang endofit asal Bandung adalah ES7 dan ES8.

3.3.2 Sampel daun

Sampel daun yang digunakan adalah daun tumbuhan *B. papyrifera* dari daerah Bandung.

3.3.3 Medium

Medium *Plate Count Agar* (PCA) [Britania], digunakan untuk isolasi kapang endofit dari tumbuhan *B. papyrifera*. Medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) [Merck], digunakan untuk menumbuhkan dan memelihara kapang endofit. Medium *Nutrient Agar* (NA) [Difco], digunakan untuk enumerasi dan pengujian aktivitas antimikroba kapang endofit terhadap bakteri uji dengan blok agar. Medium *Yeast Malt Extract* (YMA), YMA digunakan untuk enumerasi dan pengujian aktivitas antimikroba kapang endofit terhadap khamir uji dengan blok agar.

3.3.4 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah akuades, alkohol 70%, etanol 96% p.a. [Merck], kloramfenikol [Wako], tetrasiklin [Kimia Farma], *nystatin* [Pharos], dan sodium hipoklorit [Bayclin].

3.3.5 Bahan habis pakai

Bahan habis pakai yang digunakan adalah plastik tahan panas [Bell], masker, *selotape* [Scotch], parafilm [M], tisu gulung, kertas, karet gelang, dan kapas.

3.4 CARA KERJA

Skema kerja dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.4.1 Pembuatan medium

3.4.1.1 *Plate Count Agar (PCA)*

Petunjuk pembuatan medium berdasarkan label pada botol penyimpanan PCA. Medium PCA sebanyak 1.000 mL dibuat dengan cara melarutkan 23,5 g bubuk PCA dalam akuades sebanyak 1.000 mL. Campuran medium dipanaskan dan diaduk hingga homogen kemudian disteril pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium ditambahkan antibiotik tetrasiklin sebanyak 500 mg. Medium dibagikan ke dalam masing-masing cawan Petri sebanyak 15 mL.

3.4.1.2 *Potato Dextrose Agar (PDA)*

Petunjuk pembuatan medium berdasarkan label pada botol penyimpanan PDA. Medium PDA sebanyak 1.000 ml dibuat dengan cara melarutkan 39 g bubuk PDA dalam akuades sebanyak 1.000 mL. Campuran medium dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Medium ditambahkan antibiotik kloramfenikol sebanyak 0,2 mg. Medium sebanyak 5 mL dituangkan ke dalam tiap tabung reaksi dengan menggunakan *dispenser*. Medium disterilkan pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium PDA untuk cawan Petri dibuat dengan komposisi dan cara yang sama seperti sebelumnya dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer sebanyak 1.000 mL. Medium disterilkan pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium steril dibagikan sebanyak 15 mL ke dalam masing-masing cawan Petri.

3.4.1.3 *Nutrient Agar (NA)*

Petunjuk pembuatan medium berdasarkan label pada botol penyimpanan NA. Medium NA sebanyak 1.000 mL dibuat dengan cara melarutkan 31 g bubuk NA dalam akuades sebanyak 1.000 mL. Campuran medium dipanaskan dan diaduk hingga homogen kemudian disterilkan pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium dibagikan ke dalam masing-masing cawan Petri sebanyak 20 mL.

3.4.1.4 *Yeast Malt Extract Agar (YMA)*

Petunjuk pembuatan medium berdasarkan Atlas (2010: 1934). Medium YMA sebanyak 1.000 mL dibuat dengan cara melarutkan 20 g agar, 10 g glukosa, 5 g pepton, 3 g ekstrak khamir, dan 3 g ekstrak *malt* dalam akuades. Larutan tersebut dipanaskan hingga mendidih dan disterilkan pada suhu 121° C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium dibagikan ke dalam masing-masing cawan Petri sebanyak 20 mL.

3.4.2 Isolasi kapang endofit dengan *surface sterilization*

Isolasi kapang endofit dengan *surface sterilization* dilakukan berdasarkan Larran *dkk.* (2001: 182). Daun saeh utuh ditimbang. Apabila massanya lebih dari 1 gram, maka daun tersebut dipotong menggunakan gunting menjadi bagian yang lebih kecil sehingga massanya menjadi 1 gram. Daun-daun tersebut dimasukkan ke dalam delapan tabung *polypropilene* steril. Daun yang terdapat di tiap tabung *polypropilene* dipotong lagi menjadi lebih kecil dan dimasukkan kembali ke dalam tabung tersebut. Daun dicuci dengan NaOCl 10 mL, kemudian divorteks selama lima menit. Daun tersebut dibilas dengan akuades steril, lalu divorteks lagi selama lima menit. Pembilasan tersebut dilakukan ulang sebanyak tiga kali. Daun ditiriskan di atas kertas saring steril di dalam cawan Petri. Daun yang telah kering diletakkan dalam cawan Petri dengan medium PCA dan diinkubasikan pada suhu ruang.

3.4.3 Pemurnian kapang endofit

Pemurnian kapang endofit dilakukan dengan teknik *quadrant streak* berdasarkan Benson (2001: 85). Pemurnian kapang pada medium PCA. Kapang endofit diinokulasi dengan jarum tanam tajam pada medium di cawan Petri. Kapang endofit diinokulasikan kemudian digores sebanyak tiga kali. Biakan diinkubasi pada suhu ruang selama 3--5 hari hingga kapang endofit bersporulasi. Koloni tunggal yang diperoleh merupakan koloni representatif.

3.4.4 Pembuatan *stock* dan *working culture*

Pembuatan *stock culture* dan *working culture* kapang endofit, bakteri, dan khamir uji dari biakan murni yang representatif. Koloni representatif ditransfer ke medium dalam tabung. Medium yang digunakan adalah PDA untuk fungi dan NA untuk bakteri. Kultur dalam tabung tersebut diinkubasi di suhu ruang selama tujuh hari untuk kapang endofit, dua hari untuk bakteri, dan tiga hari untuk khamir. Kultur dari tiap mikroorganisme disimpan di lemari pendingin dengan suhu 4° C dan digunakan sebagai *stock culture*. Satu tabung kultur dari tiap mikroorganisme digunakan sebagai *working culture*. Peremajaan *stock culture* dilakukan setelah umur kultur enam bulan.

3.4.5 Identifikasi kapang endofit

Identifikasi kapang endofit dilakukan dengan melakukan pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dan makroskopik kapang endofit tersebut dan membandingkan dengan monograf oleh Samson dan Hoekstra (1981), Klich (2002), dan Barnett dan Hunter (2003). Pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik pada preparat kapang endofit dengan mengamati ada tidaknya spora seksual atau aseksual, tipe spora seksual atau aseksual, bentuk spora seksual atau aseksual, ukuran spora seksual atau aseksual, ada tidaknya septa pada hifa, ukuran hifa, dan ukuran spora aseksual khusus (misalnya klamidospora). Preparat kapang endofit dibuat dengan cara sebagai berikut: biakan yang telah bersporulasi dalam

Petri dengan medium PDA disiapkan. *Object glass* disiapkan dan ditetesi *lactophenol cotton blue*. *Selotape* dipotong hingga panjangnya $\frac{2}{3}$ panjang *object glass*. *Selotape* dilipat dengan bagian yang lekat ke arah petri. Kedua ujung *selotape* ditempelkan ke kedua ujung pinset. *Selotape* ditempelkan ke biakan dalam petri dan ditekan. *Selotape* diangkat dan diletakkan di *object glass* yang telah ditetesi *lactophenol cotton blue*. *Selotape* ditekan dan diratakan pada *object glass*. Preparat diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 400 kali.

Cara lain membuat preparat kapang endofit adalah sebagai berikut: biakan yang telah bersporulasi dalam medium PDA Petri disiapkan. *Object glass* disiapkan. Preparat diambil dengan mengambil (mencungkil) sedikit bagian tepi koloni menggunakan jarum tanam tajam atau jarum tanam bulat dan diletakkan pada *object glass*. Bagian koloni tersebut diratakan sambil ditetesi alkohol teknis dan dilewatkan di atas api hingga alkohol tersebut menguap. Proses tersebut dapat diulang hingga 2--3 kali. Bagian koloni yang sudah tidak mengandung agar ditetesi *lactophenol cotton blue* dan ditutup dengan *cover glass*. Preparat tersebut diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 400 kali.

Pengamatan karakter morfologi secara makroskopik kapang endofit dilakukan pada biakan kapang endofit umur tujuh hari yang ditumbuhkan pada medium PDA. Pengamatan secara makroskopik dengan mengamati warna koloni, tekstur, keberadaan zonasi, keberadaan *radial furrow*, keberadaan *growing zone*, keberadaan *exudate drops*, waktu sporulasi, dan warna, keberadaan zonasi, dan *radial furrow* pada pengamatan sebalik koloni.

