



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH KONSENTRASI SUKROSA TERHADAP
AKTIVITAS ANTI-*Candida albicans* DARI *Aspergillus flavus*
UICC 360**

SKRIPSI

**ADISTY PARAMITHA
0706263630**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH KONSENTRASI SUKROSA TERHADAP
AKTIVITAS ANTI-*Candida albicans* DARI *Aspergillus flavus*
UICC 360**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**ADISTY PARAMITHA
0706263630**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
JANUARI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Adisty Paramitha

NPM : 0706263630

Tanda Tangan : 

Tanggal : 12 Januari 2012



HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Adisty Paramitha
NPM : 0706263630
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul Skripsi : Pengaruh Konsentrasi Sukrosa terhadap Aktivitas
Anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus*
UICC 360

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 : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. (.....)
Penguji I : Ariyanti Oetari, Ph.D. (.....)
Penguji II : Dra. Setiorini, M.Kes. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 12 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, anugrah, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Skripsi ini tidak akan terselesaikan, tanpa bantuan dan dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. selaku Pembimbing atas bimbingan, motivasi, doa, serta sumbangan pikiran kepada penulis selama penelitian hingga penulisan skripsi.
2. Ibu Ariyanti Oetari, Ph.D. dan Ibu Dra. Setiorini, M.Kes. selaku Penguji I dan Penguji II yang telah memberikan sumbangan pikiran, saran dan masukan kepada penulis.
3. Ibu Retno Lestari, M.Si. selaku Penasihat Akademik atas bimbingan, motivasi, perhatian, nasehat, dan doa selama penulis berkuliah.
4. Dr. rer. nat. Mufti Petala Patria, M.Sc., dan Dra. Nining Betawati Prihatini, M.Sc. selaku Ketua dan Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI serta Dra. Titi Soedjiarti, S.U selaku Koordinator Pendidikan.
5. Bapak Dr. rer. nat. Yasman M.Sc. atas bantuan dan saran yang diberikan kepada penulis serta seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI atas bekal ilmu pengetahuan yang diberikan selama perkuliahan.
6. Bapak Ahmad Supriyadi, Mbak Asri, Pak Taryana, Pak Taryono, Bu Rus, dan seluruh staf karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas semua bantuan yang diberikan.
7. Keluarga tercinta, Bapak (Dedi Tarnadi) dan Mama (Titin Sri Yustini) atas doa, kasih sayang, nasehat, motivasi, pengertian, pengorbanan, dukungan moril dan materil serta segala yang telah diberikan kepada penulis. Adik tersayang (Puspita Maharani, Dimas Kurnia Ayatullah, dan Denis Khalifah Qamarullah) serta Aki dan Nenek (Alm. Yusuf Pulung dan Mariana Yusuf Pulung) atas doa, dukungan dan semangat kepada penulis.

8. Sahabatku (Widi, Alm.Catur, Nita, Ijul, Dita, Santi, Nana, Aul, Sela, Masyita, Eva, Indah, Param, Ira, Rizka, Naya, Dwi, Uvi) atas dukungan, persahabatan yang indah dan semangat yang diberikan kepada penulis.
9. Penghuni Kost Rambutan (Siti, Yayah, Dela, Novita, Tika, Sovie, Ka Icha, Ka Nurma) yang telah menjadi tempat berkeluh kesah penulis.
10. Teman seperjuangan, Desi dan teman-teman di Laboratorium Mikrobiologi, Niar, Eja, Diana, Bregas, CANON, CITRUS, DEMON, DIVAS yang selalu bersama dalam suka dan duka selama masa penelitian hingga penulisan skripsi ini.
11. Teman-teman BLOSSOM yang tidak dapat disebutkan satu persatu.
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah banyak memberikan bantuan selama penulis menyelesaikan skripsi.

Pada akhirnya, penulis meminta maaf yang sebesar-besarnya atas segala kesalahan, baik sengaja ataupun tidak yang telah dilakukan. Semoga skripsi yang telah dibuat ini dapat bermanfaat bagi setiap orang yang membacanya.

Depok, 12 Januari 2012

Penulis

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

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

Nama : Adisty Paramitha
NPM : 0706263630
Program Studi : S1
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

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

Pengaruh Konsentrasi Sukrosa terhadap Aktivitas Anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 12 Januari 2012

Yang menyatakan



(Adisty Paramitha)

ABSTRAK

Nama : Adisty Paramitha
Program Studi : Biologi
Judul : Pengaruh Konsentrasi Sukrosa terhadap Aktivitas Anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi sukrosa terhadap aktivitas anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360. Sebanyak $(1,33--2,58) \times 10^7$ CFU/ml inokulum berisi hifa dan konidia *Aspergillus flavus* UICC 360 dengan 1,96% (v/v), diinokulasikan ke dalam medium *Czapek's Dox Broth* dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda. Proses fermentasi dilakukan selama 7 hari pada suhu 27--30 °C. Konsentrasi sukrosa yang digunakan adalah 0 mM, 58,5 mM, 73 mM, 87,7 mM, 102,3 mM, dan 116,9 mM. Pengujian aktivitas anti-*Candida albicans* dilakukan dengan metode *Paper Disk Assay*. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan aktivitas dari masing-masing ekstrak dalam etil asetat. Ekstrak E4 (sukrosa 102,3 mM) dalam etil asetat menunjukkan aktivitas anti-*Candida albicans* tertinggi, sedangkan ekstrak kontrol (sukrosa 0 mM) dalam etil asetat tidak menunjukkan aktivitas anti-*Candida albicans*. Ekstrak E4 menghasilkan diameter zona hambat terbesar, yaitu 8,33 mm, setara dengan aktivitas antibiotik nystatin pada konsentrasi 1.515,2 ppm.

Kata kunci:

Anti-*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, etil asetat, konsentrasi sukrosa.

xii + 67 hlm : 18 gambar; 9 tabel; 11 lampiran

Daftar Acuan : 75 (1958--2012)

ABSTRACT

Name : Adisty Paramitha
Study program : Biology
Title : Sucrose concentration effect on anti-*Candida albicans*
activity of *Aspergillus flavus* UICC 360

The research aims to determine sucrose concentration effect on anti-*Candida albicans* activity of *Aspergillus flavus* UICC 360. $(1.33\text{--}2.58) \times 10^7$ CFU/ml inoculum containing hyphae and conidia of *Aspergillus flavus* UICC 360 1.96% (v / v) was inoculated into the Czapek's Dox Broth medium with different concentrations of sucrose. The fermentation process was carried out for 7 days at 27--30 °C. Sucrose concentrations were 0 mM, 58.5 mM, 73 mM, 87.7 mM, 102.3 mM and 116.9 mM. Test for anti-*Candida albicans* activity was performed by Paper Disk Assay method. The results showed that there were differences in the activity of each extract in ethyl acetate. Extracts E4 (sucrose 102.3 mM) in ethyl acetate showed the highest anti-*Candida albicans* activity, whereas extracts of control (sucrose 0 mM) in ethyl acetate showed no anti-*Candida albicans* activity. E4 extracts produced the largest zone of inhibition diameter, which was 8.33 mm, equivalent to the activity of antibiotics nystatin at 1515.2 ppm.

Keywords:

Anti-*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, ethyl acetate, sucrose concentration.

xii + 67 pages : 18 pictures, 9 tables, 11 appendixs

Bibliography : 75 (1958--2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Fungi	4
2.1.1. <i>Aspergillus flavus</i>	8
2.1.2. <i>Candida albicans</i>	9
2.2. Metabolit Sekunder	11
2.3. Sumber Karbon	12
2.4. Fermentasi	13
2.5. Senyawa Antifungi	15
2.6. Ekstraksi Senyawa Antifungi	16
2.7. Analisis Antifungi	17
3. METODOLOGI PENELITIAN	19
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian	19
3.2. Alat dan Bahan	19
3.2.1. Alat	19
3.2.2. Bahan	20
3.2.2.1. Mikroorganisme	20
3.2.2.2. Medium	20
3.2.2.3. Bahan Kimia	20
3.2.2.4. Bahan Habis Pakai	20
3.3. Cara Kerja	21
3.3.1. Pembuatan Medium	21
3.3.1.1. <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA)	21
3.3.1.2. <i>Yeast Malt Agar</i> (YMA)	21
3.3.1.3. <i>Czapeks Dox Broth</i> (CDB)	21
3.3.2. Pembuatan <i>Stock Culture</i> dan <i>Working Culture Aspergillus flavus</i> UICC 360 dan <i>Candida albicans</i> Y-29	22
3.3.3. Pengamatan Biakan <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 dan <i>Candida albicans</i> Y-29	22

3.3.4. Enumerasi Spora Kapang dan Sel Khamir	23
3.3.5. Fermentasi Senyawa Anti- <i>Candida albicans</i> dari <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360	24
3.3.6. Ekstraksi Senyawa Anti- <i>Candida albicans</i>	25
3.3.7. Penimbangan Biomassa Kering Miselium	25
3.3.8. Pengujian Aktivitas Anti- <i>Candida albicans</i> dari Ekstrak Kapang dengan <i>Paper Disk Assay Method</i>	25
3.3.9. Pengolahan dan Analisis Data	26
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1. Pengamatan Morfologi Kapang	27
4.2. Pengamatan Morfologi Khamir	30
4.3. Enumerasi Hifa dan Konidia Kapang	33
4.4. Enumerasi Sel Khamir	35
4.5. Fermentasi Senyawa Anti- <i>Candida albicans</i> dari <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360	36
4.5.1. Warna Medium Setelah Fermentasi	36
4.5.2. pH Medium Setelah Fermentasi	38
4.6. Penimbangan Biomassa Kering Miselium.....	40
4.7. Ekstraksi	42
4.8. Pengujian Aktivitas Anti- <i>Candida albicans</i> dari Ekstrak Kapang dengan <i>Paper Disk Assay Method</i>	42
5. KESIMPULAN DAN SARAN	50
5.1. Kesimpulan	50
5.2. Saran	50
DAFTAR REFERENSI	51

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.	Hasil pengamatan makroskopik dan mikroskopik <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang	28
Tabel 4.2.	Hasil pengamatan makroskopik dan mikroskopik <i>Candida albicans</i> UICC Y-29 umur 2 hari pada medium YMA di suhu ruang	32
Tabel 4.3.	Hasil enumerasi hifa dan konidia <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 pada medium PDA dalam suhu ruang	34
Tabel 4.4.	Hasil enumerasi sel khamir <i>Candida albicans</i> UICC Y-29 pada medium YMA dalam suhu ruang	36
Tabel 4.5.1.	Hasil pengamatan warna medium serta warna miselium dan jumlah miselium setelah fermentasi selama 7 hari	37
Tabel 4.5.2.	Data pengukuran pH medium	39
Tabel 4.6.	Hasil penimbangan biomassa kering miselium <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360	40
Tabel 4.8.(1)	Hasil pengujian aktivitas antifungi ekstrak kapang <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 dengan <i>Paper Disk Assay Method</i> terhadap <i>Candida albicans</i> UICC Y-29, inkubasi selama 48 jam di suhu ruang	44
Tabel 4.8.(2)	Konsentrasi ekstrak <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 yang disetarakan dengan konsentrasi antifungi nystatin berdasarkan perbandingan zona hambat	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.(1).	Hifa monositik dan senositik	5
Gambar 2.1.(2).	<i>Budding</i> pada <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Gambar 2.1.(3).	Struktur morfologi konidia pada <i>Ascomycota</i>	8
Gambar 2.1.1.	Penampakan morfologi <i>Aspergillus flavus</i> pada medium <i>Czapek's Dox Agar</i>	9
Gambar 2.1.2.(1).	<i>Candida albicans</i> pada medium <i>glucose-yeast extract-peptone broth</i>	10
Gambar 2.1.2.(2).	Sel <i>Candida albicans</i> yang menghasilkan hifa	10
Gambar 4.1.(1).	<i>Stock culture Aspergillus flavus</i> UICC 360 dengan umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang....	29
Gambar 4.1.(2).	Hasil pengamatan makroskopik <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang	29
Gambar 4.1.(3).	Hasil pengamatan mikroskopik <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 umur 7 hari pada medium PDA dalam suhu ruang ...	30
Gambar 4.2.(1).	<i>Stock culture Candida albicans</i> UICC Y-29 pada Medium YMA umur 7 hari di suhu ruang	32
Gambar 4.2.(2).	Morfologi secara makroskopik <i>Candida albicans</i> UICC Y-29 umur 7 hari pada medium YMA di suhu ruang	33
Gambar 4.2.(3).	Morfologi sel khamir <i>Candida albicans</i> UICC Y-29 Umur 7 hari pada medium YMA di suhu ruang	33
Gambar 4.5.1.	Warna medium setelah fermentasi	38
Gambar 4.6.(1).	Biomassa miselium hasil fermentasi	41
Gambar 4.6.(2).	Histogram penimbangan biomassa kering miselium	41
Gambar 4.7.	Ekstrak murni hasil evaporasi	42
Gambar 4.8.(1).	Hasil pengujian aktivitas anti- <i>Candida albicans</i> dari ekstrak kapang <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 dengan berbagai konsentrasi sukrosa pada medium fermentasi, inkubasi 48 jam di suhu ruang	45
Gambar 4.8.(2).	Histogram diameter zona hambat yang dihasilkan dari ekstrak kapang <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 Dibandingkan dengan nystatin	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Skema Kerja Penelitian	58
Lampiran 2.	Panduan Warna Castell-Polychromos No.9216	59
Lampiran 3.	Enumerasi Hifa dan Konidia Kapang	60
Lampiran 4.	Enumerasi Sel Khamir	61
Lampiran 5.	Fermentasi Senyawa Anti- <i>Candida albicans</i> dari <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360	62
Lampiran 6.	Ekstraksi Senyawa Anti- <i>Candida albicans</i>	63
Lampiran 7.	Penimbangan Biomassa Kering	63
Lampiran 8.	<i>Bioassay</i> ekstrak senyawa anti- <i>Candida albicans</i> menggunakan metode <i>Paper Disk Assay</i>	64
Lampiran 9.	Uji Shapiro & Wilk terhadap data diameter zona hambat dari ekstrak kapang <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 terhadap <i>Candida albicans</i> UICC Y-29	65
Lampiran 10.	Uji homogenitas Levene terhadap data diameter zona hambat dari ekstrak kapang <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 terhadap <i>Candida albicans</i> UICC Y-29	66
Lampiran 11.	Uji Anova terhadap data diameter zona hambat dari ekstrak kapang <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 terhadap <i>Candida albicans</i> UICC Y-29	67

BAB 1 PENDAHULUAN

Infeksi fungi merupakan masalah kesehatan yang dihadapi di seluruh dunia dan terus mengalami peningkatan, terutama di negara-negara berkembang (Chen *dkk.* 2001: 177). *Candida albicans* merupakan salah satu contoh fungi patogen yang paling banyak menimbulkan infeksi pada manusia, terdapat pada permukaan kulit dan bersifat komensal pada saluran gastrointestinal, saluran pernapasan, serta vagina (Deacon 2006: 30; Kuleta *dkk.* 2009: 212). Tingginya kasus infeksi fungi terutama yang disebabkan oleh spesies *Candida albicans* dan berkembangnya resistensi dari *Candida albicans* terhadap obat-obatan, menyebabkan pencarian senyawa metabolit fungi yang berpotensi antifungi masih terus dilakukan (Cannon *dkk.* 2009: 295). Pencarian senyawa antifungi dilakukan dengan pengujian agen antifungi terhadap mikroorganisme penyebab infeksi. *Candida albicans* seringkali digunakan dalam pengujian agen antifungi, di antaranya pengujian aktivitas antifungi kapang endofit dari *Broussonetia papyrifera* Vent. (Listiandiani 2011: 51) dan pengujian aktivitas anti-*Candida albicans* dari isolat-isolat kapang *Aspergillus terreus* koleksi UICC oleh Sukmawati (2002: 10). Hashimoto (2001) melaporkan bahwa jumlah penemuan senyawa-senyawa bioaktif baru yang diproduksi fungi secara umum semakin bertambah (*lihat Gandjar dkk.* 2006: 5--6).