3.4.6 Pengujian aktivitas antimikroba kapang endofit

Pengujian aktivitas antimikroba kapang endofit terhadap bakteri uji *E. coli* ATCC 25922 dan *B. subtilis* ATCC 6633 dan khamir uji *C. albicans* UICC Y-29 dengan blok agar dilakukan menurut Zhang *dkk.* (2009: 100). Kapang endofit ditumbuhkan pada medium PDA dalam Petri. Koloni kapang berumur satu minggu yang telah bersporulasi dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm dan diletakkan pada Petri berisi medium NA yang berisi bakteri uji berumur 1 hari sebanyak 0,2 mL dan medium YMA yang berisi khamir uji berumur 2 hari sebanyak 0,2 mL

(masing-masing dengan kepadatan populasi 10^6 CFU/mL). Biakan diinkubasi selama 24 jam (bakteri) dan 48 jam (khamir) pada suhu 27°C . Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening yang mengindikasikan kapang endofit memiliki aktivitas antimikroba terhadap mikroba uji. Hasil negatif ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona bening yang mengindikasikan kapang endofit tidak memiliki aktivitas antimikroba terhadap mikroba uji.

3.4.7 Analisis data

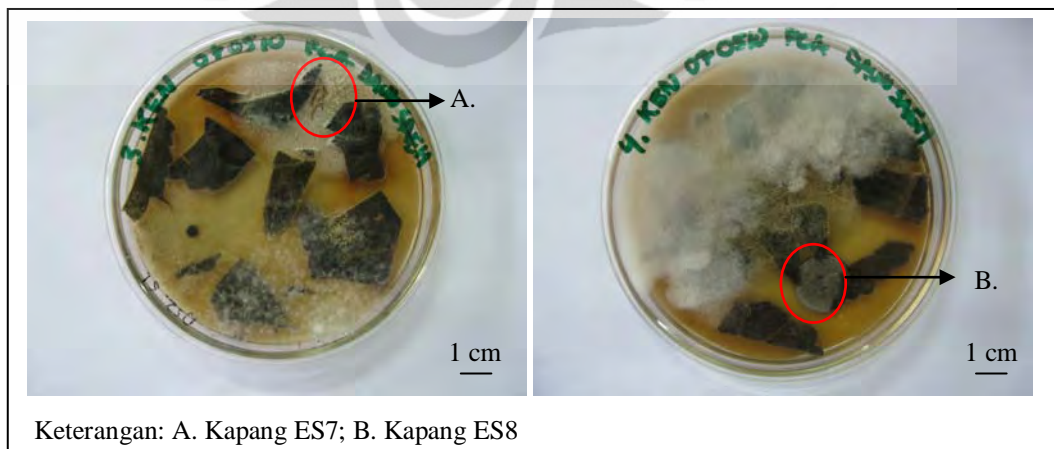
Data yang diperoleh akan disusun dalam tabel dan gambar. Data yang diperoleh bersifat kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif dianalisis secara deskriptif dan data kuantitatif dianalisis dengan standar deviasi. Data-data kualitatif adalah jumlah kapang endofit yang berhasil diisolasi dan keberadaan zona bening pada penapisan dengan agar blok. Data-data kuantitatif adalah ukuran kepala konidia, konidia, klamidospora, dan hifa kapang endofit.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 ISOLASI KAPANG ENDOFIT DENGAN *SURFACE STERILIZATION*

Dua kapang endofit berhasil diisolasi dari daun *B. papyrifera*. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 4.1.1. Kapang ES7 diisolasi setelah daun diinkubasi selama empat hari, sedangkan kapang ES8 diisolasi setelah daun diinkubasi selama sebelas hari. Diduga kapang ES7 dan ES8 merupakan kapang endofit karena kapang tersebut tumbuh dari potongan daun *B. papyrifera*. Hal tersebut mengindikasikan kapang ES7 dan ES8 adalah kapang endofit yang berasal dari daun *B. papyrifera*. Mikroorganisme epifit telah dihilangkan menggunakan sodium hipoklorit. Menurut Griffin (1994: 56), sodium hipoklorit berfungsi untuk mendegradasi dan melarutkan dinding sel mikroorganisme. Menurut Valera *dkk.* (2009: 557), NaOCl dapat bereaksi dengan sitoplasma mikroorganisme sehingga membentuk senyawa N-kloro yang bersifat toksik bagi mikroorganisme tersebut dan menyebabkan kematian sel. Larran *dkk.* (2001: 182) melaporkan telah mengisolasi 15 fungi endofit dengan *surface sterilization* dari potongan daun *Lycopersicon esculentum*. de Errasti *dkk.* (2010: 32) melaporkan telah mengisolasi 28 fungi endofit dari tumbuhan *B. papyrifera* dari Argentina.



Gambar 4.1.1 Hasil pengamatan isolasi kapang endofit dari daun *B. papyrifera*
[Sumber: Dokumentasi pribadi]

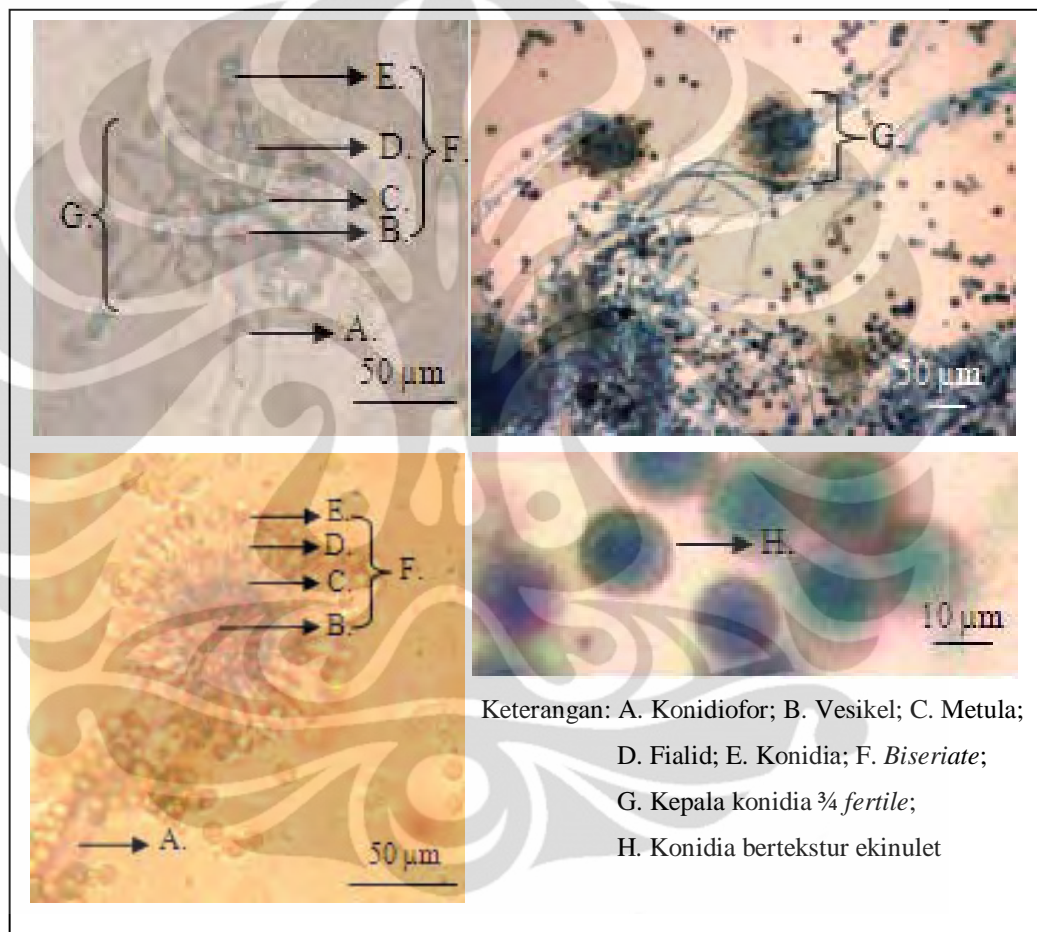
4.2 IDENTIFIKASI KAPANG ENDOFIT

4.2.1 *Aspergillus flavus* ES6

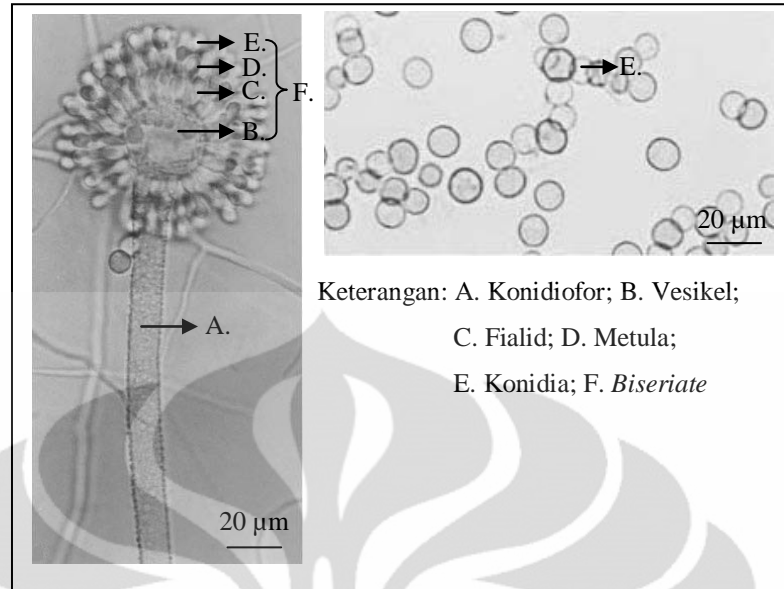
Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik kapang endofit ES6 umur 19 hari dalam medium PDA pada suhu ruang tidak memperlihatkan adanya alat reproduksi seksual namun memperlihatkan adanya alat reproduksi aseksual. Kapang endofit ES6 adalah kapang anamorfik. Kapang endofit ES6 memiliki konidia hifa tidak berseptata. Kapang endofit ES6 memiliki vesikel, metula, fialid, dan konidia sehingga vesikel adalah tipe *biseriate*. Kapang endofit ES6 memiliki kepala konidia berbentuk radial dan fialid tumbuh pada sebagian vesikel ($3/4$ *fertile*). Hasil tersebut menunjukkan bahwa kapang endofit ES6 adalah *Aspergillus flavus*. Deskripsi *A. flavus* ES6 sesuai dengan deskripsi kapang *A. flavus* monograf *Introduction to food-borne fungi* oleh Samson *dkk.* (1981: 58).

Kapang *Aspergillus flavus* ES6 umur 19 hari pada medium PDA di suhu ruang memiliki vesikel yang dapat diamati dengan jelas. *Aspergillus flavus* ES6 memiliki vesikel, fialid, metula, dan konidia sehingga vesikel adalah *biseriate*. *Aspergillus flavus* ES6 memiliki kepala konidia berbentuk radial dan fialid tumbuh pada sebagian vesikel ($3/4$ *fertile*). Bentuk vesikel adalah bulat. Panjang kepala konidia berkisar 49,8--131,2 μm dan lebar kepala konidia berkisar 45,7--155,9 μm . Konidia berbentuk bulat, bertekstur ekinulet, dengan ukuran diameter berkisar 8,6--13,1 μm . Lebar hifa berkisar 13,1--24,8 μm . Kapang *A. flavus* ES6 umur 14 hari pada medium PDA di suhu ruang telah bersporulasi, memiliki warna koloni hijau *Hooker's 159* (standar warna pada Lampiran 2) dengan tekstur granular, memiliki zonasi, *growing zone*, dan *radial furrow*, namun tidak memiliki *exudate drops*. Pengamatan sebalik koloni memperlihatkan warna koloni cokelat 180 (standar warna pada Lampiran 2) dan memiliki zonasi dan *radial furrow*. Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dan makroskopik *A. flavus* ES6 dapat dilihat pada Gambar 4.2.1.1, Gambar 4.2.1.3, Tabel 4.2.1.1, dan Tabel 4.2.1.2. Menurut Samson *dkk.* (1981: 58), *A. flavus* memiliki tipe kepala konidia radial, vesikel *uniseriate* atau *biseriate*, bentuk

vesikel bulat hingga semi bulat, konidia berbentuk bulat hingga semi bulat, konidia memiliki ekinet, dan ukuran konidia 3--6 μm (Gambar 4.2.1.2). Khan *dkk.* (2007: 2237) melaporkan telah mengisolasi kapang endofit *A. flavus* dari tumbuhan *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. Abdeel-motaal *dkk.* (2010: 2887) melaporkan telah mengisolasi kapang endofit *A. flavus* dari tumbuhan *Hyoscyamus muticus*.

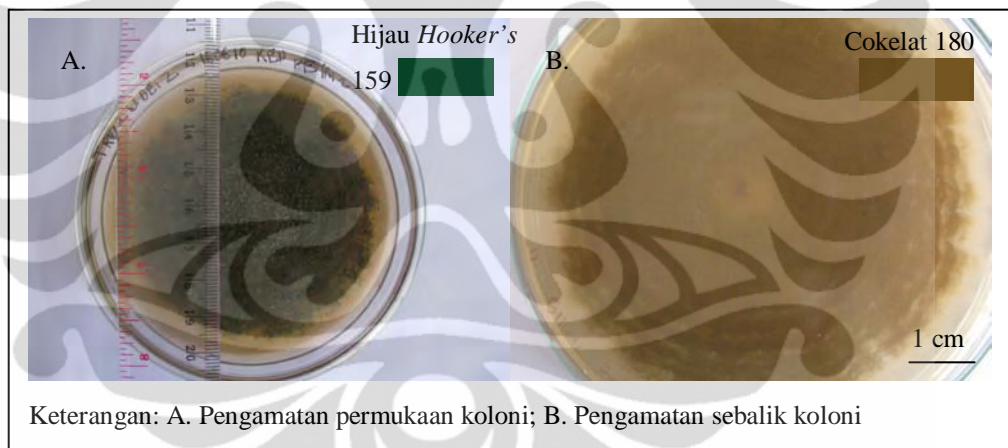


Gambar 4.2.1.1 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik *A. flavus* ES6 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang
[Sumber: Dokumentasi pribadi]



Gambar 4.2.1.2 *Aspergillus flavus*

[Sumber: Samson *dkk.* 1981: 23]



Gambar 4.2.1.3 Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik

A. flavus ES6 umur 14 hari medium PDA pada suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi]

Tabel 4.2.1.1 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik *A. flavus* ES6 dan *A. sparsus* ES5 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang

Kapang endofit	Bentuk kepala konidia	Vesikel	Bentuk vesikel	Bentuk dan tekstur konidia	Ukuran konidia	Struktur hifa	Ukuran hifa
<i>A. flavus</i> ES6	Radial	<i>Biseriate</i>	Bulat	Bulat dan ekinulet	8,6--13,1 μm	Tidak bersepta	13,7--24,8 μm
<i>A. sparsus</i> ES5	Radial	<i>Biseriate</i>	Bulat	Bulat dan halus	4,5--6,3 μm	Tidak bersepta	5,9--12,6 μm

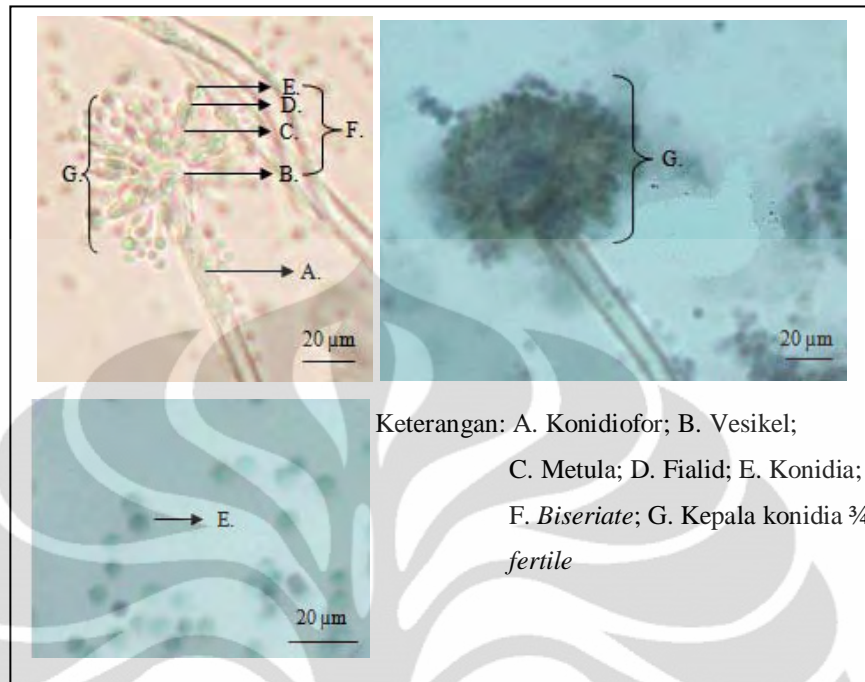
Tabel 4.2.1.2 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik *A. flavus* ES6 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang

No.	Kepala Konidia		Diameter Konidia (μm)	Diameter Hifa (μm)
	Panjang (μm)	Lebar (μm)		
1.	82,4	74,2	10,4	16,8
2.	106,2	105	9,5	15,5
3.	97,6	101,1	10,4	16
4.	85	90	11,5	22
5.	78,1	80,1	12,2	16,3
6.	91,1	94,5	13,1	15,6
7.	121,4	136,9	10,8	20
8.	81,1	87,7	10	17,7
9.	122,4	119,6	9,7	13,1
10.	49,8	45,7	11	14,5
11.	88,5	103,7	10,8	16,3
12.	89,6	103,3	9,5	17,4
13.	59,2	48,7	9,6	19,1
14.	66,3	69,8	10	16,5
15.	131,2	155,9	9,9	19,2
16.	109,3	105,2	9,1	16,1
17.	107,2	101,7	12,2	24,8
18.	114,9	137,2	9,6	18,5
19.	98,6	127,4	10,4	13,7
20.	126,2	123,7	8,6	23,8
Kisaran	49,8--131,2	45,7--155,9	8,6--13,1	13,1--24,8

4.2.2 *Aspergillus sparsus* ES5

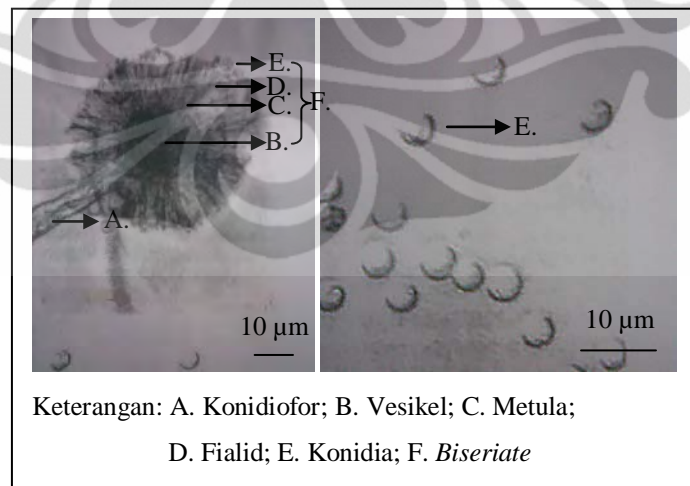
Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik kapang endofit ES5 umur 19 hari dalam medium PDA pada suhu ruang tidak memperlihatkan adanya alat reproduksi seksual namun memperlihatkan adanya alat reproduksi aseksual. Kapang endofit ES5 adalah kapang anamorfik. Kapang endofit ES5 memiliki vesikel, metula, fialid, dan konidia sehingga vesikel adalah tipe *biseriate*. Kapang endofit ES5 memiliki hifa tidak berseptata. Fialid tumbuh mengelilingi sebagian vesikel ($3/4$ *fertile*) dan bentuk kepala konidia adalah radial. Konidia berbentuk bulat. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kapang endofit ES5 adalah *Aspergillus sparsus*. Deskripsi *A. sparsus* ES5 sesuai dengan deskripsi kapang *A. sparsus* pada monograf *Identification of common Aspergillus species* oleh Klich (2002: 92).