Senyawa anti-*Candida albicans* banyak dihasilkan oleh fungi, terutama oleh genus *Aspergillus* dan merupakan suatu metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan dan industri (Calvo *dkk.* 2002: 447). Metabolit sekunder berupa lovastatin dihasilkan oleh *Aspergillus terreus* yang berfungsi dalam proses penghambatan sintesis kolesterol dan diketahui bersifat antifungi (Kumar *dkk.* 2000: 100; Hajjaj *dkk.* 2001: 2596). *Aspergillus gorakhpurensis* MTCC 547 menghasilkan metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antifungi, diketahui menghambat pertumbuhan beberapa fungi seperti *Candida albicans* dan *Saccharomyces cerevisiae* (Busi *dkk.* 2009: 163).

Potensi yang dimiliki 40 strain *Aspergillus* koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC) dalam menghasilkan suatu metabolit sekunder yang bersifat anti-*Candida albicans* diteliti oleh Rafliyanti (2010: 32). Penelitian yang

dilakukan menunjukkan bahwa dari 40 strain *Aspergillus* yang diuji, 12 strain berpotensi menghasilkan senyawa anti-*Candida albicans*. Sepuluh strain *Aspergillus* potensial terpilih pada penelitian tersebut, yaitu *Aspergillus awamori* UICC 31, *Aspergillus flavus* UICC 359, *Aspergillus flavus* UICC 360, *Aspergillus* sp. Awy V.1, *Aspergillus* sp. Shi 2.2, *Aspergillus* sp. Shi 3.2, *Aspergillus* sp. Shi 18.1, *Aspergillus* sp. UICC 317, *Aspergillus terreus*, dan *Aspergillus terreus* UICC 370 ditumbuhkan dalam medium *Czapek's Dox Broth* (CDB). Hasil penelitian tersebut memberikan kesimpulan bahwa *Aspergillus flavus* UICC 360 memiliki kemampuan tertinggi dalam menghasilkan senyawa anti-*Candida albicans* berupa lovastatin.

Senyawa metabolit sekunder dihasilkan fungi melalui proses fermentasi padat maupun cair. Fermentasi dapat berlangsung dalam lingkungan aerob atau anaerob, tergantung dari sifat mikroorganismenya (Gandjar dkk. 1992: 62). Lovastatin dalam bentuk β -hidroksi merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan *Aspergillus flavus* UICC 360 melalui proses fermentasi menggunakan medium cair (Rafliyanti 2010: 4, 12). Fermentasi pada medium cair dilakukan untuk mengoptimalkan kontak antara kapang dengan medium karena seluruh bagian kapang berada di dalam medium sehingga lebih banyak penyerapan nutrisi yang dilakukan oleh kapang. Penyerapan nutrisi yang optimal memungkinkan lebih banyak metabolit sekunder yang dikeluarkan secara ekstraseluler. *Czapek's Dox Broth* (CDB) merupakan medium basal yang sering digunakan dalam proses fermentasi. Atalla dkk. (2008: 7) menggunakan medium CDB untuk fermentasi mevinoлин dari strain *Aspergillus terreus*. Aryantha (2004: 16) menggunakan medium CDB untuk fermentasi lovastatin dari *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp.

Nutrien utama pada medium fermentasi, seperti sumber karbon dan sumber nitrogen memiliki peran penting dalam produktivitas, terutama biomassa sel dan metabolisme sel. Konsentrasi sumber karbon secara alami mengatur produksi metabolit sekunder melalui proses represi katabolik (Griffin 1981: 97; Gupta dkk. 2003: 1603). Sukrosa merupakan sumber karbon yang banyak dimanfaatkan dalam produksi metabolit sekunder. Pemilihan sukrosa sebagai sumber karbon disebabkan lebih ekonomis, namun tetap dapat memenuhi

kebutuhan mikroorganismenya. Produksi antifungi memberikan hasil yang maksimal ketika sumber karbon yang digunakan berupa sukrosa, dibandingkan dengan glukosa (Demain 1986: 220). Sukrosa akan diubah terlebih dahulu menjadi monomer glukosa dan fruktosa oleh enzim ekstraselular invertase (sukrase) sebelum digunakan oleh fungi (Bilgrami & Verma 1981: 31). Penelitian Busairi (2010: 32) menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi sukrosa yang terdapat dalam medium menyebabkan penurunan hasil fermentasi dari bakteri asam laktat. Hal yang berbeda ditunjukkan pada penelitian Kiel *dkk.* (1981: 3), konsentrasi sukrosa menyebabkan peningkatan fermentasi asam sitrat oleh *Aspergillus niger*.

Pengaruh konsentrasi sukrosa terhadap aktivitas anti-*Candida albicans* oleh *Aspergillus flavus* UICC 360 belum diketahui. Oleh karena itu, pengaruh konsentrasi sukrosa terhadap aktivitas anti-*Candida albicans* yang dihasilkan oleh *Aspergillus flavus* UICC 360 melalui fermentasi cair menggunakan medium CDB perlu diteliti. Modifikasi medium fermentasi untuk mendapatkan senyawa anti-*Candida albicans* yang diharapkan perlu dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian variasi sukrosa dengan konsentrasi 0 mM, 58,5 mM, 73 mM, 87,7 mM, 102,3 mM, dan 116,9 mM terhadap aktivitas anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 dan mengetahui konsentrasi optimal sukrosa yang memberikan pengaruh terbesar terhadap aktivitas anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360. Hipotesis dari penelitian adalah pemberian variasi konsentrasi sukrosa terhadap medium fermentasi memberikan pengaruh terhadap aktivitas anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 dan konsentrasi sukrosa 87,7 mM memberikan pengaruh terbesar terhadap aktivitas anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Fungi

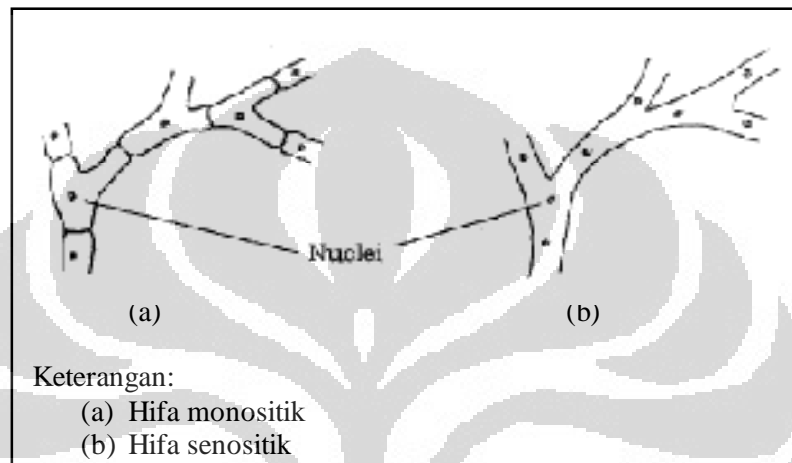
Fungi merupakan organisme eukariotik yang memiliki membran inti, tidak memiliki klorofil, memiliki dinding sel yang tersusun atas kitin, bersifat heterotrof, serta bereproduksi secara seksual (spora) ataupun aseksual (miselium) (Maier *dkk.* 2000: 19, 31). Sebagian besar fungi tumbuh baik pada pH 5,6 dan suhu 18--25 °C. Fungi mengekskresikan enzim-enzim ekstraselular ke lingkungan untuk memecah nutrisi pada substrat sehingga nutrisi tersebut dapat diserap fungi melalui dinding selnya (Gandjar *dkk.* 2006: 3; Hanson 2008: 20; Solomon *dkk.* 2008: 556).

Fungi merupakan kelompok organisme yang terdapat di daerah tropik, subtropik, kutub utara, maupun Antartika. Fungi juga dapat ditemukan di darat (terrestrial), perairan tawar, laut, mangrove, dan di bawah permukaan tanah (Hyde & Alias 2000: 393). Fungi dapat hidup sebagai saprofit, parasit dan dekomposer. Fungi saprofit hidup dan makan dari bahan organik yang sudah mati atau busuk, sehingga mengubah susunan bahan organik tersebut. Fungi sebagai parasit tumbuh pada organisme hidup yang lain. Fungi juga dapat bersimbion/berasosiasi dengan tumbuhan (Gandjar *dkk.* 2006: 37).

Struktur dasar pada fungi multiselular adalah filamen yang dikenal sebagai hifa (Hanson 2008: 2; Madigan *dkk.* 2012: 601). Hifa fungi berdasarkan fungsinya dibedakan menjadi hifa vegetatif dan hifa fertil. Hifa vegetatif merupakan hifa yang umumnya rebah pada permukaan substrat atau tumbuh ke dalam substrat dan berfungsi mengabsorpsi nutrisi yang dibutuhkan untuk kehidupan fungi. Hifa fertil merupakan hifa yang umumnya tegak pada miselium yang ada di permukaan substrat, berperan untuk reproduksi dan berupa sporangiofor atau konidiofor atau karpus dengan tujuan agar penyebaran sel-sel reproduksi yang dibawa berlangsung lebih mudah (Gandjar *dkk.* 2006: 1).

Hifa fungi berdasarkan morfologi dibedakan menjadi hifa berseptum dan hifa tidak berseptum (Benson 2001: 48; Madigan *dkk.* 2012: 601). Hifa yang berseptum memiliki satu inti atau disebut hifa monositik, dapat dilihat pada

Ascomycota (*Aspergillus oryzae*, *Curvularia lunata*, *Penicillium italicum*, *Penicillium chrysogenum*) dan *Basidiomycota*. Hifa tidak bersepta memiliki banyak inti atau disebut hifa senositik (*coenocytic*), dimiliki oleh *Glomeromycota* dan *Zygomycota* seperti *Mucor mucedo*, *Rhizopus* spp., *Absidia* spp., *Syncephalastrum* spp., dan lain-lain (Hogg 2005: 203, 206; Gandjar dkk. 2006: 11--12).



Gambar 2.1.(1). Hifa monositik dan senositik

[Sumber: Hogg 2005 : 198.]

Berdasarkan alat reproduksi seksual, fungi diklasifikasikan dalam 5 filum, yaitu *Chytridiomycota*, *Glomeromycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* dan *Basidiomycota* (Glazer & Nikaido 2007: 35). *Chytridiomycota* sering disebut sebagai "chytrid", menghasilkan zoospora, spora berflagel dan bersifat motil. Sebagai contoh *Chytridiomycota* adalah *Allomyces macrogynus* (Carlile dkk. 2001: 32--33; Webster & Weber 2007: 127). *Glomeromycota* dikenal sebagai *Arbuscular Mycorrhizal*, merupakan kelompok fungi yang belum diketahui reproduksi seksualnya (Solomon dkk. 2008: 565; Madigan dkk. 2012: 605). *Zygomycota* bereproduksi seksual dengan menghasilkan zigospora (Gandjar dkk. 2006: 48). Contoh genus dari *Zygomycota* adalah *Mucor*, *Phycomyces*, dan *Rhizopus* (Carlile dkk. 2001: 39--40; Gandjar dkk. 2006: 55; Webster & Weber 2007: 166). *Ascomycota* bereproduksi secara seksual dengan menghasilkan askospora di dalam askus. Contoh *Ascomycota* adalah *Neurospora crassa* dan *Penicillium chrysogenum* (Campbell dkk. 2008: 645; Madigan dkk. 2012: 605).

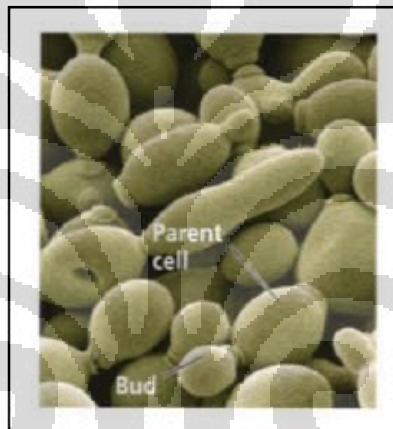
Basidiomycota bereproduksi secara seksual dengan membentuk basidium yang menghasilkan basidiospora. Contoh *Basidiomycota* adalah *Rhodotorula*, *Rhodosporidium* dan *Sporidiobolus* (Carlile & Watkinson 1994: 44, 57; Glazer & Nikaido 2007: 35; Solomon *dkk.* 2008: 568).

Berdasarkan morfologi, fungi dapat dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu khamir (*yeast*), kapang (*mold*), dan cendawan (*mushroom*) (Gandjar *dkk.* 2006: 72; Madigan *dkk.* 2012: 601). Khamir merupakan fungi uniselular yang dikelompokkan ke dalam filum *Ascomycota* dan *Basidiomycota* (Kurtzman & Fell 1998: 33; Carlile *dkk.* 2001: 14). Kapang dan cendawan (*mushroom*) merupakan fungi multiselular (Hogg 2005 : 198). Kapang memiliki bentuk berupa filamen, sedangkan cendawan memiliki tubuh buah (Madigan *dkk.* 2012: 601--602).

Sel khamir berukuran 5--10 μm , dapat berbentuk bulat, oval, dan silindris. Dinding sel khamir tersusun atas glukukan dan mannan. Kitin ditemukan pada septum primer dan pada *scar* pertunasan khamir serta sepanjang bagian dalam dinding sel dalam jumlah yang sedikit (Gandjar *dkk.* 2006: 18). Reproduksi seksual dilakukan dengan produksi askospora atau basidiospora. Interaksi antara dua *mating type* yang berlawanan menyebabkan terjadinya peleburan sel yang diikuti dengan peleburan inti sehingga menghasilkan inti diploid. Inti diploid tersebut selanjutnya mengalami meiosis dan membentuk askospora di dalam askus, contohnya pada genus *Saccharomyces* (Madigan *dkk.* 2012: 605, 607). Pembentukan basidiospora diawali dengan konjugasi antara dua sel dengan *mating type* yang berbeda yang kemudian mengalami plasmogami sehingga membentuk teliospor. Teliospor tersebut kemudian mengalami peleburan inti dan membentuk inti diploid yang akan mengalami meiosis di dalam basidium, kemudian basidiospora terbentuk secara eksogen, contohnya pada genus *Rhodotorula* (Deak 2008: 3--4).

Reproduksi aseksual pada khamir adalah dengan pertunasan (*budding*), pembelahan (*fission*), atau produksi konidia pada tangkai pendek (*sterigmata*). Pertunasan berdasarkan posisi terbentuknya tunas dibedakan menjadi monopolar, bipolar, dan multipolar. Pertunasan yang terjadi pada satu kutub saja disebut monopolar, contohnya pada *Malassezia pachydermatis*. Pertunasan pada dua kutub disebut bipolar, terjadi pada *Hanseniaspora osmophila* dan *Wickerhamia*

fluorescens. Pertunasan dari beberapa tempat pada permukaan sel disebut multipolar, contohnya *Saccharomyces cerevisiae*. Pembelahan sel (*fission*) merupakan karakteristik dari genus *Schizosaccharomyces* (Gandjar *dkk.* 2006: 65-66). Produksi konidia pada tangkai pendek (*sterigmata*) dapat berupa *arthroconidia* atau *ballistoconidia*. Pembentukan *arthroconidia* berasal dari fragmentasi filamen hifa pada khamir yang membentuk *true hyphae*, sedangkan *ballistoconidia* dihasilkan pada *mother cell* yang menghasilkan sterigma dan konidia timbul di sterigma tersebut. *Geotrichum* dan *Trichosporon* merupakan contoh genus dari *arthroconidia*, sedangkan contoh genus dari *ballistoconidia* adalah *Sporobolomyces* (Rosa & Peter 2006: 501; Deak 2008: 2--3, 31).