Kapang endofit *A. sparsus* ES5 umur 19 hari dalam medium PDA pada suhu ruang memiliki vesikel yang dapat diamati dengan jelas. Vesikel *A. sparsus* ES5 merupakan tipe *biseriate*. Bentuk vesikel adalah bulat. Bentuk kepala konidia adalah radial. Panjang kepala konidia berkisar 42,5--92 μm dan lebar kepala konidia berkisar 40,3--93,5 μm . Konidia berbentuk bulat, bertekstur halus, dengan ukuran diameter berkisar 4,5--6,3 μm . Lebar hifa berkisar 5,9--12,6 μm . Kapang *A. sparsus* ES5 umur 14 hari pada medium PDA di suhu ruang memiliki warna koloni hijau keabu-abuan 172 (standar warna pada Lampiran 2) dan memiliki tekstur seperti beludru. Kapang tersebut telah bersporulasi, memiliki zonasi, *growing zone*, dan *radial furrow*, namun tidak memiliki *exudate drops*. Pengamatan sebalik koloni memperlihatkan koloni hialin dan terdapat zonasi maupun *radial furrow*. Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dan makroskopik *A. sparsus* ES5 dapat dilihat pada Gambar 4.2.2.1, Gambar 4.2.2.3, Tabel 4.2.1.1, dan Tabel 4.2.2.1. Menurut Klich (2002: 92), *A. sparsus* memiliki vesikel tipe *biseriate*, memiliki bentuk kepala konidia radial, bentuk vesikel bulat hingga *elongate*, konidia berbentuk bulat hingga elips, tekstur konidia halus hingga kasar, ukuran konidia berkisar 3--5,5 μm (Gambar 4.2.2.2), warna koloni hijau pucat, tekstur seperti beludru, dan sebalik koloni hialin hingga coklat pucat.



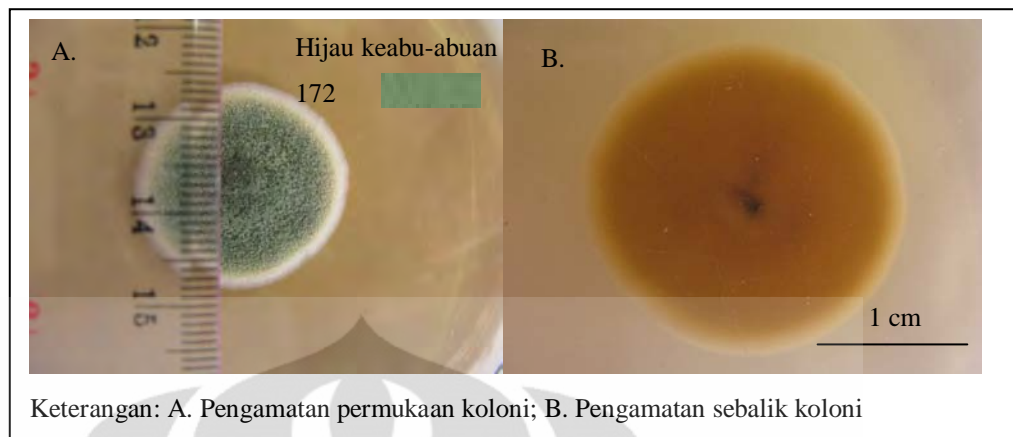
Gambar 4.2.2.1 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik *A. sparsus* ES5 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi]



Gambar 4.2.2.2 *Aspergillus sparsus*

[Sumber: Klich 2002: 93]



Gambar 4.2.2.3 Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik

A. sparsus ES5 umur 14 hari medium PDA pada suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi]

Tabel 4.2.2.1 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik *A. sparsus* ES5 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang

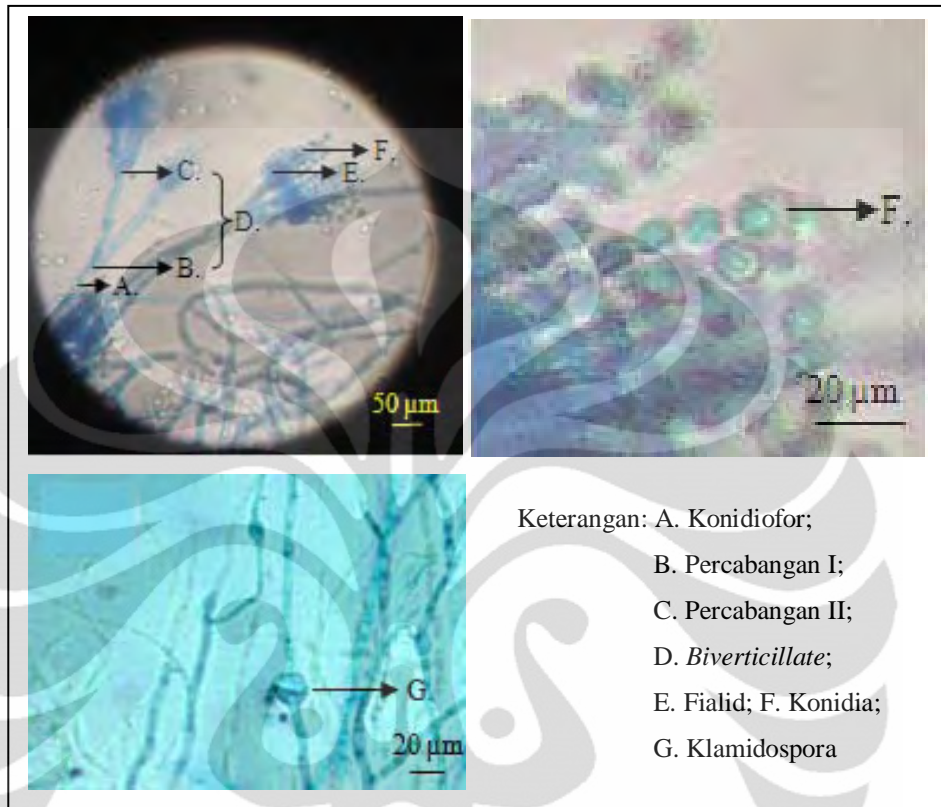
No.	Kepala konidia		Diameter Konidia (μm)	Lebar Hifa (μm)
	Panjang (μm)	Lebar (μm)		
1.	67,7	59,7	5	7,1
2.	64,6	93,5	5,1	7,3
3.	68,3	65,8	4,6	8,1
4.	68,6	60,3	5	7,2
5.	56,9	58	5,4	7,1
6.	50,5	50,5	5,4	7,3
7.	49,2	65	4,6	7,3
8.	43,5	54,4	5,6	8,6
9.	42,5	40,3	4,5	8,7
10.	92	85,4	6,3	10,3
11.	72	73	5	9,3
12.	65,7	58,9	5	5,9
13.	74,4	89,1	5	11
14.	75,9	79,6	5,9	8,5
15.	68,9	72,2	5,5	12,6
16.	67,2	63,4	5	9,7
17.	63,9	65,8	5,1	10,4
18.	65	62,3	5	10,5
19.	55,2	55,3	5	9
20.	44,8	55,3	5,1	9,5
Kisaran	42,5--92	40,3--93,5	4,5--6,3	5,9--12,6

4.2.3 *Penicillium chrysogenum* ES8

Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik kapang endofit ES8 umur 19 hari pada medium PDA di suhu ruang tidak memperlihatkan adanya alat reproduksi seksual, namun memperlihatkan adanya alat reproduksi aseksual yaitu konidia dan klamidospora. Kapang endofit ES8 merupakan kapang anamorfik. Konidia berwarna gelap dan hifa bersepta. Tipe percabangan adalah *biverticillate*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kapang endofit ES8 adalah *Penicillium chrysogenum*. Deskripsi *Penicillium chrysogenum* ES8 sesuai dengan deskripsi *Penicillium chrysogenum* pada monograf *Introduction to food-borne fungi* oleh Samson *dkk.* (1981: 104).

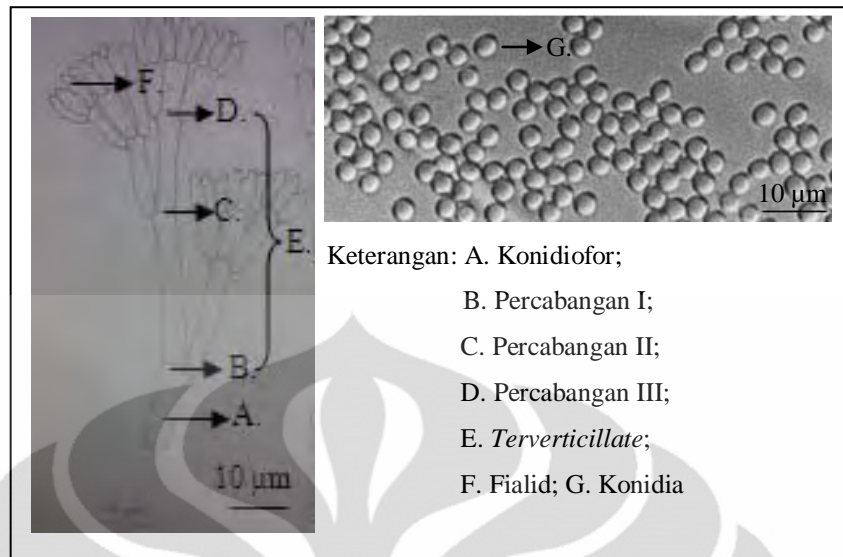
Kapang *Penicillium chrysogenum* ES8 umur 19 hari pada medium PDA di suhu ruang memiliki tipe percabangan *biverticillate*. *Conidiogenous cell* adalah fialid. Konidia berbentuk bulat, bertekstur halus, dan berukuran diameter berkisar 4,2--5,5 μm . Lebar hifa berkisar 4,2--6,7 μm . Kapang *P. chrysogenum* ES8 memiliki klamidospora yang berbentuk semi bulat dan berukuran panjang berkisar antara 8,6--28,9 μm dan lebar 12,3--32,3 μm . Kapang *P. chrysogenum* ES8 umur 14 hari pada medium PDA di suhu ruang telah bersporulasi, warna koloni abu-abu tua atau *warm grey* IV 273 (standar warna pada Lampiran 2) dengan struktur seperti beludru, memiliki zonasi, *growing zone*, dan *radial furrow*, namun tidak memiliki *exudate drops*. Pengamatan sebalik koloni memperlihatkan koloni hialin dan memiliki zonasi dan *radial furrow*. Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dan makroskopik *P. chrysogenum* ES8 dapat dilihat pada Gambar 4.2.3.1, Gambar 4.2.3.3, Tabel 4.2.3.1, dan Tabel 4.2.3.2. Menurut Samson *dkk.* (1981: 104), *P. chrysogenum* memiliki tipe percabangan *biverticillate* hingga *quaterverticillate* (Gambar 4.2.3.2). Konidia dapat berbentuk semi bulat, bulat, dan elips. Konidia bertekstur halus dan berukuran 2,8--4 μm . Koloni bertekstur seperti beludru, tidak memiliki *exudate drops*, dan warna sebalik koloni adalah cokelat kekuningan atau hialin. Larran *dkk.* (2001: 182) melaporkan telah mengisolasi kapang endofit *Penicillium* spp. dari daun *Lycopersicon esculentum* Mill. Devarajan dan Suryanarayanan (2002: 74) melaporkan telah mengisolasi kapang endofit *Penicillium* sp. asal tumbuhan

Halophila ovalis. Abdeel-motaal *dkk.* (2010: 2887) melaporkan telah mengisolasi kapang endofit *P. chrysogenum* dari tumbuhan *Hyoscyamus muticus*.



Gambar 4.2.3.1 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik *P. chrysogenum* ES8 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi]



Gambar 4.2.3.2 *Penicillium chrysogenum*

[Sumber: Samson *dkk.* 1981: 104]



Gambar 4.2.3.3 Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik *P. chrysogenum* ES8 umur 14 hari medium PDA pada suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi]

Tabel 4.2.3.1 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik *P. chrysogenum* ES8 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang

Kapang endofit	Percabangan	Bentuk dan tekstur konidia	Ukuran konidia	Hifa	Ukuran hifa	Karakter lain
<i>P. chrysogenum</i> ES8	<i>Biverticillate</i>	Bulat dan halus	4,2--5,5 μm	Bersepta	4,2--6,7 μm	Klamidospora

Tabel 4.2.3.2 Hasil pengamatan ukuran karakter morfologi secara mikroskopik *P. chrysogenum* ES8 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang

No.	Diameter Hifa (μm)	Diameter Konidia (μm)	Klamidospora	
			Panjang (μm)	Lebar (μm)
1.	4,5	5,3	18,3	20,4
2.	5,3	5	22,6	28,5
3.	4,6	5,1	16,1	19,5
4.	6,3	4,9	16,9	20,4
5.	6,1	4,6	16,4	20
6.	6,5	5,5	12,7	18,6
7.	5,3	4,2	8,6	12,3
8.	6,3	5	9,1	14,6
9.	5,9	5,1	28,9	32,3
10.	5,5	5	18,1	23
11.	5,4	5,4	19	19,7
12.	5,9	4,7	8,5	17,6
13.	6,7	4,4	17,2	19,9
14.	6,9	4,3	11,7	18,6
15.	5,5	5,5	20,1	16,2
16.	6,4	4,3	21,7	25,5
17.	4,2	5	10,2	18,8
18.	6,1	4,6	16,3	17
19.	6,7	5	14	20,8
20.	5,5	5	9,2	13,5
Kisaran	4,2--6,7	4,2--5,5	8,6--28,9	12,3--32,3

4.2.4 *Mycelia sterilia* ES7

Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik kapang endofit ES7 umur 19 hari pada medium PDA di suhu ruang tidak memperlihatkan adanya alat reproduksi seksual maupun aseksual, namun hanya memperlihatkan struktur hifa. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kapang endofit ES7 adalah kapang *Mycelia sterilia*. Deskripsi kapang endofit ES7 sesuai dengan deskripsi kapang endofit *Mycelia sterilia* pada *Illustrated genera of imperfect fungi* oleh Barnett dan Hunter (2003: 34).

Mycelia sterilia ES7 umur 14 hari pada medium PDA di suhu ruang memiliki warna koloni *warm grey* I 270 (standar warna pada Lampiran 2) dengan struktur *wooly*. Kapang tersebut belum bersporulasi, memiliki zonasi, *growing zone*, dan *radial furrow*, namun tidak memiliki *exudate drops*. Pengamatan sebalik koloni memperlihatkan warna koloni coklat 252 (standar warna pada Lampiran 2) dan memiliki zonasi dan *radial furrow*. Diduga *Mycelia sterilia* ES7 merupakan kapang *Dematiaceous* karena memiliki warna coklat pada sebalik koloni. Hasil pengamatan karakter morfologi mikroskopik dan makroskopik *Mycelia sterilia* ES7 dapat dilihat pada Gambar 4.2.4.1 dan Gambar 4.2.4.2. Menurut Koneman dan Roberts (1985: 52), kapang *Dematiaceous* menghasilkan pigmen yang dapat diamati pada pengamatan sebalik koloni. Menurut Sugiyama (1987: 278), *Mycelia sterilia* adalah fungi yang tidak memiliki alat reproduksi seksual dan tidak menghasilkan konidia. Carusso *dkk.* (2000: 7) melaporkan telah mengisolasi fungi endofit *Mycelia sterilia* asal tumbuhan *Taxus*. Devarajan dan Suryanarayanan (2002: 74) melaporkan telah mengisolasi fungi endofit *Mycelia sterilia* asal tumbuhan *Halophila ovalis* (R. Br.) Hook.



Keterangan: A. Hifa

Gambar 4.2.4.1 Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik *Mycelia sterilia* ES7 umur 19 hari medium PDA pada suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi]



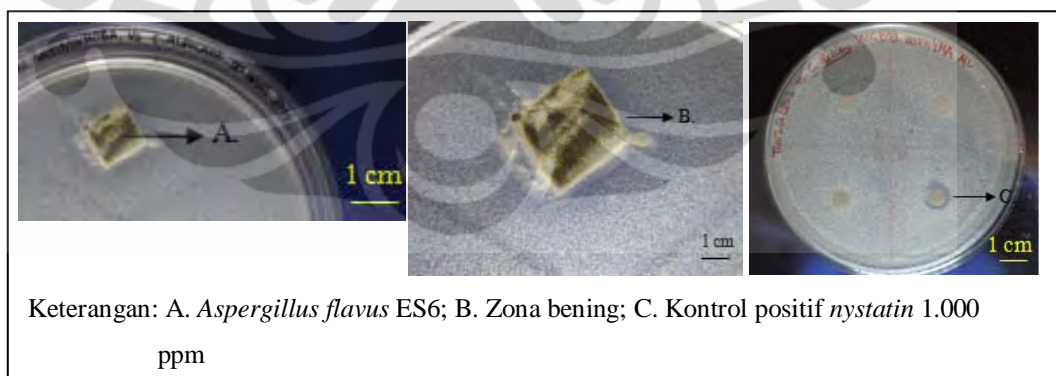
Keterangan: A. Pengamatan permukaan koloni: B. Pengamatan sebalik koloni

Gambar 4.2.4.2 Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik *Mycelia sterilia* ES7 umur 14 hari medium PDA pada suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi]