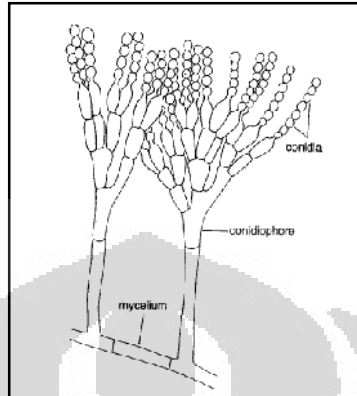


Gambar 2.1.(2). Budding pada *Saccharomyces cerevisiae*
[Sumber: Campbell *dkk.* 2009: 640.]

Komponen utama dinding sel kapang adalah kitin (Gandjar *dkk.* 2006: 17). Kapang dikelompokkan ke dalam filum *Ascomycota* dan *Zygomycota*. Reproduksi seksual dilakukan dengan spora seksual berupa askospora pada filum *Ascomycota* dan zigospora pada filum *Zygomycota*. Reproduksi aseksual dilakukan dengan menghasilkan konidia pada hifa fertil (Hogg 2005: 203; Madigan *dkk.* 2012: 604--605).

Kapang dapat dibedakan menjadi kapang tingkat rendah (*lower fungi*) dan kapang tingkat tinggi (*higher fungi*). Perbedaan kedua kelompok kapang tersebut terletak pada ada tidaknya septum pada hifa dan spora yang dibentuk pada kantung spora (Hogg 2005: 198). Septa umumnya memiliki lubang yang cukup

besar untuk dapat melewati ribosom, mitokondria dan inti mengalir dari satu sel ke sel yang lain (Campbell *dkk.* 2009: 637).



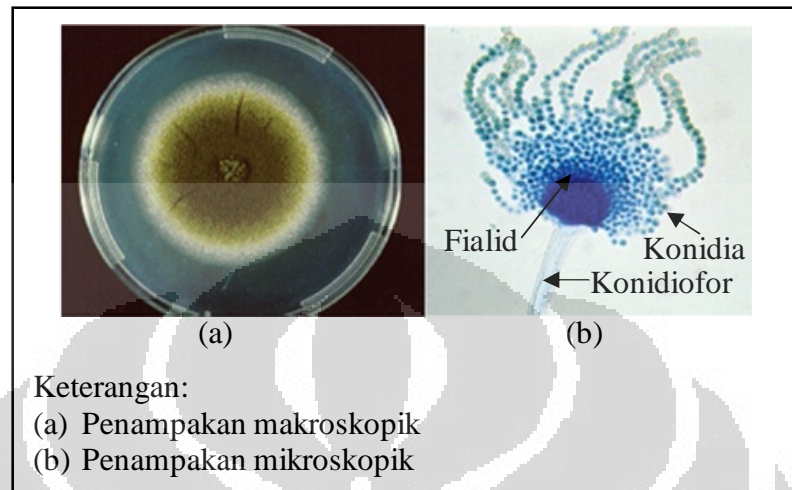
Gambar 2.1.(3). Struktur morfologi konidia pada *Ascomycota*
[Sumber: Hogg 2005: 203.]

2.1.1. *Aspergillus flavus*

Aspergillus merupakan kapang dari filum *Ascomycota*, terdiri atas konidiofor, vesikel, fialid dan konidia. Koloni *Aspergillus flavus* yang ditumbuhkan pada medium *Czapek's Dox* mencapai diameter 3--7 cm dalam waktu 7 hari, dan berwarna hijau kekuningan. Kepala konidia berbentuk bulat. Konidiofor berwarna hialin, kasar dan dapat mencapai panjang 1 mm. Vesikel berbentuk semibulat hingga bulat, dan berdiameter 10--65 μm . Fialid terbentuk langsung pada vesikula atau pada metula, dan berukuran (6--10) x (4--5,5) μm . Konidia berbentuk semibulat hingga bulat, berdiameter 3,5--4,5 μm , hijau pucat, dan berduri (Gandjar *dkk.* 1999: 22; Hedayati 2007: 1679).

Aspergillus umum ditemukan pada kacang-kacangan (khususnya kacang tanah), rempah-rempah, biji yang mengandung minyak, serelia, dan terkadang pada buah yang dikeringkan (Gandjar *et al.* 1999: 22). Maryanto (2004: 13--15, 29--35) telah berhasil mengisolasi *Aspergillus flavus* group yang bersifat xerofilik dari buah lada. *Aspergillus flavus* tumbuh baik pada *water activity* antara 0,86 dan 0,96, temperatur optimum untuk pertumbuhan sebesar 37 °C (Hedayati 2007: 1677). *Aspergillus flavus* menghasilkan aflatoksin, yang merupakan senyawa mikotoksin yang beracun dan karsinogenik (Cleveland *dkk.* 2004: 1253).

Aspergillus flavus UICC 360 merupakan isolat koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC). *Aspergillus flavus* UICC 360 menghasilkan senyawa lovastatin yang bersifat antifungi (Rafliyanti 2010: 32).



Gambar 2.1.1. Penampakan morfologi *Aspergillus flavus* pada medium *Czapek's Dox Agar*

[Sumber: Hedayati 2007: 1682.]

2.1.2. *Candida albicans*

Menurut Barnett (2000: 21), *Candida albicans* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : *Fungi*
Phylum : *Ascomycota*
Class : *Hemiascomycetes*
Ordo : *Saccharomycetales*
Family : *Saccharomycetaceae*
Genus : *Candida*
Species : *Candida albicans* (Robin) Berkhout

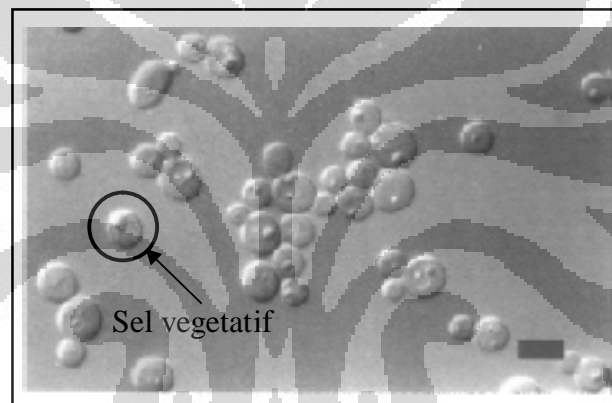
Candida albicans bereproduksi aseksual dengan cara pertunasan.

Pertumbuhan individu baru akan berkembang dari sel induk dan membelah diri menjadi anak sel (Sutedjo *dkk.* 1991: 331; Alexopoulos *dkk.* 1996: 284).

Pertumbuhan pada medium *glucose-yeast extract-peptone* cair setelah 3 hari pada

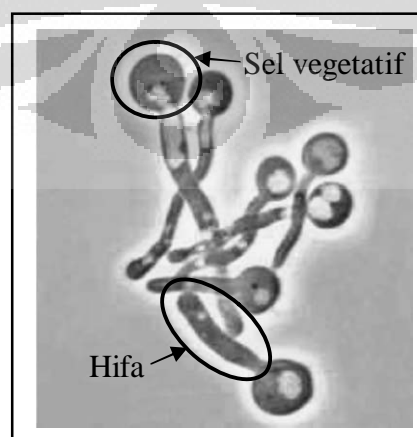
suhu 25 °C, sel *Candida* berbentuk globose sampai ovoid, (3,5--6,0) x (4,0--8,0) µm (Kurtzman & Fell 1998: 477).

Candida merupakan fungi dimorfik, yang penting dalam bidang kedokteran, khususnya *Candida albicans*. *Candida albicans* merupakan khamir yang bersifat opportunistik dalam tubuh manusia, dapat menyebabkan kandidiasis, terutama pada saluran pencernaan, saluran genitalia, saluran pernapasan bagian atas, kulit, infeksi oral, vaginal dan infeksi sistemik (Georgopapadakou 1998: 547; Goldman dkk. 2004: 25). Banyak pengujian senyawa antifungi menggunakan *Candida albicans* sebagai mikroorganisme uji, di antaranya pengujian senyawa antifungi kapang endofit dari *Broussonetia papyrifera* Vent. terhadap *Candida albicans* Y-29 oleh Listiandiani (2011: 51).



Gambar 2.1.2.(1). *Candida albicans* pada medium *glucose-yeast extract-peptone broth*

[Sumber: Kurtzman & Fell 1998: 478.]



Gambar 2.1.2.(2). Sel *Candida albicans* yang menghasilkan hifa

[Sumber: Deacon 2006: 5.]

2.2. Metabolit Sekunder

Fungi menghasilkan metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer berasal dari metabolisme primer, dan merupakan substansi yang penting bagi pertumbuhan fungi. Metabolisme primer terdiri atas proses katabolisme dan anabolisme (Mann 1995: 6--7). Sebaliknya, metabolit sekunder merupakan substansi organik yang dikeluarkan suatu mikroorganisme, yang berasal dari metabolisme sekunder. Substansi tersebut tidak terlalu berperan terhadap metabolisme dasar, pertumbuhan, dan perkembangan mikroorganisme, namun memiliki pengaruh yang besar terhadap lingkungan di sekitarnya (Fox & Howlett 2008: 481).

Metabolit sekunder secara umum dihasilkan pada saat kecepatan pertumbuhan mulai menurun dan selama fase stasioner. Fase terbentuknya metabolit sekunder disebut juga idiofase (Carlile *dkk.* 2001: 513). Produksi metabolit sekunder dipengaruhi oleh banyak faktor antara lain, sumber karbon, sumber nitrogen, dan komposisi medium fermentasi. Medium yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme harus mempunyai komposisi yang tepat, yang dapat mendukung sintesis substansi sel dan membentuk senyawa metabolit sekunder yang dikehendaki (Lopez *dkk.* 2003: 270).

Jalur pembentukan metabolit sekunder tergantung dari senyawa yang dihasilkan. Asetil Co-A merupakan prekursor bagi pembentukan senyawa patulin, griseofulvin, dan cladosporin (Hanson 2008: 32--36, 52--64). Asetil Co-A berperan dalam jalur pembentukan poliketida, yaitu jalur pembentukan metabolit sekunder yang paling umum ditemukan pada fungi (Mann 1995: 25). Jalur pembentukan poliketida dimulai dengan pembentukan malonil-CoA melalui karboksilasi asetil Co-A (Hanson 2008: 48). Kondensasi antara tiga atau lebih molekul malonil-CoA dengan asetil Co-A membentuk rantai. Rantai tersebut mengalami siklisasi membentuk struktur cincin, kemudian cincin tersebut dimodifikasi menjadi beberapa produk, seperti patulin, antibiotik sefalosporin, dan ochratoxin (Deacon 2006: 134--135).

Aspergillus terreus menghasilkan metabolit sekunder berupa lovastatin dan asam itakonat (Bilgrami & Verma 1981: 125; Hajjaj *dkk.* 2001: 2596).

Aspergillus flavus diketahui menghasilkan metabolit sekunder berupa aflatoksin. *Penicillium chrysogenum* dan *Penicillium notatum* menghasilkan metabolit sekunder berupa antibiotik penisilin, sedangkan *P. griseofulvum* menghasilkan griseofulvin (Griffin 1981: 99). *Aspergillus flavus* UICC 360 menghasilkan lovastatin yang memiliki aktivitas antifungi.

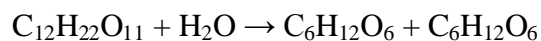
Lovastatin terdiri atas dua bentuk, yaitu bentuk β -hidroksi dan lakton. Lovastatin dalam bentuk β -hidroksi menunjukkan aktivitas antifungi, di antaranya menghambat pertumbuhan *Rhodotorula rubra* dan *Candida albicans* (Kumar dkk. 2000: 100; Ferron dkk. 2005: 123). Lovastatin juga diketahui berpotensi sebagai obat penurun kolesterol. Lovastatin menghambat enzim *hydroxymethylglutaryl coenzyme A* (HMG-CoA) reduktase yang dapat mereduksi katalisis HMG-CoA menjadi mevalonat selama sintesis kolesterol (Hajjaj dkk. 2001: 2596).

2.3. Sumber Karbon

Nutrien merupakan faktor yang penting dalam pertumbuhan mikroorganisme, terutama sumber karbon. Fungi adalah mikroorganisme heterotrof karena tidak memiliki kemampuan untuk mengoksidasi senyawa karbon anorganik, atau senyawa karbon yang memiliki satu karbon (Gandjar dkk. 2006: 24). Sumber karbon dan sumber nitrogen pada medium berperan penting sebagai sumber prekursor dan kofaktor untuk sintesis biomassa sel, *building block*, dan produksi lovastatin (Hajjaj dkk. 2001: 2597; Lopez dkk. 2003: 270). Karbon juga dibutuhkan untuk sintesis protein, asam nukleat, materi dinding sel, dan cadangan makanan bagi fungi (Cochrane 1958: 55).

Apabila kapang ditumbuhkan pada medium yang mengandung glukosa, maka akan terjadi represi katabolik. Represi katabolik terjadi apabila kapang ditumbuhkan pada medium yang mengandung dua sumber gula. Kapang akan lebih dahulu memetabolisme gula yang sederhana, sehingga biosintesis degradatif enzim yang berfungsi untuk metabolisme gula lain yang lebih kompleks akan terhambat. Jika tidak terdapat sumber karbon dalam bentuk sederhana, fungi akan memanfaatkan sumber karbon kompleks dengan membentuk enzim ekstraselular (Bilgrami & Verma 1981: 31, 68).

Kapang mampu menggunakan disakarida sebagai sumber karbon untuk pertumbuhan. Sukrosa terdiri atas glukosa dan fruktosa yang dihubungkan oleh ikatan β -(1,4) glikosida. Sukrosa diubah menjadi monomer glukosa dan fruktosa oleh enzim ekstraselular invertase (sukrase) (Bilgrami & Verma 1981: 31).



Sukrosa Glukosa Fruktosa

Monomer-monomer tersebut diserap oleh fungi dan digunakan untuk bermacam-macam metabolisme selnya. Bizukoje & Ledakowicz (2004: 2261--2262) melaporkan bahwa sukrosa merupakan gula yang mudah dihidrolisis, sehingga *Aspergillus niger* isolat BIO4F dapat tumbuh cepat pada medium yang mengandung sukrosa. Pertumbuhan *Aspergillus niger* BIO4F dapat diamati pada waktu inkubasi kurang dari 20 jam.

Penelitian Ngampanya & Phongtongpasuk (2006: 129) menunjukkan perubahan dalam konsentrasi sukrosa memberikan pengaruh yang signifikan terhadap produksi protein dan aktivitas enzimatis spesifik. Peningkatan konsentrasi sukrosa menyebabkan penurunan aktivitas enzim. Penelitian Kiel *dkk.* (1981: 3) menunjukkan bahwa konsentrasi sukrosa memengaruhi fermentasi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* yang ditumbuhkan selama 8 hari. Konsentrasi sukrosa sebesar 14% memberikan hasil maksimal pada produksi asam sitrat dengan efisiensi fermentasi sebesar 0,11. Konsentrasi sukrosa sebesar 3% memiliki efisiensi fermentasi yang lebih besar, yaitu sebesar 0,36, meskipun asam sitrat yang dihasilkan tidak sebanyak pada konsentrasi 14%.

2.4. Fermentasi

Fermentasi merupakan reaksi biokimia yang menghasilkan energi dengan molekul organik berperan sebagai donor dan akseptor elektron. Kemampuan suatu mikroorganisme melakukan fermentasi karbohidrat dan jenis produk yang dihasilkan berguna dalam proses identifikasi. Setiap mikroorganisme memerlukan sumber energi untuk kelangsungan hidupnya. Berbagai jenis gula dapat digunakan sebagai sumber energi oleh berbagai jenis mikroorganisme (Gandjar *dkk.* 1992: 57). Karbohidrat merupakan polihidroksi aldehida atau keton

atau senyawa yang menghasilkan senyawa-senyawa tersebut bila dihidrolisis. Karbohidrat dapat diklasifikasikan menjadi monosakarida, disakarida, oligosakarida, dan polisakarida (Lehninger 1995: 313--314).

Proses fermentasi berdasarkan substrat dapat dibedakan menjadi dua, yaitu:

1. Fermentasi padat (*solid substrate fermentation*), substrat yang digunakan adalah substrat padat, seperti daging, beras, dan lain-lain.
2. Fermentasi cair (*liquid substrate fermentation*), substrat yang digunakan adalah substrat cair, seperti air kelapa, susu, sari buah, dan lain-lain.

(Gandjar *dkk.* 1992: 62).

Pembentukan senyawa metabolit sekunder umumnya dihasilkan melalui proses fermentasi. Faktor-faktor yang memengaruhi fermentasi adalah jenis mikroorganisme, umur mikroorganisme, konsentrasi inokulum, dan waktu inkubasi. Suatu metabolit sekunder dapat dihasilkan oleh jenis mikroorganisme tertentu. Griseofulvin dihasilkan dalam fermentasi *Penicillium griseofulum* (Hanson 2008: 61). Konsentrasi inokulum yang diinokulasikan ke dalam medium fermentasi akan memengaruhi pertumbuhan mikroorganisme, dan akan berpengaruh pada pembentukan metabolit sekunder. Konsentrasi inokulum yang semakin besar menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme terhambat, karena terjadi kompetisi dalam memperoleh nutrisi. Waktu inkubasi berhubungan dengan kematian sel dan nutrisi (Chanakya *dkk.* 2011: 10). Waktu inkubasi yang terlalu lama menyebabkan sel telah memasuki fase kematian dan nutrisi yang mulai habis. Penelitian Chanakya *dkk.* (2011: 10) menunjukkan produksi lovastatin optimal pada waktu inkubasi selama 168 jam, dan setelah 168 jam produksinya mengalami penurunan.

Faktor lain yang berpengaruh dalam proses fermentasi adalah suhu, derajat keasaman (pH), ketersediaan oksigen (aerasi), dan medium. Suhu penting dalam kecepatan pertumbuhan dan kelangsungan hidup mikroorganisme. Setiap mikroorganisme memiliki kisaran suhu yang bervariasi. Pertumbuhan mikroorganisme dipengaruhi oleh pH medium. Sebagian besar kapang tumbuh baik pada pH 4--7. pH medium berpengaruh terhadap permeabilitas membran sel, pH internal miselium, dan aktivitas enzim (Bilgrami & Verma 1981: 68). Kapang

bersifat aerob obligat. Oksigen diperlukan untuk proses respirasi. Kadar air yang tinggi pada medium menyebabkan transfer oksigen berkurang (Gupta *dkk.* 2003: 1603). Medium kultur sangat memengaruhi produksi suatu metabolit sekunder, terutama optimasi komposisi yang terdapat di dalam medium. Nutrien utama pada medium fermentasi, seperti sumber karbon dan sumber nitrogen memiliki peran penting dalam produktivitas, terutama biomassa sel dan metabolisme sel. Konsentrasi sumber karbon secara alami mengatur produksi metabolit sekunder melalui proses represi katabolik (Lopez *dkk.* 2003: 270).

2.5. Senyawa Antifungi

Antifungi adalah senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh fungi. Berdasarkan daya kerjanya terhadap fungi, senyawa antifungi dibagi dalam 2 kelompok, yaitu fungistatik dan fungisidal. Fungistatik adalah senyawa yang dapat menghentikan pertumbuhan fungi, sedangkan fungisidal merupakan senyawa yang daya kerjanya bersifat mematikan (Carlile *dkk.* 2001: 179).

Mekanisme kerja antifungi antara lain penghambatan dalam sintesis DNA, penghambatan sintesis ergosterol, mengganggu fungsi membran, dan menghambat sintesis glukukan yang merupakan salah satu komponen penyusun dinding sel fungi (Carlile & Watkinson 1994: 147; Cannon *dkk.* 2009: 292; Bhetariya *dkk.* 2011: 107). Penghambatan sintesis ergosterol terjadi karena terhambatnya sintesis lanosterol (Georgopapadakou 1998: 548; Cannon *dkk.* 2007: 3211; Madigan *dkk.* 2012: 777).

Nystatin merupakan antibiotik *polyene* yang secara klinis penting sebagai agen antifungi karena kemampuan selektifnya yang bersifat toksik terhadap sel fungi. Nystatin diisolasi dari *Streptomyces noursei* (Arikan *dkk.* 2002: 1406). Langkah awal interaksi nystatin dengan lipid bilayer adalah mempengaruhi adsorpsi dari molekul monomer antibiotik dengan daerah polar pada kepala membran lipid (Silva *dkk.* 2006: 3625). Nystatin menyebabkan kerusakan membran sel khamir, yang disebabkan oleh kebocoran dari komponen internal seperti K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan PO_4^- , serta diikuti oleh penghambatan terhadap

glikolisis dan sintesis protein sehingga menyebabkan kematian sel. Kebocoran ion K^+ akibat pemberian nystatin telah ditunjukkan pada *Candida albicans* dan *Saccharomyces cerevisiae* (Nedal dkk. 2007: 7400).

Aspergillus gorakhpurensis MTCC 547 menghasilkan metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antifungi, diketahui menghambat pertumbuhan beberapa fungi seperti *Aspergillus niger*, *Candida albicans* dan *Saccharomyces cerevisiae* (Busi dkk. 2009: 163). *Aspergillus aculeatus* menghasilkan aculeacin A yang menghambat pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* dengan menghambat sintesis glukosa (Mizoguchi dkk. 1977: 308). *Aspergillus terreus* menghasilkan lovastatin dalam bentuk β -hidroksi yang bersifat antifungi. Pada konsentrasi 0,1-0,5 $\mu\text{g/ml}$, lovastatin menghambat pertumbuhan *Rhodotorula rubra*, memicu apoptosis pada *Mucor racemosus*, dan menghambat pembelahan pada *Physarum polycephalum* (Kumar dkk. 2000: 100). Penelitian Rafliyanti (2010: 32) menunjukkan bahwa *Aspergillus flavus* UICC 360 menghasilkan lovastatin yang memiliki aktivitas antifungi dengan menghambat pertumbuhan *Candida albicans* UICC Y-29.

2.6. Ekstraksi Senyawa Antifungi

Ekstraksi merupakan proses penarikan senyawa yang diinginkan dari suatu bahan. Prinsip umum metode ekstraksi menggunakan pelarut organik adalah bahan yang akan diekstrak kontak langsung dengan pelarut pada waktu tertentu (maserasi), kemudian diikuti dengan melakukan pemisahan bahan yang telah diekstrak (filtrasi). Pada proses maserasi, pelarut akan menembus dinding sel dan akan masuk ke dalam rongga sehingga komponen bioaktif akan larut. Adanya perbedaan konsentrasi antara larutan komponen bioaktif di dalam sel dengan di luar sel maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut terjadi berulang kali hingga terjadi keseimbangan antara larutan di luar dengan di dalam sel (Nur & Adijuwana 1989) (lihat Hardiningtyas 2009: 8).

Metode ekstraksi bergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak, karena setiap senyawa memiliki kelarutan yang berbeda dalam pelarut yang berbeda. Senyawa yang memiliki kepolaran relatif sama dengan pelarut, akan

mudah larut. Pelarut polar akan melarutkan senyawa polar, dan pelarut nonpolar akan melarutkan senyawa nonpolar (Khopkar 2002: 86--87). Pelarut yang umum digunakan antara lain, heksana, n-butanol, etil asetat, asetonitril, kloroform dan metanol (Samiee *dkk.* 2003: 30; Atalla *dkk.* 2008: 7). Lavermicocca *dkk.* (2000: 4085) menggunakan kloroform, n-heksana, n-butanol, dan etil asetat sebagai pelarut dalam ekstraksi antifungi.

Rafliyanti (2010: 11) menggunakan etil asetat untuk ekstraksi lovastatin kapang *Aspergillus* koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC). Penelitian tersebut menunjukkan lovastatin berhasil diekstraksi dari *Aspergillus flavus* UICC 360 dengan menggunakan etil asetat, dan memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *Candida albicans* UICC Y-29. Kumar *dkk.* (2000: 102) menggunakan etil asetat sebagai pelarut dalam ekstraksi lovastatin dalam bentuk β -hidroksi yang bersifat antifungi, dengan menghambat pertumbuhan *Neurospora crassa*.

2.7. Analisis Antifungi

Biological assay atau *bioassay* didefinisikan sebagai pengujian suatu aktivitas biologi dari suatu substansi (senyawa kimia) tertentu dengan menguji pengaruh substansi tersebut terhadap mikroorganisme. *Bioassay* umum digunakan untuk mengkarakterisasi suatu substansi biologi, mempelajari proses biologi, dan untuk mendeteksi keberadaan dan kuantitas suatu substansi dalam sampel, sebelum substansi tersebut digunakan oleh manusia (Wu 2010: 1). Menurut Hewitt (2005:1), *bioassay* merupakan prosedur praktis untuk mengetahui potensi dari suatu material yang belum diketahui, diperkirakan dengan membandingkan pengaruh dari material tersebut pada suatu sistem biologi dengan keterangan standar yang diketahui.

Pengaruh senyawa kimia antifungi terhadap pertumbuhan mikroorganisme dapat diamati dengan *Agar Diffusion Method* dengan menggunakan kertas cakram (*Paper Disk Assay Method*) atau silinder kaca (*Cylinder Plate Assay Method*) (Gandjar *dkk.* 1992: 44--47). Suatu senyawa antifungi yang terkandung dalam kertas cakram atau silinder kaca akan berdifusi ke medium agar yang telah

diinokulasikan dengan mikroorganisme uji. Kontak terjadi antara senyawa antifungi dengan mikroorganisme dan menyebabkan penghambatan pada pertumbuhan mikroorganisme atau kematian sel. Proses tersebut terjadi selama masa inkubasi (Gandjar *dkk.* 1992: 44--47; Madigan *dkk.* 2012: 763). Aktivitas senyawa antifungi ditandai dengan terbentuknya zona bening atau zona hambat di sekitar kertas cakram atau silinder kaca (Benson 2001: 143).

Zona bening atau zona hambat yang terbentuk merupakan zona penghambatan pertumbuhan mikroorganisme. Semakin besar zona hambat, semakin baik kemampuan senyawa antibiotik tersebut untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme di sekitarnya (Salle 1961: 460; Madigan *dkk.* 2000: 751). Efektivitas suatu senyawa antifungi dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya kemampuan difusi dari senyawa antifungi, konsentrasi dari senyawa antifungi, konsentrasi organisme uji yang diinokulasikan ke dalam medium, dan tipe medium (Benson 2001: 145). Tomita (1985) menyatakan terbentuknya zona hambat merupakan indikator untuk metode skrining dalam menyeleksi mikroba yang berpotensi menghasilkan senyawa antimikroba (*lihat* Sukmawati 2002: 12).

Sukmawati (2002: 8, 12) menggunakan silinder kaca untuk pengujian *Aspergillus terreus* dalam menghasilkan senyawa anti-*Candida albicans*. Aktivitas senyawa anti-*Candida albicans* ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar filtrat isolat kapang *Aspergillus terreus* UICC 317 pada medium yang diinokulasikan *Candida albicans* yang merupakan zona penghambatan pertumbuhan.

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Taksonomi Hewan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia. Penelitian berlangsung selama enam bulan, terhitung sejak Mei 2011 hingga Oktober 2011.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain: jarum tanam tajam, jarum tanam bulat (ose), pembakar spiritus, spatel *Drygalsky*, labu Erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, gelas ukur [IWAKI Pyrex[®]], kotak transfer, mikroskop [Euromex Holland], mikroskop trinokular [CARL ZEISS PRIMO STAR 176045], mikroskop cahaya [Olympus], mikropipet 1 ml [Finnpipette], mikropipet 100 μ l [Biohit], inkubator *shaker* [OSK], corong pemisah [Duran], tip 1 ml dan 100 μ l, gelas objek dan kaca penutup, pinset, vortex [BIO-RAD BR-2000], autoklaf [Hirayama], oven [Heraeus], pembakar spiritus, timbangan digital [Acculab model 121], timbangan analitik [Oertling], *colony counter*, pipet, dispenser, rak tabung, penangas air [Sharp], *beaker glass* [IWAKI Pyrex[®]], lemari pendingin [Gassio], spatula, pinset, batang pengaduk, kamera [Canon], botol alkohol, pematik api, penggaris, gunting, marker OHP, *software* perhitungan statistik [*Statistical Product and Service Solution (SPSS) 16.0 for Windows*] dan *software* tabulasi data [*Microsoft Office Excel 2007*].

3.2.2. Bahan

3.2.2.1. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian adalah kapang dan khamir koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC). Kapang yang digunakan dalam proses fermentasi senyawa metabolit sekunder adalah *Aspergillus flavus* UICC 360. Khamir yang digunakan untuk pengujian senyawa antifungi adalah *Candida albicans* UICC Y-29.

3.2.2.2. Medium

Medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) digunakan untuk menumbuhkan kapang, peremajaan, pengamatan morfologi kapang, dan enumerasi spora kapang. Medium untuk pertumbuhan, peremajaan, pengamatan morfologi dan enumerasi sel khamir adalah *Yeast Malt Agar* (YMA). Proses fermentasi senyawa anti-*Candida albicans* menggunakan medium *Czapek's Dox Broth* (CDB) dengan konsentrasi sukrosa yang dimodifikasi.

3.2.2.3. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah etil-asetat [Brataco Chem], H₂SO₄ [Merck], KCl [Analar], NaNO₃ [Merck], K₂HPO₄ [Merck], MgSO₄.7H₂O [Merck], HCl, FeSO₄.7H₂O [Merck], sukrosa [Britania], *yeast extract* [Bacto], *malt extract* [BD], *peptone* [Merck], glukosa [Britania], agar [Britania], alkohol 70%, spirtus, laktofenol *cotton blue*, dan akuades.

3.2.2.4. Bahan Habis Pakai

Bahan habis pakai yang digunakan diantaranya kertas pH [Universal], plastik tahan panas [Bell], masker, tissue gulung, kertas *Yellow Pages*, karet gelang, kertas saring, kapas, dan kertas cakram (*paper disk*) 10 mm [Whatman].

3.3. Cara Kerja

Skema kerja penelitian terdapat pada lampiran 1.

3.3.1. Pembuatan Medium

3.3.1.1. *Potato Dextrose Agar (PDA)*

Medium PDA dibuat berdasarkan petunjuk kemasan. Akuades ditambahkan pada 39 g bubuk PDA hingga volume akhir 1000 ml, kemudian medium dipanaskan dengan penangas air hingga mendidih dan semua bahan larut dengan sempurna. Selanjutnya medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium steril disimpan pada suhu ruang hingga mengeras.

3.3.1.2. *Yeast Malt Agar (YMA)*

Medium YMA dibuat berdasarkan Gandjar *dkk.* (1992: 83). Komposisi medium YMA terdiri dari: *yeast extract* 3 g, *malt extract* 3 g, *peptone* 5 g, glukosa 10 g, dan agar 15 g. Akuades ditambahkan pada bahan hingga volume akhir 1000 ml, kemudian dipanaskan dengan penangas air hingga mendidih dan semua bahan larut dengan sempurna. Selanjutnya medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit. Medium steril disimpan pada suhu ruang hingga mengeras.