4.3 PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIMIKROBA KAPANG ENDOFIT

Hasil pengujian aktivitas antimikroba dengan blok agar dapat dilihat pada Gambar 4.3.1, Gambar 4.3.2, dan Tabel 4.3.1. Kapang *A. flavus* ES6 memiliki aktivitas antimikroba terhadap khamir *C. albicans*. Wang *dkk.* (2007: 82) melaporkan *Aspergillus* sp. memiliki aktivitas antimikroba terhadap *C. albicans*. Zona bening yang dihasilkan setara dengan zona bening oleh *nystatin* dengan konsentrasi 1.000 ppm. Diduga mekanisme penghambatan pertumbuhan *C. albicans* oleh *Aspergillus* adalah senyawa antimikroba dari *Aspergillus* menghambat sintesis ergosterol pada membran sel fungi sehingga membran sel tidak dapat mengatur transportasi air, nutrisi, dan sebagainya. Menurut Ghannoum dan Rice (1999: 504), mekanisme penghambatan pertumbuhan fungi oleh senyawa antimikroba yang paling umum adalah penghambatan sintesis ergosterol. Maria *dkk.* (2005: 72) melaporkan bahwa kapang endofit *Aspergillus* sp. dari *Acrostihcum aureum* L. memiliki aktivitas antimikroba terhadap *C. albicans*. Fawzy *dkk.* (2011: 984) melaporkan bahwa kapang *A. flavus* memiliki aktivitas antimikroba terhadap *C. albicans* dengan metode difusi agar cara cakram.

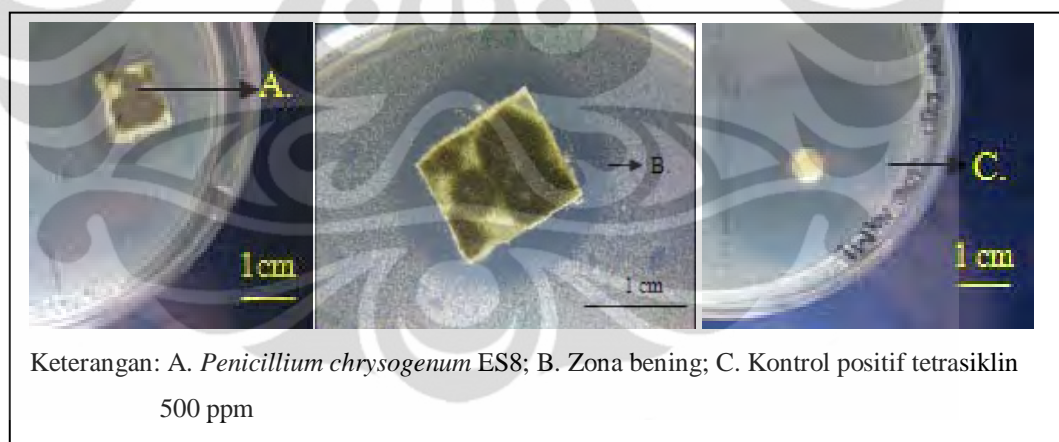


Gambar 4.3.1 Hasil pengamatan uji aktivitas antimikroba *A. flavus* ES6 terhadap *C. albicans* dengan blok agar

[Sumber: Dokumentasi pribadi]

Kapang endofit *P. chrysogenum* ES8 memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram positif *B. subtilis*, dapat dilihat pada gambar 4.3.1. Zona

bening yang dihasilkan setara dengan zona bening oleh tetrasiklin dengan konsentrasi 188,484 ppm. Aktivitas antimikroba kapang endofit *P. chrysogenum* ES8 terhadap *B. subtilis* diduga berasal dari metabolit sekunder *P. chrysogenum* ES8 yang dapat menjadi *inhibitor* enzim transpeptidase pada *B. subtilis*. Menurut Carlile *dkk.* (2001: 517) dan Lengeler *dkk.* (2009: 628) *Penicillium chrysogenum* dapat menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat antimikroba terhadap bakteri Gram positif. Cara kerja metabolit sekunder tersebut adalah mencegah terjadinya ikatan peptida pada pembentukan peptidoglikan (Deacon 2006: 136) dengan mejadi *inhibitor* enzim transpeptidase. Peptidoglikan tersusun atas ikatan-ikatan peptida yang dikatalisis oleh enzim transpeptidase (Hogg 2005: 59). Sel menjadi lemah dan lebih mudah untuk mengalami lisis (Deacon 2006: 136). Menurut Madigan *dkk.* (2000: 70), membran sel bakteri Gram positif terdiri dari 90% peptidoglikan sedangkan membran sel bakteri Gram negatif hanya terdiri dari 10% peptidoglikan. Menurut Hogg (2005: 59), peptidoglikan tersusun atas ikatan-ikatan peptida yang dikatalisis oleh enzim transpeptidase.



Gambar 4.3.2 Hasil pengamatan uji aktivitas antimikroba *P. chrysogenum* ES8 terhadap *B. subtilis* dengan blok agar

[Sumber: Dokumentasi pribadi]

Tabel 4.3.1 Hasil pengujian aktivitas antimikroba kapang endofit dengan blok agar

Kapang endofit	Mikroba uji					
	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633		<i>C. albicans</i> UICC Y-29	
	1	2	1	2	1	2
<i>A. flavus</i> ES6	-	-	-	-	+	+
<i>A. sparsus</i> ES5	-	-	-	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i> ES8	-	-	++	++	-	-
<i>Mycelia sterilia</i> ES7	-	-	-	-	-	-

Keterangan: + = terdapat zona bening dengan diameter 0,1--0,8 cm
 ++ = terdapat zona bening dengan diameter 0,81--1,6 cm
 +++ = terdapat zona bening dengan diameter 1,61--2,4 cm
 ++++ = terdapat zona bening dengan diameter 2,41--3,2 cm
 +++++ = terdapat zona bening dengan diameter 3,21--4 cm
 - = tidak terdapat zona bening
 Kontrol positif *nystatin* 1.000 ppm terhadap *C. albicans* = +
 Kontrol positif tetrasiklin 500 ppm terhadap *B. subtilis* = +++++

Tidak ada isolat kapang yang memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram negatif *E. coli*. Diduga metabolit sekunder kapang endofit tidak dapat menembus lapisan polisakarida pada membran sel bakteri Gram negatif. Menurut Hogg (2005: 61), membran sel bakteri Gram negatif tidak memiliki banyak peptidoglikan, tetapi memiliki banyak lipopolisakarida. Davidson *dkk.* (2005: 293) menyatakan bahwa bakteri Gram negatif memiliki lapisan lipopolisakarida sehingga lebih resisten terhadap senyawa antimikroba daripada bakteri Gram positif. Tayung dan Jha (2010: S79) melaporkan kapang endofit *Penicillium* sp. dan *Aspergillus* sp. tidak memiliki aktivitas antimikroba terhadap *E. coli*, namun memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*.

Potongan medium yang memiliki metabolit sekunder dari kapang diletakkan pada medium uji. Metabolit sekunder berdifusi dari potongan medium ke medium uji. Menurut Kavanagh (2005: 20), difusi terjadi dari daerah dengan konsentrasi senyawa tinggi ke daerah dengan konsentrasi senyawa rendah. Zona

bening yang terdapat di sekitar potongan agar mengindikasikan aktivitas antimikroba metabolit sekunder yang terdapat pada potongan medium terhadap mikroba uji. Menurut Masoko dan Eloff (2006: 1628--1629), zona bening menandakan mikroorganisme uji tidak dapat tumbuh sehingga medium tetap berwarna bening.

Aktivitas antimikroba kapang endofit dapat disebabkan oleh kemampuan metabolit sekunder kapang endofit dapat menghambat pertumbuhan mikroba uji. Kapang endofit yang ditumbuhkan dalam medium PDA selama tujuh hari, telah bersporulasi, dan telah memasuki fase stasioner diasumsikan telah menghasilkan metabolit sekunder. Metabolit sekunder diekskresikan dari sel dan berdifusi ke medium. Menurut Dijksterhuis dan Samson (2007: 121) metabolit sekunder bersifat ekstraseluler. Menurut Carlile *dkk.* (2001: 129--130), kapang yang telah bersporulasi merupakan indikasi bahwa kapang telah memasuki fase stasioner dan dapat menghasilkan metabolit sekunder.

Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *A. flavus* ES6 dan *P. chrysogenum* ES8 diduga berasal dari metabolit primer. Medium PDA untuk kapang endofit mengandung banyak nutrisi, antara lain karbohidrat, protein, lemak, dan asam nukleat. Kapang endofit setelah melakukan metabolisme primer, kemudian melakukan metabolisme sekunder. Diduga kapang melanjutkan metabolisme sekunder karena nutrisi pada medium masih tersedia dalam jumlah yang banyak. Menurut Carlile *dkk.* (2001: 129) metabolit sekunder dapat diproduksi apabila jumlah karbon berlimpah di dalam medium.