3.3.1.3. *Czapek's Dox Broth (CDB)*

Komposisi medium CDB terdiri dari: 0,5 g KCl, 3 g NaNO₃, 1 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄.7H₂O, dan 0,01 g FeSO₄.7H₂O. Medium CDB dibuat berdasarkan Atlas (2010: 480) untuk 1000 ml, dengan variasi sukrosa sebesar 2%, 2,5%, 3%, 3,5% dan 4%. Medium ditempatkan dalam labu Erlenmeyer berukuran 250 ml

sebanyak 50 ml, kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

3.3.2. Pembuatan *Stock Culture* dan *Working Culture Aspergillus flavus* UICC 360 dan *Candida albicans* Y-29

Pembuatan *stock culture* dan *working culture* dilakukan dengan menginokulasikan biakan kapang dan khamir ke dalam 4 tabung berisi 5 ml medium agar miring. Medium yang digunakan adalah medium PDA untuk *Aspergillus flavus* UICC 360, dan YMA untuk *Candida albicans* UICC Y-29. Inokulasi biakan kapang dilakukan dengan metode *streak* menggunakan jarum tanam tajam, sedangkan inokulasi biakan khamir dilakukan menggunakan jarum tanam bulat (*ose*). Tabung reaksi berisi biakan kapang dan khamir diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari untuk biakan kapang dan 48 jam untuk biakan khamir. Dua tabung biakan digunakan sebagai *stock culture* dan disimpan pada suhu 4 °C dalam lemari pendingin, sedangkan dua tabung lainnya digunakan sebagai *working culture* dan disimpan pada suhu ruang.

3.3.3. Pengamatan Biakan *Aspergillus flavus* UICC 360 dan *Candida albicans* Y-29

Pengamatan morfologi kapang dan khamir dilakukan untuk mengetahui karakter yang dimiliki oleh mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian. Pengamatan karakter morfologi dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik, berdasarkan Pelczar *dkk.* (1977: 292). Inokulasi kapang dilakukan dengan teknik *stab* dalam medium PDA. Satu *stab* dilakukan pada pusat medium, sehingga akan dihasilkan satu koloni kapang. Medium kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam melakukan pengamatan morfologi kapang secara makroskopik antara lain warna koloni, *reverse of colony* (warna sebalik koloni), diameter koloni, tekstur koloni, ada tidaknya garis atau lingkaran konsentris (*zonasi*), *exudate drops* dan warnanya,

radial furrow, *growing zone*, serta sporulasi. Pengamatan warna koloni menggunakan standar tabel warna Castell-Polychromos No.9216 (Lampiran 2).

Pengamatan mikroskopik kapang dilakukan berdasarkan Gandjar *dkk.* (1999: 4--5) meliputi ada tidaknya septum pada hifa, hifa berpigmentasi hialin (tidak berwarna atau biru bila diberi cat) atau gelap (*dematiaceous*, cokelat kehijauan atau kehitaman, hitam kelam, hitam keabu-abuan), filid, metula, kepala konidia (bentuk, ukuran dan tipe), vesikel, dan konidia (ukuran, bentuk). Pengamatan dilakukan pada perbesaran 10 x 40, untuk setiap 20 kepala konidia. Hasil pengamatan makroskopik dan mikroskopik kapang selanjutnya dibandingkan dengan literatur atau monograf. Literatur yang digunakan di antaranya Samson *dkk.* (1984: 58) dan Bennett & Klich (1992: 381).

Biakan khamir *distreak* ke dalam medium YMA. Medium kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Pengamatan morfologi khamir berdasarkan Harley (2005: 374) meliputi tekstur, warna koloni, tepi koloni, dan profil koloni. Pengamatan mikroskopis yang dilakukan berdasarkan Gandjar *dkk.* (1992: 28), meliputi bentuk sel, ukuran sel, pola pertunasan (*budding*), dan miselium semu (*pseudomycelium*).

3.3.4. Enumerasi Hifa dan Konidia Kapang serta Sel Khamir

Aspergillus flavus UICC 360 diinokulasi dengan metode *streak* sebanyak 15 gores menggunakan jarum tanam tajam ke dalam tabung reaksi berisi 5 ml medium PDA miring dan diinkubasi selama 7 hari. Enumerasi sel khamir dilakukan dengan menginokulasikan *Candida albicans* UICC Y-29 dengan metode *streak* sebanyak 15 gores menggunakan jarum tanam bulat (ose) ke dalam tabung reaksi berisi 5 ml medium YMA miring dan diinkubasi selama 2 hari. Suspensi diperoleh dengan menambahkan 5 ml akuades steril ke dalam medium berisi biakan, kemudian dikerik menggunakan ose. Suspensi dikocok menggunakan vortex hingga diperoleh suspensi yang homogen.

Suspensi hifa dan konidia kapang diencerkan menggunakan akuades steril hingga faktor pengenceran 10^{-4} , 10^{-5} dan 10^{-6} , sedangkan untuk sel khamir diencerkan hingga faktor pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} dan 10^{-7} . Sebanyak 100 μ l

suspensi hifa dan konidia kapang atau sel khamir diambil dari tiga pengenceran terakhir dengan mikropipet, kemudian disebar di atas cawan petri berisi 15 ml medium PDA untuk hifa dan konidia kapang atau medium YMA untuk sel khamir, kemudian diratakan menggunakan spatel *drygalsky* steril. Masing-masing pengenceran dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (triplo). Masa inkubasi berlangsung selama 48 jam pada suhu ruang. Perhitungan jumlah koloni dilakukan pada masing-masing pengenceran. Enumerasi hifa dan konidia kapang dan sel khamir dapat dilihat pada Lampiran 3 dan 4.

Hasil perhitungan dengan metode TPC dinyatakan sebagai satuan *colony forming unit* (CFU). Jumlah spora atau sel per ml sampel dihitung berdasarkan Gandjar *dkk.* (1992: 40--41).

$$\text{Jumlah CFU/mL} = \frac{\text{Jumlah rata-rata koloni}}{\text{Volume inokulum (ml) x faktor pengenceran}}$$

3.3.5. Fermentasi Senyawa Anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360

Fermentasi senyawa anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 dilakukan berdasarkan Atalla *dkk.* (2008: 8) yang dimodifikasi. Medium yang digunakan dalam proses fermentasi adalah medium CDB dengan variasi sukrosa yang berbeda (0 mM, 58,5 mM, 73 mM, 87,7 mM, 102,3 mM, dan 116,9 mM). Inokulum kapang yang digunakan diperoleh dengan menginokulasikan *Aspergillus flavus* UICC 360 dengan metode gores sebanyak 15 gores menggunakan jarum tanam tajam ke dalam tabung reaksi berisi 5 ml medium PDA miring dan diinkubasi selama 7 hari. Setelah 7 hari, medium berisi biakan ditambahkan 5 ml akuades steril dan dihomogenkan menggunakan vorteks. Sebanyak 1 ml (1,96%) inokulum *Aspergillus flavus* UICC 360 $(1,33\text{--}2,59) \times 10^7$ CFU/ml diinokulasikan ke dalam 18 Erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml medium CDB steril dengan perlakuan yang mengalami tiga kali pengulangan.

pH medium sebelum fermentasi diukur menggunakan kertas pH. Teknik fermentasi yang digunakan adalah fermentasi goyang pada suhu 28--30 °C dalam

inkubator *shaker* dengan kecepatan pengocokan 100 rpm serta waktu inkubasi selama 7 hari. Setelah 7 hari, medium berisi inokulum yang telah mengalami fermentasi tersebut dikeluarkan dari inkubator *shaker*. Kemudian dilakukan pengukuran pH, pengamatan warna medium setelah fermentasi, dan pengamatan miselium. Fermentasi Senyawa Anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.3.6. Ekstraksi Senyawa Anti-*Candida albicans*

Ekstraksi senyawa anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 dilakukan berdasarkan Samiee *dkk.* (2003: 30) yang dimodifikasi. Pemanenan filtrat dilakukan dengan menyaring medium fermentasi menggunakan kertas saring yang telah dikeringkan sebelumnya. Asam klorida 2 N ditambahkan ke dalam filtrat hingga mencapai pH 3. Proses ekstraksi dilakukan dengan menambahkan etil asetat ke dalam filtrat. Etil asetat yang ditambahkan dengan perbandingan 1:1 dengan kultur. Ekstraksi menggunakan etil asetat dilakukan sebanyak tiga kali, kemudian dilakukan penguapan menggunakan *rotary evaporator* di Laboratorium Taksonomi Hewan pada suhu 40 °C selama 10--15 menit. Ekstraksi senyawa Anti-*Candida albicans* dapat dilihat pada Lampiran 6.

3.3.7. Penimbangan Biomassa Kering Miselium

Miselium yang telah terpisah dari filtrat dikeringkan dalam oven dengan suhu 40 °C agar diperoleh biomassa kering. Biomassa kering yang dihasilkan ditimbang dengan timbangan analitik. Penimbangan biomassa kering miselium dapat dilihat pada Lampiran 7.

3.3.8. Pengujian Aktivitas Anti-*Candida albicans* dari Ekstrak Kapang dengan Metode *Paper Disk Assay*

Uji aktivitas senyawa anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 dilakukan menggunakan *bioassay* berdasarkan Ferron *dkk.* (2005: 124) yang

dimodifikasi. Sebanyak 0,2 ml suspensi biakan *Candida albicans* (2,28--3,67) x 10⁸ CFU/ml diinokulasikan ke dalam tabung 15 ml medium YMA, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Suspensi dituang ke dalam cawan petri berdiameter 90 mm dan dibiarkan sampai mengeras. Proses pengujian *bioassay* menggunakan *Paper Disk Assay Method* berdasarkan Gandjar *dkk.* (1992: 46). Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan pada masing-masing perlakuan.

Setiap cawan petri dibagi menjadi 4 juring, ke dalam masing-masing juring diletakkan *paper disk* yang berdiameter 10 mm. Ekstrak dari masing-masing perlakuan dilarutkan dalam etil asetat. Kontrol positif berupa nystatin 1.000 ppm, dan H₂O sebagai kontrol medium, sedangkan kontrol negatif berupa etil asetat. Sebanyak 30 µl ekstrak dari masing-masing fermentasi, kontrol positif, kontrol negatif dan kontrol medium diteteskan ke dalam *Paper Disk* kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong. Pengujian aktivitas anti-*Candida albicans* dari ekstrak kapang dengan metode *Paper Disk Assay* dapat dilihat pada Lampiran 8.

3.3.8. Pengolahan dan Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh berupa data kualitatif dan data kuantitatif, dan disusun dalam bentuk tabel pengamatan dan gambar. Data kualitatif meliputi data hasil pengamatan morfologi secara makroskopik dan mikroskopik *Aspergillus flavus* UICC 360, data pengukuran pH, data hasil fermentasi. Data kuantitatif meliputi data hasil enumerasi *Aspergillus flavus* UICC 360 dan *Candida albicans* Y-29, dan data hasil pengamatan diameter zona bening. Analisis data kualitatif dilakukan secara deskriptif, sedangkan analisis data kuantitatif dilakukan menggunakan program SPSS 16.

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengamatan Morfologi Kapang

Kapang yang digunakan dalam penelitian adalah *Aspergillus flavus* UICC 360. Pengamatan karakter morfologi kapang meliputi pengamatan morfologi secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan karakter morfologi dilakukan pada biakan *Aspergillus flavus* UICC 360 berumur 7 hari, dalam medium PDA yang diinkubasi di suhu ruang.

Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik dari *Aspergillus flavus* UICC 360 adalah sebagai berikut: diameter koloni sebesar 7 cm, warna koloni adalah hijau zaitun dan telah bersporulasi. Sebalik koloni tidak berwarna atau hialin. Koloni bertekstur granular atau butiran, terdapat *exudate drops*, *growing zone*, sporulasi, dan zonasi, namun tidak terdapat *radial furrow*. Hasil pengamatan makroskopik *Aspergillus flavus* UICC 360 dapat dilihat pada Tabel 4.1. dan Gambar 4.1.(1) dan 4.1.(2).

Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dari *Aspergillus flavus* UICC 360 adalah sebagai berikut: konidia berbentuk bulat dengan ukuran diameter berkisar 5,24--13,43 μm . Jenis hifa *Aspergillus flavus* UICC 360 adalah hifa bersepta, dan berpigmentasi hialin. Lebar hifa berkisar 12,0--40,0 μm . *Aspergillus flavus* UICC 360 memiliki konidia, fialid, dan vesikel, dengan tipe kepala konidia yang diperlihatkan adalah *uniseriate*. Vesikel berbentuk bulat, dengan lebar berkisar 52,0--148,0 μm . Kepala konidia *radiate*, berbentuk semibulat hingga bulat, dan berukuran (60,0--160,0) x (72,0--192,0) μm . Hasil yang diperoleh sesuai dengan deskripsi karakter kapang *Aspergillus flavus* oleh Samson *dkk.* (1984: 58) serta Bennett & Klich (1992: 381). Menurut Bennett & Klich (1992: 381), *Aspergillus flavus* memiliki warna koloni kuning hingga hijau zaitun, hifa berpigmentasi hialin, vesikel semibulat hingga bulat, kepala konidia umumnya *radiate*. Menurut Samson *dkk.* (1984: 58), *Aspergillus flavus* memiliki konidia semibulat hingga bulat, fialid melekat langsung pada vesikel (*uniseriate*) atau pada metula (*biseriate*). Hasil pengamatan mikroskopik kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 dapat dilihat pada Tabel 4.1. dan Gambar 4.1.(3).

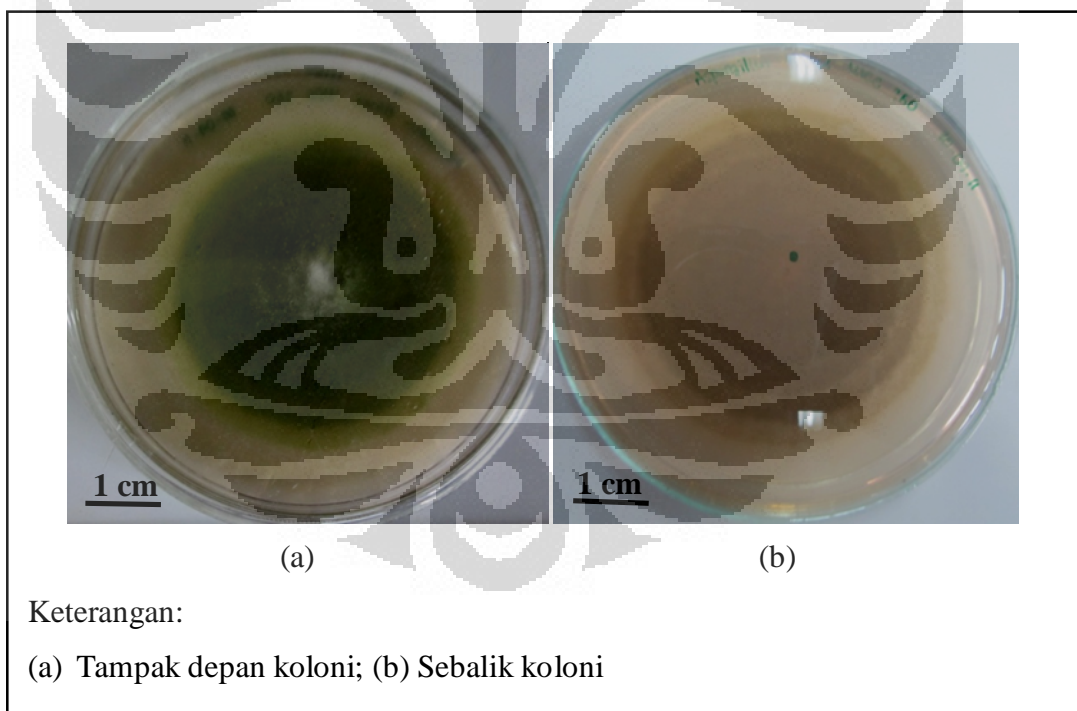
Tabel 4.1. Hasil pengamatan makroskopik dan mikroskopik *Aspergillus flavus* UICC 360 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang

Karakter Morfologi	Keterangan
Makroskopik	
a. Warna koloni	Hijau zaitun
b. Warna sebalik koloni	Hialin
c. Tekstur koloni	Granular
d. <i>Exudate drops</i>	Ada
e. <i>Radial furrow</i>	Tidak ada
f. <i>Growing zone</i>	Ada
g. Sporulasi	Ada
h. Zonasi	Ada
Mikroskopik	
a. Jenis hifa	Bersekat
b. Lebar hifa	12,0--40,0 μm
c. Bentuk kepala konidia	Semibulat hingga bulat
d. Ukuran kepala konidia	(60,0--160,0) x (72,0--192,0) μm
e. Bentuk konidia	Bulat
f. Ukuran konidia	5,24--13,43 μm
g. Lebar vesikel	52,0--148,0 μm
h. Tipe kepala konidia	<i>Uniseriate</i>



Gambar 4.1.(1). *Stock culture Aspergillus flavus* UICC 360 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

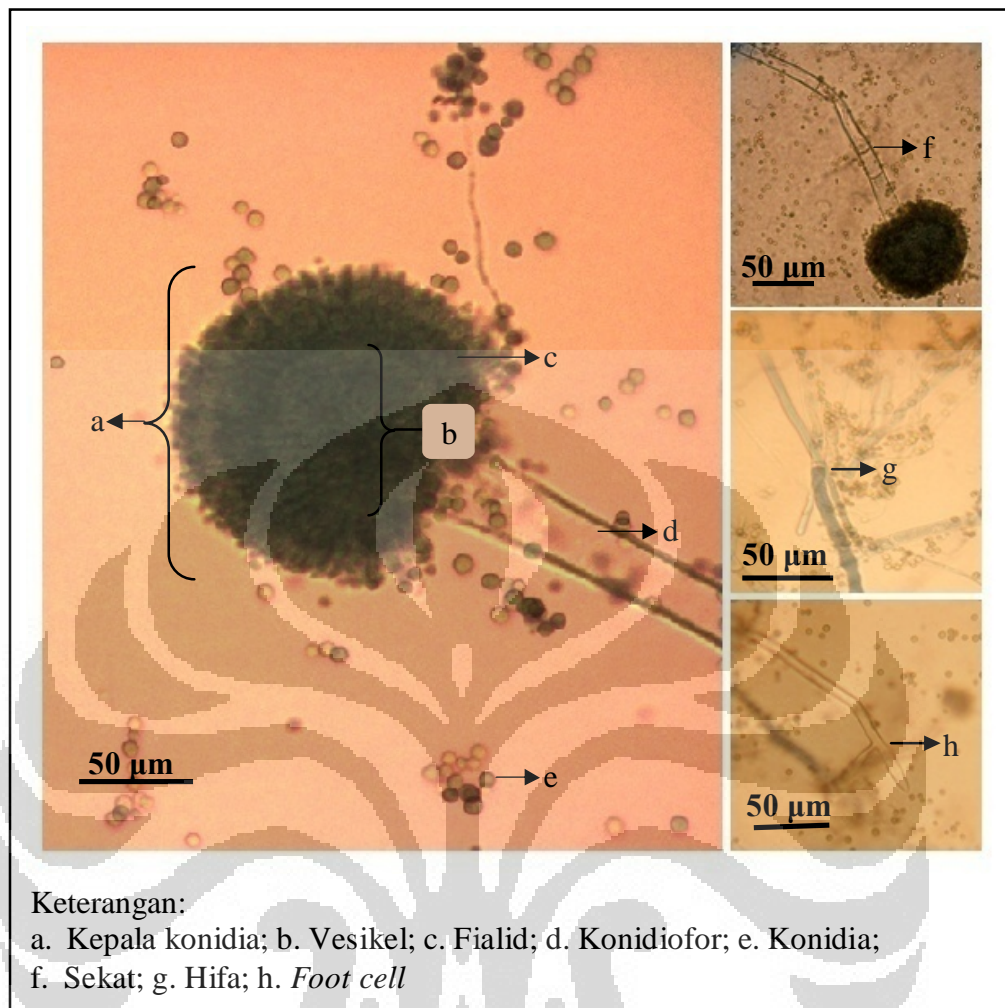


Keterangan:

(a) Tampak depan koloni; (b) Sebalik koloni

Gambar 4.1.(2). Hasil pengamatan makroskopik *Aspergillus flavus* UICC 360 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.1.(3). Hasil pengamatan mikroskopik *Aspergillus flavus* UICC 360 umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang
 [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

4.2. Pengamatan Morfologi Khamir

Khamir yang digunakan dalam pengujian aktivitas antifungi pada penelitian adalah *Candida albicans* UICC Y-29. Pengamatan karakter morfologi khamir meliputi pengamatan morfologi secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan karakter morfologi dilakukan pada biakan *Candida albicans* UICC Y-29 berumur 2 hari, pada medium YMA di suhu ruang. Pengamatan dilakukan untuk mencocokkan karakteristik morfologi *C. albicans* UICC Y-29 dengan

karakteristik spesies tersebut yang tercantum dalam “The Yeast, a taxonomic study” berdasarkan Kurtzman & Fell (1998).

Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik dari *Candida albicans* UICC Y-29 adalah sebagai berikut: koloni berwarna putih, permukaan mengilap, tekstur seperti mentega (*butyrous*), tepi koloni lurus dan profil koloni menggunung. Hasil pengamatan makroskopik sesuai dengan *C. albicans* pada monograf khamir oleh Kurtzman & Fell (1998) dalam *The Yeast, a Taxonomic Study*. *Candida albicans* yang ditumbuhkan pada medium *Corn Meal Agar* (CMA) memperlihatkan koloni berwarna putih hingga krem, tekstur seperti mentega (*butyrous*), dan permukaan koloni menggunung (Meyer: 1998) (lihat Kurtzman & Fell 1998: 478). Hasil pengamatan makroskopik *Candida albicans* UICC Y-29 dapat dilihat pada Tabel 4.2. dan Gambar 4.2.(1) dan 4.2.(2).

Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dari *Candida albicans* UICC Y-29 menunjukkan bahwa sel *C. albicans* UICC Y-29 berbentuk elips (lonjong) dengan kisaran ukuran sel (4,0--6,0) x (5,0--9,0) μm yang diperoleh dari pengukuran terhadap 20 sel. Khamir tersebut memiliki tipe pertunasan multipolar. Menurut Meyer (1998), ukuran sel vegetatif khamir *C. albicans* berumur 2 hari berkisar (3,5--6,0) x (4,0--8,0) μm (lihat Kurtzman & Fell 1998: 478). Hasil pengamatan mikroskopik khamir *Candida albicans* UICC Y-29 dapat dilihat pada Tabel 4.2. dan Gambar 4.2.(3).

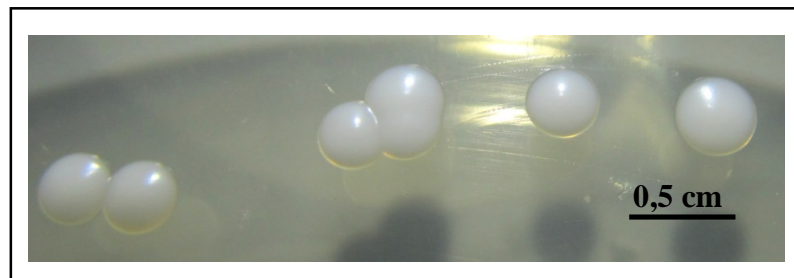
Tabel 4.2. Hasil pengamatan makroskopik dan mikroskopik *Candida albicans* UICC Y-29 umur 2 hari pada medium YMA di suhu ruang

Karakter Morfologi	Keterangan
Makroskopik	
a. Warna koloni	Putih
b. Permukaan	Mengilap
c. Tekstur	Mentega (<i>butyrous</i>)
d. Tepi koloni	Lurus
e. Profil koloni	Menggunung
Mikroskopik	
a. Bentuk sel	Elips (lonjong)
b. Ukuran sel	(4,0--6,0) x (5,0--9,0) μm
c. Pola pertunasan	Multipolar
d. Miselium semu/sejati	Tidak ada



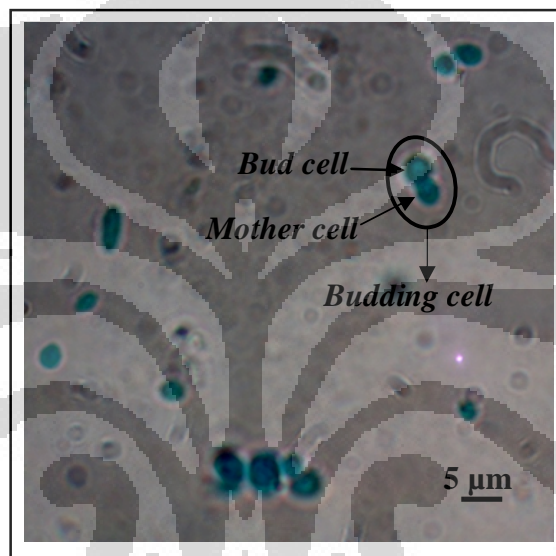
Gambar 4.2.(1). *Stock culture Candida albicans* UICC Y-29 pada medium YMA umur 7 hari di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.2.(2). Morfologi secara makroskopik *Candida albicans* UICC Y-29 umur 7 hari pada medium YMA di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.2.(3). Morfologi sel khamir *Candida albicans* UICC Y-29 umur 7 hari pada medium YMA di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

4.3. Enumerasi Hifa dan Konidia Kapang

Enumerasi hifa dan konidia kapang dilakukan menggunakan medium PDA dengan metode *Total Plate Count* (TPC) untuk mengetahui jumlah sel yang hidup. Jumlah hifa dan konidia kapang yang diinokulasikan memengaruhi keberhasilan kapang dalam menghasilkan antifungi. Hasil perhitungan hifa dan konidia menunjukkan bahwa jumlah hifa dan konidia kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 berumur 2 hari berkisar $(1,33--2,58) \times 10^7$ CFU/ml (Tabel 4.3). Jumlah $(1,33--2,58) \times 10^7$ CFU/ml diperkirakan cukup sebagai inokulum dalam fermentasi metabolit sekunder dari *Aspergillus flavus* UICC 360. Hajjaj *dkk.* (2001: 2596)

menggunakan hifa dan konidia kapang 10^7 CFU/ml pada fermentasi *Aspergillus terreus* dalam menghasilkan lovastatin.

Tabel 4.3. Hasil enumerasi hifa dan konidia *Aspergillus flavus* UICC 360 pada medium PDA dalam suhu ruang

Pengenceran	Pengulangan	Jumlah spora (CFU)	Rerata jumlah spora (CFU/ml)	Kisaran jumlah spora (CFU/ml)	Standar Deviasi
10^{-4}	1	272	$2,58 \times 10^7$		
	2	229			
	3	275			
10^{-5}	1	16	$2,23 \times 10^7$	$(1,33--2,58) \times 10^7$	$\pm 0,645$
	2	27			
	3	24			
10^{-6}	1	1	$1,33 \times 10^7$		
	2	2			
	3	1			

Konsentrasi inokulum yang diinokulasikan ke dalam medium fermentasi sebesar 1,96% (v/v) dengan waktu inkubasi selama 7 hari. Konsentrasi inokulum tersebut diperkirakan cukup baik untuk mendukung pertumbuhan hifa dan konidia *Aspergillus flavus* UICC 360 di dalam medium fermentasi. Konsentrasi inokulum yang semakin besar akan menyebabkan kompetisi hifa dan konidia *Aspergillus flavus* UICC 360 dalam memperoleh nutrisi dari medium semakin besar. Inokulum berisi hifa dan konidia *Aspergillus flavus* UICC 360 memanfaatkan nutrisi di dalam medium selama fase pertumbuhan (fase log) dalam melakukan proses metabolisme primer untuk menghasilkan metabolit primer berupa karbohidrat, lipid, protein dan asam nukleat yang dibutuhkan sebagai *building block*. Kompetisi yang semakin besar dalam memanfaatkan nutrisi menyebabkan penyerapan nutrisi oleh hifa dan konidia menjadi terbatas dan tidak optimal sehingga pertumbuhan hifa dan konidia *Aspergillus flavus* UICC 360 akan terhambat. Pertumbuhan hifa dan konidia yang terhambat akan menyebabkan proses metabolisme sekunder pada fase stasioner juga terhambat sehingga metabolit sekunder yang dihasilkan pada proses tersebut tidak optimal.

Sebaliknya, inokulum berisi hifa dan konidia *Aspergillus flavus* UICC 360 yang terlalu sedikit menyebabkan ketersediaan nutrisi dalam medium melimpah.

Hal tersebut menyebabkan proses degradasi molekul-molekul kompleks oleh hifa dan konidia *Aspergillus flavus* UICC 360 pada metabolisme primer dalam menghasilkan metabolit primer berlangsung lama. Metabolisme primer yang berlangsung lama menyebabkan hifa dan konidia kapang terhambat dalam memasuki metabolisme sekunder karena proses metabolisme sekunder kapang dimulai ketika proses metabolisme primer telah selesai dilakukan oleh kapang. Metabolisme sekunder kapang yang terhambat menyebabkan pembentukan metabolit sekunder pada proses tersebut tidak optimal. Menurut Bhatiya & Jadeja (2010: 597--598), konsentrasi inokulum yang semakin besar menyebabkan kompetisi dalam memperoleh nutrisi semakin besar. Menurut Jozegai *dkk.* (2011: 225), inokulum yang terlalu sedikit menyebabkan melimpahnya nutrisi yang tersedia sehingga mikroorganisme membutuhkan waktu yang lebih banyak dalam mendegradasi molekul-molekul kompleks pada proses metabolisme primer.

Inkubasi dilakukan selama 7 hari karena diperkirakan pada waktu tersebut *Aspergillus* telah memasuki fase stasioner dan telah menghasilkan metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder banyak dihasilkan pada fase stasioner, sedangkan pada waktu inkubasi yang lebih lama diperkirakan fungi telah memasuki fase kematian dan mengalami kehabisan nutrisi. Chanakya *dkk.* (2011: 10), melaporkan bahwa produksi lovastatin oleh *Aspergillus fischeri* optimal pada waktu inkubasi selama 7 hari, dan setelah 7 hari produksi lovastatin mengalami penurunan.

4.4 Enumerasi Sel Khamir

Hasil perhitungan sel menunjukkan bahwa jumlah sel khamir *Candida albicans* UICC Y-29 umur 2 hari pada medium YMA di suhu ruang berkisar $(2,28--3,67) \times 10^8$ CFU/ml (Tabel 4.4). Jumlah inokulum tersebut diperkirakan cukup untuk digunakan dalam pengujian antifungi. Menurut Benson (2001: 145), salah satu faktor yang memengaruhi efektivitas senyawa antifungi adalah konsentrasi organisme uji yang diinokulasikan ke dalam medium. Menurut (Hewitt 2005: 65), jumlah minimal sel khamir yang dapat digunakan untuk pengujian antifungi adalah sebanyak 10^8 CFU/ml atau 10^9 CFU/ml.