Diduga aktivitas antimikroba *A. flavus* ES6 terhadap *C. albicans* termasuk ke dalam aktivitas antimikroba fungistatik, sedangkan aktivitas antimikroba *P. chrysogenum* ES8 terhadap *B. subtilis* termasuk ke dalam aktivitas antimikroba bakterisidal. Aktivitas antimikroba *A. flavus* ES6 bersifat fungistatik karena masih terdapat pertumbuhan *C. albicans* dalam jumlah yang sedikit dibandingkan daerah yang tidak terdapat potongan agar pada medium uji. Aktivitas antimikroba *P. chrysogenum* ES8 bersifat bakterisidal karena tidak ada pertumbuhan *B. subtilis* di sekitar potongan agar. Menurut Hogg (2005: 427) dan Collins *dkk.* (2001: 168 dan 179), fungistatik adalah aktivitas antimikroba yang menghambat

pertumbuhan fungi uji, tetapi tidak dapat membunuh fungi uji sedangkan bakterisidal adalah aktivitas antimikroba yang membunuh 99,9% bakteri uji.

Pada penelitian ini telah diisolasi dan diidentifikasi kapang endofit dari tumbuhan *Broussonetia papyrifera*. *Aspergillus flavus* ES6 dan *P. chrysogenum* ES8 berpotensi untuk menghasilkan senyawa antimikroba.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Isolat ES7 dan ES8 kapang endofit berhasil diisolasi dengan *surface sterilization* dari potongan daun *Broussonetia papyrifera*.
2. Kapang endofit dari tumbuhan *B. papyrifera* telah diidentifikasi secara konvensional sebagai kapang endofit *Aspergillus flavus* ES6, *Aspergillus sparsus* ES5, *Penicillium chrysogenum* ES8, dan *Mycelia sterilia* ES7.
3. Kapang endofit *A. flavus* ES6 memiliki aktivitas antimikroba terhadap *C. albicans* UICC Y-29, kapang endofit *P. chrysogenum* ES8 memiliki aktivitas antimikroba terhadap *B. subtilis* ATCC 6633. Tidak ada kapang endofit yang memiliki aktivitas antimikroba terhadap *E. coli* ATCC 25922 pada pengujian dengan blok agar.

5.2 SARAN

1. Perlu dilakukan identifikasi molekuler kapang endofit untuk memperoleh identitas akurat dari kapang endofit tersebut.
2. Perlu dilakukan fermentasi metabolit sekunder *A. flavus* ES6 dan *P. chrysogenum* ES8 pada medium cair untuk dilanjutkan dengan pengujian aktivitas antimikroba.

DAFTAR REFERENSI

- Agusta, A. 2009. *Biologi dan kimia jamur endofit*. Penerbit ITB, Bandung: vii + 110 hlm.
- ATCC (1). 2011. ATCC: Catalog search. 1 hlm. [http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=25922 &Template=bacteria#Top](http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=25922&Template=bacteria#Top). 29 April 2011: pk. 19.00.
- ATCC (2). 2011. ATCC: Catalog search. 1 hlm. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=6633&Template=bacteria#Top>. 26 April 2011: pk. 17:13.
- Aubertin, C. 2004. Paper mulberry, *Broussonetia papyrifera*, in the Lao peoples's democratic republic: a successful example of forest product domestication. *Forest products, livelihoods and conservation: Case studies of NTFP systems 2*: 227--245.
- Backer, C. A. dan R. C. B. V. D. Brink. 1965. *Flora of java (spermatopytes only) vol. 2 Angiospermae, families 111--160*. The Riksherbarium, Leyden: iv + 641 hlm.
- Barnett, H. L. dan B. B. Hunter. 2003. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4th ed. University of Missouri Press, Columbia: xxii + 218 hlm.
- Barnett, H. L., dan B. B. Hunter. 1955. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3rd ed. Burgess Publishing Company, Minnesota: v + 241 hlm.
- Barrow, G. I. dan R. K. A. Feltham. 1993. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press, Cambridge: xix + 331 hlm.
- Benson, J.H. 2001. *Microbiological applications laboratory manual in general microbiology*. 8th ed. McGraw-Hill Companies, New York: xi + 478 hlm.
- Black, G. J. 1999. *Microbiology: Principles and exploration*. 4th ed. John Wiley and Sons, Inc., Chichester: xxiv + 786 hlm.

- Bossche, H. V. 1997. Mechanisms of antifungal resistance. *Rev. Iberoam. Micol.* **14**: 44--49.
- Brock, T. D. dan M. T. Madigan. 1991. *Biology of microorganisms*. 6th ed. Prentice Hall International, London: 874 hlm.
- Buchanan, R. E. dan N. E. Gibbons. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. The Williams & Wilkins Company, Baltimore: xxvi + 1268 hlm.
- Carlile, M. J., S. C. Watkinson, dan G. W. Gooday. 2001. *The fungi*. Academic Press, London: xix + 588 hlm.
- Collins, C. H, P.M. Lyne, J. M. Grange, dan J.O. Falkinham III 2004. *Microbiological methods*. Arnold, London: vii + 456 hlm.
- Davidson, P. M., J. N. Sofos, dan A. L. Branen. 2005. *Antimicrobial in food*. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton: xiv + 706 hlm.
- de Errasti, A. D., C. C. Carmaran, dan M. Novas. 2009. Diversity and significance of fungal endophytes from living stems of naturalized trees from Argentina. *Fung. Diver.* **41**: 29--40.
- de Siquira, V. M., R. Conti, J. M. de Araújo, dan C. M. Souza-Motta. 2011. *Endophytic fungi from the medicinal plant Lippia sidoides Cham. and their antimicrobial activity*. Springer Science+Business Media, B. V.: 7 hlm.
- Deacon, J. W. 2006. *Fungal biology*. Blackwell publishing, Cornwall: iv + 371 hlm.
- Devarajan, P. T. dan T. S. Suryanarayanan. 2002. Endophytic fungi associated with seagrass *Halophyla ovalis* (Hydrocharitaceae). *Indian J. Mar. Sci.* **31**: 73--74.
- Digital. 2008. Colour chart for Faber Castell polychromos pencils and pastels. <http://www.drawinganddrafting.com.au/category2471.htm>. 23 Juni 2011, pk. 07.55.
- Dijksterhuis, J. dan R. A. Samson. 2007. *Food mycology a multifaceted approach to fungi and food*. Taylor dan Francis Group, LLC; Boca Raton: xiv + 412 hlm.

- Dweck, A. C. 2003. A review of the Paper Mulberry (*Broussonetia papyrifera*) (L.) Hert. ex Vent. 7 hlm. www.rarefruit.org/PDF_files/Broussonetia_papyrifer.pdf. 27 Juli 2010, pk. 15.53.
- Fawzy, G. A., A. M. Al-Taweel, dan N. A. Melake. 2011. *In vitro* antimicrobial and anti-tumor activities of intracellular and extracellular extracts of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* var. *columinaris*. *J. Pharm. Sci. dan Res.* **3**: 980--987.
- Gandjar, I., R. A. Samson, K. van den Tweel-Vermeulen, A. Oetari, I. Santoso. 1999. *Pengenalan kapang tropik umum*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta: xiii + 136 hlm.
- Gandjar, I., W. Sjamsudrizal, dan A. Oetari. 2006. *Mikologi: dasar dan terapan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: xii + 234 hlm.
- Gangadevi, V., S. Sethumeenal, S. Yogeswari dan G. Rani. 2008. Screening endophytic fungi isolated from a medicinal plant, *Acalypha indica* L. for antibacterial activity. *Indian J. Sci. and Tech.* **5**: 1--6.
- Ghannoum, M. A. dan L. B. Rice. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 501--517.
- Griffin, G. J. L. 1994. *Chemistry and technology of biodegradable polymers*. Springer: xiv + 154 hlm.
- Guimarães, D. O., W. S. Borges, C. Y. Kawano, P. H. Ribeiro, G. H. Goldman, A. Nomizo, O. H. Thiemann, G. Oliva, N. P. Lopes, dan M. T. Pupo. 2008. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *Immunol. Med. Microbiol.* **52**: 134--144.
- Guo, L., K. D. Hyde, dan E. C. Y. Liew. 1998. A method to promote sporulation in palm endophytic fungi. *Fungal Div.* **1**:109--113.
- Hanson, J. R. 2008. *The chemistry of fungi*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge: xi + 221 hlm.
- Hardy, S. P. 2002. *Human microbiology*. Routledge: 272 + viii hlm.

- Hogg, S. 2005. *Essential Microbiology*. John Wiley and Sons, Inc., Chichester: xi + 468 hlm.
- Johann, S., V. L. de Oliveira, M. G. Pizzolatti, J. Schripsema, R. Braz-Filho, A. Branco, A. Smânia Jr. 2007. Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **102**: 681--685.
- Jordening, H. dan J. Winter. 2005. *Environmental biotechnology: concepts and applications*. Wiley, VCH: xxiv + 463 hlm.
- Kaiser, G. E. 2004. *Escherichia coli*. 1 hlm. <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/bacpath/gnrod.html>. 01 Maret 2011: pk. 12.16.
- Kavanagh, K. 2005. *Fungi, biology and applications*. John Wiley and Sons Ltd., West Sussex: xi + 267 hlm.
- Kehati. 2010. Detil data *Broussonetia papyrifera* Vent. 1 hlm. <http://fauzisofyan.blogspot.com/2009/04/potensi-kapang-endo fit.html>. 11 Agustus 2010, pk 14.45.
- Khan, R., S. Shahzad, M. I. Choudary, S. A. Khan, dan A. Ahmad. 2007. Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (Ait.) R. BR. *Pak. J. Bot.* **39**: 2233--2239.
- Kinghorn, A. D., J. M. Pezzuto, D. Lee, dan K. P. L. Bhat. 2004. Aromatase inhibitor from *Broussonetia papyrifera*. *Unit. Stat. Pat.* US 6737439 B2: 19 hlm.
- Klich, A. M. 2002. *Identification of common Aspergillus species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht: vi + 116 hlm.
- Kurtzman, C. P. dan J. W. Fell. 1998. *The yeast, a taxonomic study*. El Sevier Science B. V., Amsterdam: xvii + 1055 hlm.
- Larran, S., C. Monaco, dan H. E. Alippi. 2001. Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. *World. J. Microbiol. dan Biotechnol.* **17**: 181--184.
- Lengeler, J. W., G. Drews, dan H. G. Schlegel. 1999. *Biology of prokaryotes*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart: xxvii + 955 hlm.