Tabel 4.4 Hasil enumerasi sel khamir *Candida albicans* UICC Y-29 pada medium YMA dalam suhu ruang

Pengenceran	Pengulangan	Jumlah sel (CFU)	Rerata jumlah sel (CFU/ml)	Kisaran jumlah sel (CFU/ml)	Standar Deviasi
10^{-5}	1	226	$2,28 \times 10^8$		
	2	214			
	3	245			
10^{-6}	1	22	$3,1 \times 10^8$	$(2,28--3,67) \times 10^8$	$\pm 0,70$
	2	24			
	3	47			
10^{-7}	1	7	$3,67 \times 10^8$		
	2	2			
	3	2			

4.5. Fermentasi Senyawa Anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360

4.5.1. Warna Medium Setelah Fermentasi

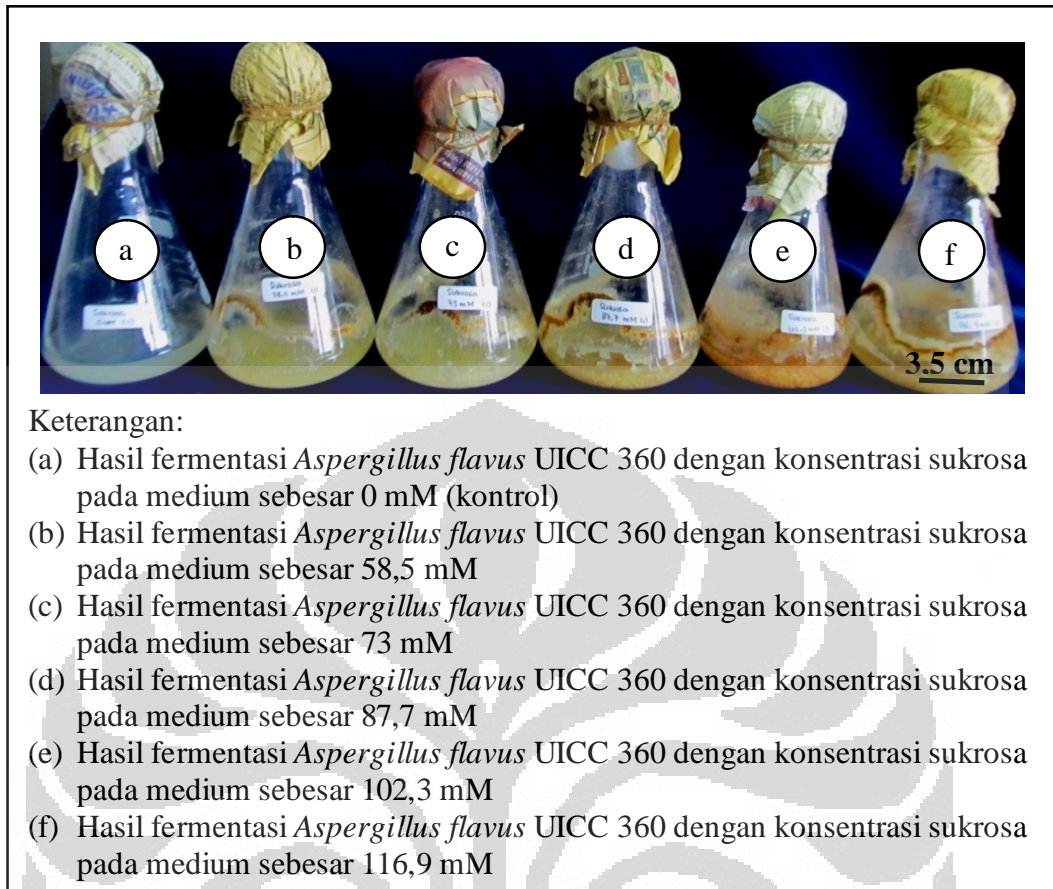
Medium fermentasi berwarna putih sebelum diinokulasikan inokulum kapang, namun setelah diinokulasikan inokulum kapang dan difermentasi selama 7 hari, terjadi perubahan warna pada medium. Perubahan warna pada medium dilakukan dengan mencocokkan warna medium dengan tabel warna Castell-Polychromos No.9216 (Lampiran 2). Warna medium setelah fermentasi mulai dari putih kekuningan sampai merah merona, kecuali pada medium dengan konsentrasi sukrosa 0 mM yang tidak mengalami perubahan warna (Tabel 4.5.1. dan Gambar 4.5.1).

Perubahan warna pada medium kemungkinan disebabkan pigmen yang dihasilkan oleh kapang *Aspergillus flavus* UICC 360. Pigmen merupakan salah satu metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang. Menurut Hua *dkk.* (1999: 2738) dan Hui *dkk.* (2009: 122), *Aspergillus flavus* menghasilkan pigmen orange kemerahan, yang merupakan senyawa perantara pada biosintesis aflatoksin. Lim *dkk.* (2000: 48) melaporkan bahwa pigmen orange yang dihasilkan pada genus *Monascus* merupakan pigmen monascorubin dan rubropunctatin, sedangkan pigmen merah merupakan pigmen monascorubranmin dan rubropunctamine. Lu

dkk. (2010: 513) melaporkan bahwa pigmen merah hasil metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *Aspergillus ochraceus* merupakan emodin.

Tabel 4.5.1. Hasil pengamatan warna medium serta warna miselium dan jumlah miselium setelah fermentasi selama 7 hari

Konsentrasi sukrosa dalam medium	Ulangan	Warna medium	Miselium	
			Jumlah	Warna
Kontrol	1	Putih kekuningan	-	
	2	Putih kekuningan	-	-
	3	Putih kekuningan	-	
58,5 mM	1	Hartal	+	
	2	Hartal emas	+	Putih-cokelat jangat
	3	Hartal	+	
73 mM	1	Hartal	++	
	2	Hartal	++	Putih-cokelat jangat
	3	Merah marak	++++	
87,7 mM	1	Hartal emas	+++	
	2	Hartal	+++	Putih-cokelat jangat
	3	Hartal coklat	+++	
102,3 mM	1	Merah merona	++++	
	2	Merah merona	++++	Putih-cokelat jangat
	3	Jingga	++++	
116,9 mM	1	Hartal emas	+++++	
	2	Hartal coklat	+++++	Putih-cokelat jangat
	3	Hartal coklat	+++++	



Gambar 4.5.1. Warna medium setelah fermentasi

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

4.5.2. pH Medium Setelah Fermentasi

pH awal medium sebelum diinokulasikan dengan kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 diukur menggunakan kertas pH universal. Hasil pengukuran menunjukkan pH medium adalah $\pm 7,0$. Menurut Griffin (1981: 162), sebagian besar kapang tumbuh baik pada pH 4--7. Pengukuran pH medium sebelum dan sesudah fermentasi dapat dilihat pada Tabel 4.5.2.

Tabel 4.5.2. Data pengukuran pH medium

Medium dengan konsentrasi sukrosa	pH awal	pH akhir
0 mM	7,0	8,0
58,5 mM	7,0	9,0
73 mM	7,0	8,0
87,7 mM	7,0	8,0
102,3 mM	7,0	6,0
116,9 mM	7,0	8,0

Pengukuran pH setelah fermentasi selama 7 hari menunjukkan kenaikan pH berkisar 8,0--9,0. Sumber nitrogen yang digunakan dalam penelitian adalah natrium nitrat (NaNO_3). Penggunaan nitrat sebagai sumber nitrogen menyebabkan pH medium mengalami kenaikan karena dihasilkannya ion OH^- . Nitrat harus diubah terlebih dahulu oleh sel ke dalam bentuk ammonium (NH_3) agar dapat digunakan. Pada proses tersebut nitrat (NO_3^-) terlebih dahulu diubah menjadi nitrit (NO_2^-) dengan bantuan enzim nitrat reduktase. Nitrit (NO_2^-) kemudian diubah menjadi ammonium (NH_3) dengan bantuan enzim nitrit reduktase. Proses perubahan nitrat (NO_3^-) menjadi ammonium (NH_3) dilakukan dengan menggunakan ion H^+ pada medium dan pada akhir reaksi dihasilkan ion OH^- yang menyebabkan kenaikan pH pada medium fermentasi. Proses kenaikan pH akibat perubahan nitrat menjadi ammonium dilaporkan oleh Deacon (2006: 118) dan George *dkk.* (2008: 69--70).

Medium dengan konsentrasi sukrosa sebesar 102,3 mM mengalami penurunan pH dari 7,0 menjadi 6,0. Hal tersebut kemungkinan disebabkan terakumulasinya asam-asam organik pada akhir fermentasi sehingga menyebabkan penurunan pH medium. Menurut Deacon (2006: 12), asam-asam organik dihasilkan fungi melalui fermentasi, asam-asam organik tersebut menyebabkan pH menjadi asam.

4.6. Penimbangan biomassa

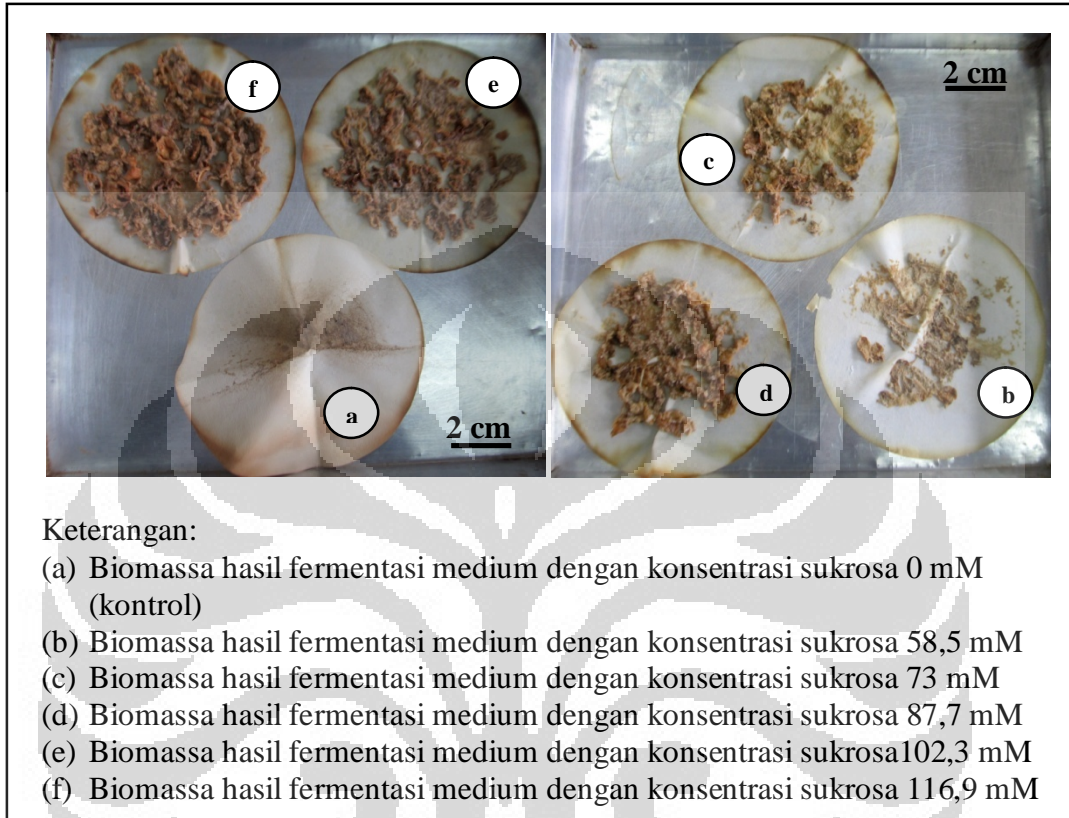
Hasil penimbangan biomassa kering miselium menunjukkan terjadi peningkatan miselium yang dihasilkan seiring dengan peningkatan konsentrasi sukrosa dalam medium. Biomassa terendah yang dapat dihasilkan tanpa adanya sukrosa sebagai sumber karbon pada medium adalah 2,12 g/L pada konsentrasi 0 mM, dan biomassa tertinggi yang dihasilkan adalah 9,35 g/L pada konsentrasi 116,9 mM. Hasil penimbangan biomassa miselium kapang dapat dilihat pada Tabel 4.6 dan Gambar 4.6.(1) dan 4.6.(2).

Tabel 4.6. Hasil penimbangan biomassa kering miselium *Aspergillus flavus* UICC 360

Ekstrak	Biomassa (g/L)
0 mM	2,12
58,5 mM	5,14
73 mM	6,11
87,7 mM	7,577
102,3 mM	7,578
116,9 mM	9,35

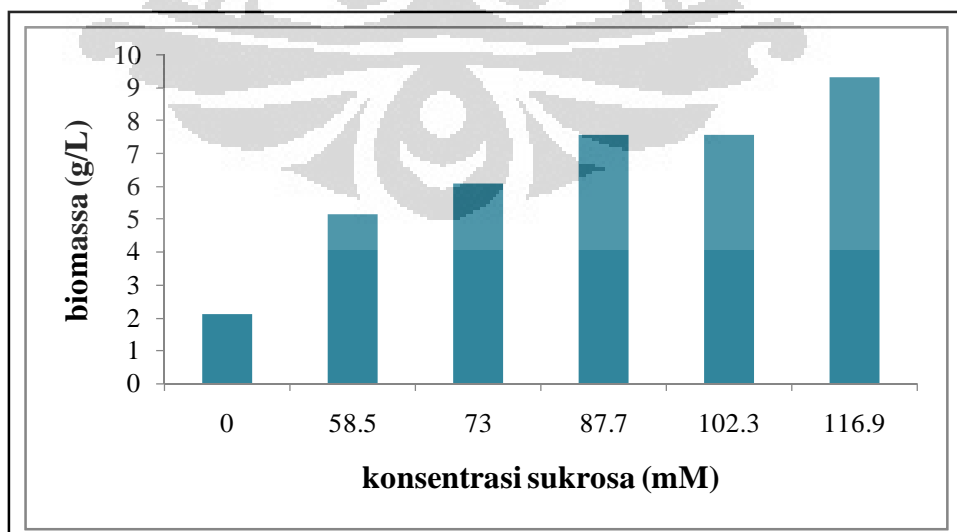
Peningkatan biomassa tersebut kemungkinan disebabkan sumber karbon yang terdapat pada medium. Menurut Losada *dkk.* (2009: 1), spesies *Aspergillus* menghasilkan metabolit sekunder ketika pertumbuhannya selesai atau terdapat kehadiran spesies fungi lain. Metabolit sekunder tersebut berhubungan dengan pertumbuhan dan perkembangan fungi. Sumber karbon merupakan *building block* untuk pembentukan hifa. Oleh karena itu, jika konsentrasi sukrosa dalam medium besar, maka biomassa yang dihasilkan tinggi, sebaliknya jika konsentrasi sukrosa dalam medium rendah maka biomassa yang dihasilkan rendah pula. Menurut Hajjaj *dkk.* (2001: 2597), sumber karbon yang tersedia pada medium digunakan oleh kapang untuk pembentukan massa sel dan metabolit sekunder. Peningkatan

konsentrasi sukrosa pada medium mengakibatkan peningkatan produksi miselium juga ditunjukkan pada fermentasi asam sitrat oleh *Aspergillus niger* ATCC 9142 (Kiel *dkk.* 1981: 3).



Gambar 4.6.(1). Biomassa kering miselium hasil fermentasi

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.6.(2). Histogram penimbangan biomassa kering miselium

4.7. Ekstraksi

Ekstraksi senyawa anti-*Candida albicans* dilakukan berdasarkan penelitian pendahuluan oleh Rafliyanti (2010: 11), menggunakan pelarut etil asetat yang bersifat semipolar. Pemilihan pelarut yang digunakan disebabkan sifat kepolaran dari senyawa anti-*Candida albicans* yang dihasilkan *Aspergillus flavus* UICC 360 diduga bersifat semipolar, sehingga terjadi interaksi antara senyawa dengan etil asetat sebagai pelarutnya. Interaksi yang terjadi tersebut disebabkan kesamaan tingkat kepolaran. Hasil ekstraksi berupa ekstrak cair. Ekstrak cair kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut yang telah mengikat senyawa metabolit, sehingga diperoleh ekstrak murni metabolit. Menurut Brooks (1974: 117), senyawa kimia akan terlarut dalam pelarut yang memiliki sifat kepolaran yang sesuai dengan senyawa tersebut. Menurut Khopkar (2002: 86--87), pelarut polar akan melarutkan senyawa polar, dan pelarut nonpolar akan melarutkan senyawa nonpolar.