- Mackean, D. G., dan I. Mackean. 2011. Fungi: *Rhizopus*, sexual reproduction 3. 1 hlm. <http://www.biology-resources.com/drawing-fungi-05-rhizopus-3.html>. 01 Juli 2011: pk. 16.34.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, dan J. Parker. 2000. *Brock biology microorganisms*. 9th ed. Prentice Hall International, New Jersey: xix + 991 hlm.
- Mann, J. 1995. *Secondary metabolism*. Oxford University Press: New York: xv + 374 hlm.
- Maria, G.L., K. R. Sridhar, dan N. S. Raviraja. 2005. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *J. Agricul. Technol.* **1**: 67--80.
- Masoko, P. dan J. N. Eloff. 2006. Bioautography indicates the multiplicity of antifungal compounds from twenty-four southern African *Combretum* species (Combretaceae). *Afr. J. Biotechnol.* **5**: 1625--1647.
- Mayer, G. 2010. Bacteriology – Chapter six antibiotic – protein synthesis, nucleic acid synthesis, and metabolism. 1 hlm. <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/antibiot.htm>. 4 Juni 2011: pk. 18.32.
- Mitchell, R. dan J. D. Gu. 2010. *Environmental microbiology*. 2nd Ed. John Wiley dan Sons, Inc.: New Jersey: ix + 376 hlm.
- Mueller, G. M., G. F. Bills dan M. S. Foster. 2004. *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press Inc., Amsterdam: xviii + 777 hlm.
- Osborne, L. 2008. Rhizoctonia brown patch of turf. 1 hlm. <http://nu-distance.unl.edu/homer/disease/Hort/Turf/Tubrnpt.html>. 6 Juni 2011, pk. 20:57
- Permadi, T. 2005. *Konservasi tradisi pembuatan daluang sebagai salah satu upaya penyelamatan teknologi tradisional nusantara*. Fakultas Pendidikan Bahasa dan Seni, Universitas Pendidikan Indonesia: 19 hlm.

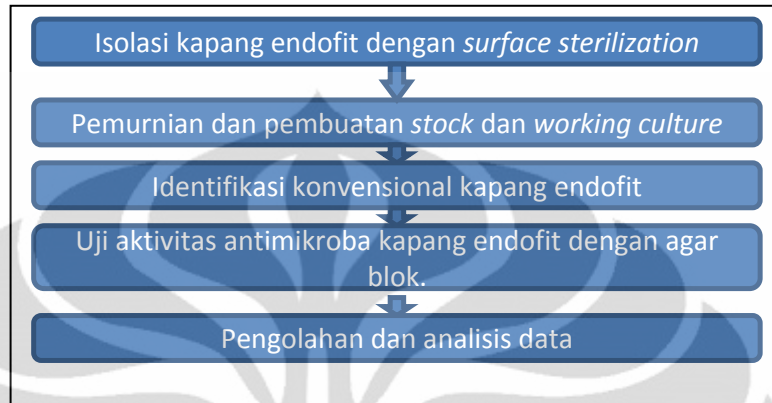
- Photita, W., S. Lumyong, P. Lumyong, E. H. C. McKenzie, dan K. D. Hyde. 2004. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fungal Diversity*. **16**: 131--140.
- Pitt, J. I. dan A. D. Hocking. 2009. *Fungi and food spoilage*. Springer Science+Business Media, New York: xv + 519 hlm.
- Playfair, J. 2004. *Living with germs*. Oxford University Press, New York: 283 hlm.
- Pointing, S. B. dan K. D. Hyde. 2001. *Bioexploitation of filamentous fungi*. Fungal Diversity Press, Hong Kong: ix + 467 hlm.
- Reddy, P. V., C. K. Lam, dan F. C. Belanger. 1996. Mutualistic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity. *Plant Physiol.* **111**: 1209--1218.
- Rutgers. 2011. *Bacillus subtilis*. 1 hlm. <http://www.rci.rutgers.edu/~microlab/CLASSINFO/IMAGESCI/B.%20subtilis%20and%20E.htm>. 01 Maret 2011: pk. 12.27.
- Samson, R. A. dan E. S. Hoekstra. 2004. *Introduction to food and airborne-fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht: vi + 589 hlm.
- Samson, R. A., E. S. Hoekstra, dan C. A. N. Van Oorschot. 1981. *Introduction to food-borne fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht: ii + 247 hlm.
- Simarmata, R., S. Lekalompessy, dan H. Sukiman. 2007. Isolasi mikroba endofitik dari tanaman obat sambung nyawa *Gynura procumbens* dan analisis potensinya sebagai antimikroba. *Berk. Penelitian. Hayati* **13**: 85--90.
- Stierle, A., G. Strobel, dan D. Stierle. 1993. Taxola and taxane production by *Taxomyces andreane*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science* **260**: 214--216.
- Strobel, G. A. 2002. Microbial gifts from rain forests. *Can. J. Plant Pathol.* **24**: 14--20.
- Strobel, G. dan B. Daisy. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 491--502.

- Sugiyama, J. 1987. *Pleomorphic fungi: The diversity and its taxonomic implications*. Kodansha Ltd., Tokyo: xv + 325 hlm.
- Tan, R. X. dan W. X. Zou. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **18**: 448--459
- Tayung, K. dan D. K. Jha. 2010. Antimicrobial endophytic fungal assemblages inhabiting bark of *Taxus baccata* L. of Indo-Burma mega biodiversity hotspot. *Indian. J. Microbiol.* **50**: S74--S81.
- Tortora, G. J., B. R. Funke, C. L. Case. 2001. *Microbiology an introduction*. Addison Wesley Longman, Inc., New York: xxiv + 887 hlm.
- Uchida, J. Y. 2006. *Rhizoctonia solani*. 1 hlm. http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/r_solani.htm. 19 Juni 2011: pk. 22.51.
- University of Sydney. 2004. Endophytes. 1 hlm. http://bugs.bio.usyd.edu.au/learning/resources/Mycology/Plant_Interactions/Endophytes/inGeneral.shtml#topPage. 7 Januari 2011: pk. 2.01.
- Vaclavik, V. A. & E. W. Christian. 2007. *Essentials of Food Science*. Springer Science + Business Media, New York: xvii + 571 hlm.
- Vaclavik, V. A. dan E. W. Christian. 2007. *Essentials of food science*. Springer Science + Business Media, New York: xvii + 571 hlm.
- Valera, M. C., K. C. G. da Silva, L. E. Maekawa, C. A. T. Carvalho, C. Y. Koga-Ito, C. H. R. Camargo, dan R. S. e Lima. 2009. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J. Appl. Oral. Sci.* **17**: 555--559.
- Wang, F. W., R. H. Jiao, A. B. Cheng, S. H. Tan, dan Y. C. Song. 2007. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World J. Microbiol. Technol.* **23**: 79--83.
- Watanabe, T. 2002. *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*. 2nd ed. CRC Press LLC, Florida: xviii + 486 hlm.

- Webster, J. dan R. W. S. Weber. 2007. *Introduction to fungi*. Cambridge University Press, New York: xx + 841 hlm.
- Vega, F. E., F. Posada, M. C. Aime, M. Pava-Ripoll., F. Infante, dan S. A. Rehner. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biol. Cont.* **46**: 72---82.
- Whistler, W. A. dan C. R. Elevation. 2006. *Broussonetia papyrifera (paper mulberry)*. Permanent Agriculture Resources, Hawaii: 13 hlm.
- Villa, G. T. dan P. V. Crespo. 2010. *Enzybiotics antibiotic enzymes as drugs and therapeutic*. John Wiley dan Sons Inc., New Jersey: x + 284 hlm.
- Wilson, M. 2005. *Microbial Inhabitants of Humans Their ecology and role in health and disease*. Cambridge University Press, Cambridge: xix + 455 hlm.
- Volk, W. A. dan M. F. Wheeler. 1990. *Mikrobiologi dasar*. Diterjemahkan oleh Markham, *Basic microbiology*. 5th ed. 1984. Penerbit Erlangga: xii + 341 hlm.
- Young, T. dan K. Smith. 2005. *A field guide to the fungi of Australia*. UNSW press. 240 + xvi hlm.
- Zhang, Y., J. Mu, Y. Feng, Y. Kang, J. Zhang, P. Gu, Y. Wang, L. Ma, dan Y. Zhu. 2009. Broad-spectrum antimicrobial epiphytic and endophytic fungi from marine organisms: isolation, bioassay, and taxonomy. *Mar. Drugs* **7**: 97--112.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Skema kerja



Lampiran 2 Standar warna Faber Castell

[Sumber: Digital 2008: 1]

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