Gambar 4.7. Ekstrak murni hasil evaporasi

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

4.8. Pengujian Aktivitas Anti-*Candida albicans* dari Ekstrak Kapang dengan Metode Paper Disk Assay

Pengujian aktivitas ekstrak senyawa anti-*Candida albicans* kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 dilakukan dengan metode *Paper Disk Assay*. Pengujian dilakukan pada ekstrak kontrol, E1, E2, E3, E4, dan E5. Hasil pengujian menunjukkan ekstrak E1, E2, E3, E4, dan E5 dalam etil asetat memiliki aktivitas anti-*Candida albicans*, sedangkan ekstrak kontrol tidak menunjukkan

adanya aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans* UICC Y-29. Hasil pengamatan uji aktivitas anti-*Candida albicans* dapat dilihat pada Tabel 4.8.(1).

Aktivitas anti-*Candida albicans* dari pengujian ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekeliling kertas cakram yang mengandung ekstrak senyawa antifungi dari kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 dalam etil asetat. Zona hambat yang terbentuk menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung senyawa metabolit sekunder berupa senyawa anti-*Candida albicans* yang berdifusi ke dalam medium agar dan membunuh mikroorganisme uji yang terkandung di dalamnya. Hal tersebut ditunjukkan dengan daerah jernih yang terbentuk di sekeliling kertas cakram, yang mengindikasikan tidak terdapat pertumbuhan *Candida albicans* hingga masa inkubasi selama 2 hari. Menurut Rafliyanti (2010: 16), *Aspergillus flavus* UICC 360 menghasilkan metabolit sekunder berupa lovastatin yang dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans* UICC Y-29. Kumar dkk. (2000: 100) menyatakan bahwa lovastatin dalam bentuk β -hidroksi menunjukkan kemampuan antifungi terhadap *Rhodotorula rubra*, *Mucor racemosus*, dan *Neurospora crassa*.

Tabel 4.8.(1) Hasil pengujian aktivitas antifungi ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 dengan *Paper Disk Assay Method* terhadap *Candida albicans* UICC Y-29, inkubasi selama 48 jam di suhu ruang

Ekstrak	Pengulangan	<i>C. albicans</i>		
		+/-	Diameter (mm)	Diameter rata-rata (mm)
Kontrol	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
E1	1	+	2,5	3,50 ± 0,87
	2	+	4,0	
	3	+	4,0	
E2	1	+	5,0	5,16 ± 0,76
	2	+	6,0	
	3	+	4,5	
E3	1	+	7,5	6,17 ± 1,15
	2	+	5,5	
	3	+	5,5	
E4	1	+	6,5	8,33 ± 1,61
	2	+	9,5	
	3	+	9,0	
E5	1	+	7,0	7,50 ± 1,32
	2	+	9,0	
	3	+	6,5	

Keterangan:

+ : terbentuk zona hambat - : tidak terbentuk zona hambat

Kontrol : Ekstrak *A. flavus* (0 mM dalam etil asetat)

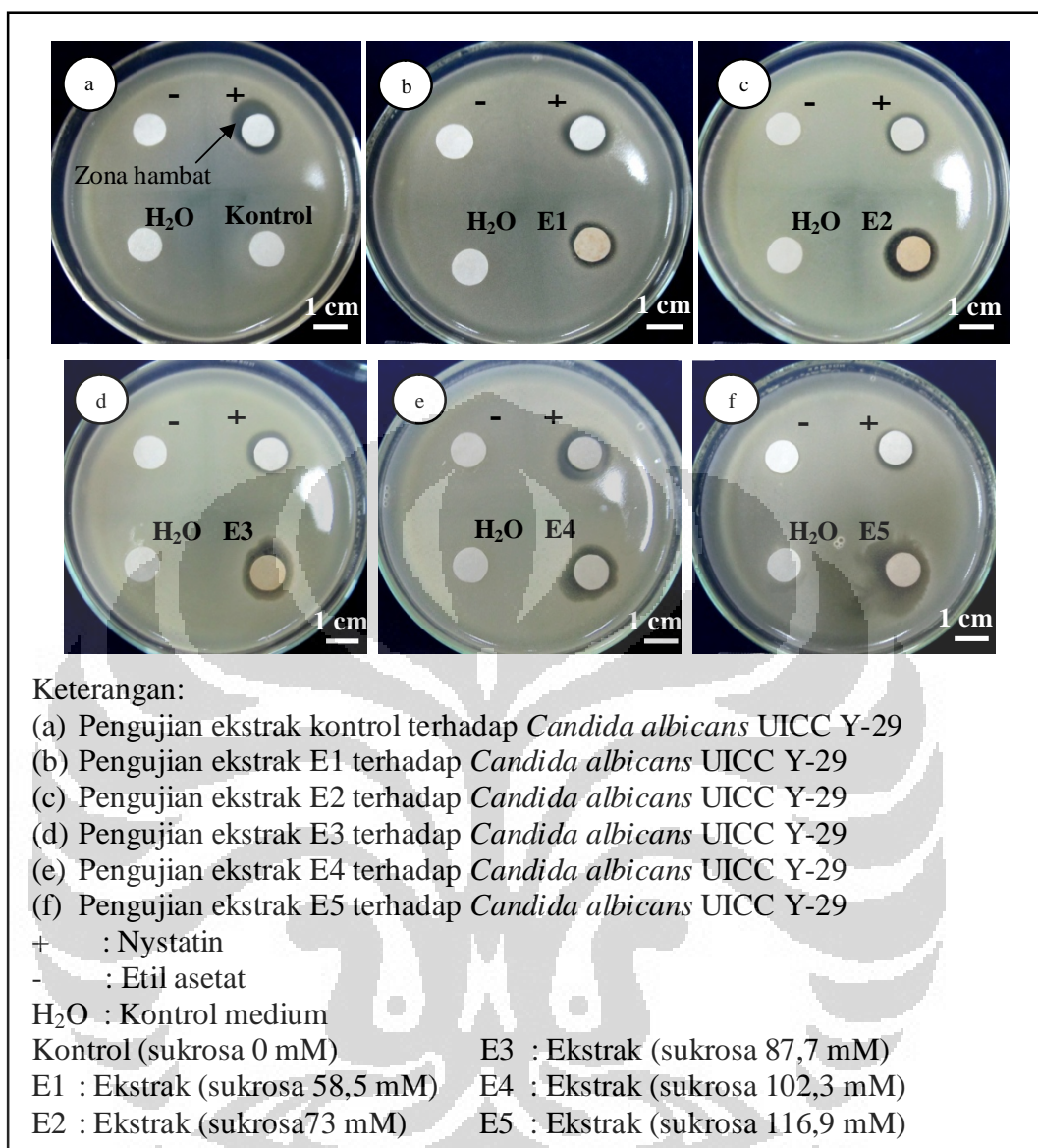
E1 : Ekstrak *A. flavus* (58,5 mM dalam etil asetat)

E2 : Ekstrak *A. flavus* (73 mM dalam etil asetat)

E3 : Ekstrak *A. flavus* (87,7 mM dalam etil asetat)

E4 : Ekstrak *A. flavus* (102,3 mM dalam etil asetat)

E5 : Ekstrak *A. flavus* (116,9 mM)



Gambar 4.8.(1). Hasil pengujian aktivitas anti-*Candida albicans* dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 dengan berbagai konsentrasi sukrosa pada medium fermentasi, inkubasi 48 jam di suhu ruang

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Zona hambat yang terbentuk pada ekstrak yang mengandung senyawa anti-*Candida albicans* merupakan zona hambat total dan diduga tidak terdapat pertumbuhan di sekitar *paper disk*. Zona hambat total diperlihatkan dengan daerah jernih di sekeliling kertas cakram. Hal tersebut mengindikasikan bahwa kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 menghasilkan senyawa anti-*Candida albicans* yang bersifat fungisidal, atau memiliki kemampuan membunuh *Candida*

albicans sehingga tidak terdapat lagi pertumbuhan sel. Menurut Poeloengan (2009: 65--66), zona hambat total menunjukkan bahwa senyawa antimikroba yang dihasilkan mampu membunuh mikroorganisme, terlihat dari daerah jernih di sekeliling kertas cakram, sedangkan zona hambat parsial menunjukkan bahwa senyawa antimikroba bersifat menghambat pertumbuhan mikroorganisme, bukan membunuhnya, terlihat dari daerah yang keruh di sekitar kertas cakram. Menurut Carlile *dkk.* (2001: 179), fungisidal merupakan senyawa yang daya kerjanya bersifat mematikan sel.

Mekanisme penghambatan yang dilakukan oleh senyawa anti-*Candida albicans* yang dihasilkan *Aspergillus flavus* UICC 360 belum diketahui, namun diperkirakan mekanisme penghambatan yang terjadi serupa dengan mekanisme penghambatan oleh agen antifungi yang diketahui dapat menghambat pertumbuhan *C. albicans*, contohnya nystatin. Menurut Nedal *dkk.* (2007: 7400), nystatin menyebabkan kerusakan membran sel khamir, yang disebabkan oleh kebocoran dari komponen internal seperti K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan PO_4^- , serta diikuti oleh penghambatan terhadap glikolisis dan sintesis protein sehingga menyebabkan kematian sel.

Kontrol positif yang digunakan dalam pengujian aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans* adalah senyawa antifungi nystatin dengan konsentrasi 1.000 ppm. Diameter zona hambat rata-rata nystatin terhadap *C. albicans* lebih besar jika dibandingkan ekstrak kontrol, E1 dan E2 dalam etil asetat, namun lebih kecil jika dibandingkan dengan ekstrak E3, E4, dan E5, yaitu berukuran $5,5 \pm 0,131$ mm. Menurut Hogg (2005: 362), nystatin merupakan agen antifungi golongan polyene yang akan berikatan dengan sterol dan membentuk pori. Pori tersebut akan mengganggu integritas membran sel target dan menyebabkan kebocoran elektrolit seperti ion K^+ .

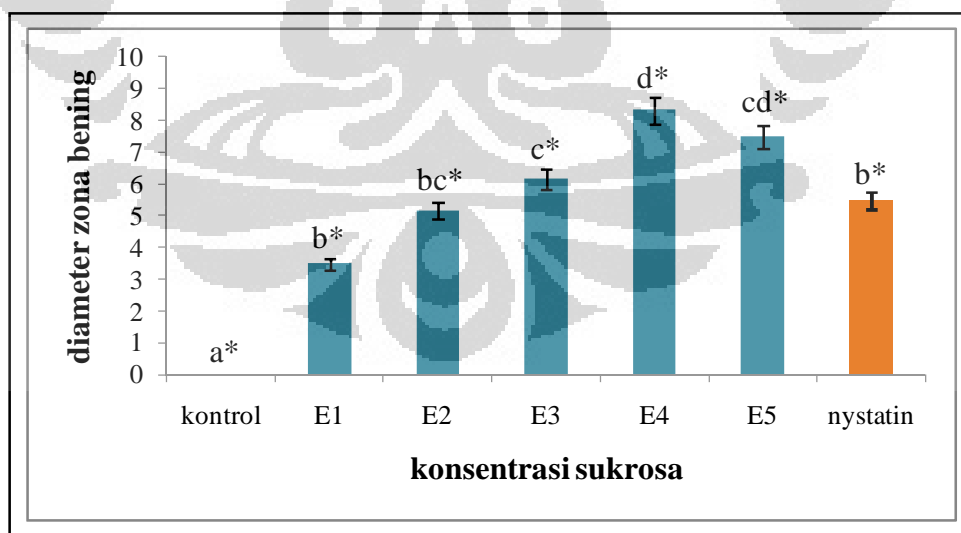
Hasil pengujian ekstrak kontrol dari *Aspergillus flavus* UICC 360 tidak menunjukkan aktivitas antifungi terhadap khamir *C. albicans* UICC Y-29. Hal tersebut terlihat dari tidak terbentuknya zona hambat di sekitar kertas cakram dan mengindikasikan bahwa ekstrak kontrol tidak memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan maupun membunuh mikroorganisme uji yaitu khamir *C. albicans*. Aktivitas anti-*Candida albicans* hanya terlihat pada daerah di sekitar

kertas cakram yang mengandung nystatin 1.000 ppm. Diduga ekstrak kontrol dari *Aspergillus flavus* UICC 360 tidak menghasilkan senyawa anti-*Candida albicans* atau menghasilkan dalam jumlah yang sangat sedikit sehingga tidak berhasil diekstraksi menggunakan pelarut organik.

Tabel 4.8.(2). Konsentrasi ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 yang disetarakan dengan konsentrasi antifungi nystatin berdasarkan perbandingan zona hambat

	Pengulangan	Diameter (mm)	Diameter rata-rata (mm)	Konsentrasi
Nystatin	1	4,0	5,5 ± 0,131	1.000 ppm
	2	5,0		
	3	7,5		
Kontrol	1	-	-	0 ppm
	2	-		
	3	-		
E1	1	2,5	3,50 ± 0,87	636,5 ppm
	2	4,0		
	3	4,0		
E2	1	5,0	5,16 ± 0,76	938,1 ppm
	2	6,0		
	3	4,5		
E3	1	7,5	6,17 ± 1,15	1.122,3 ppm
	2	5,5		
	3	5,5		
E4	1	6,5	8,33 ± 1,61	1.515,2 ppm
	2	9,5		
	3	9,0		
E5	1	7,0	7,50 ± 1,32	1.364,3 ppm
	2	9,0		
	3	6,5		

Diameter zona hambat rata-rata ekstrak E1 dalam etil asetat adalah $3,50 \pm 0,87$ mm. Aktivitas anti-*Candida albicans* ekstrak E1 dalam etil asetat setara dengan aktivitas antibiotik nystatin dengan konsentrasi 636,5 ppm. Diameter zona hambat rata-rata ekstrak E2 dalam etil asetat adalah $5,16 \pm 0,76$ mm. Aktivitas anti-*Candida albicans* ekstrak E2 dalam etil asetat setara dengan aktivitas antibiotik nystatin dengan konsentrasi 938,1 ppm. Diameter zona hambat rata-rata ekstrak E3 dalam etil asetat adalah $6,17 \pm 1,15$ mm. Aktivitas anti-*Candida albicans* ekstrak E3 dalam etil asetat setara dengan aktivitas antibiotik nystatin dengan konsentrasi 1.122,3 ppm. Diameter zona hambat rata-rata ekstrak E4 dalam etil asetat adalah $8,33 \pm 1,61$ mm. Aktivitas anti-*Candida albicans* ekstrak E4 dalam etil asetat setara dengan aktivitas antibiotik nystatin dengan konsentrasi 1.515,2 ppm. Diameter zona hambat rata-rata ekstrak E5 dalam etil asetat adalah $7,50 \pm 1,32$ mm. Aktivitas anti-*Candida albicans* ekstrak E5 dalam etil asetat setara dengan aktivitas antibiotik nystatin dengan konsentrasi 1.364,3 ppm. Berdasarkan ukuran diameter zona hambat yang terbentuk, ekstrak E3, E4, dan E5 dalam etil asetat memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans* dibandingkan dengan ekstrak E1 dan E2 dalam etil asetat.



Keterangan:

* Huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan nyata ($P > 0,05$)

Gambar 4.8.(2). Histogram diameter zona hambat yang dihasilkan dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 dibandingkan dengan nystatin

Setiap konsentrasi sukrosa yang terdapat pada medium memberikan hasil yang berbeda terhadap aktivitas anti-*Candida albicans* yang dihasilkan *Aspergillus flavus* UICC 360. Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$) terhadap data diameter zona hambat menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ($P > 0,05$) (Lampiran 9). Hasil uji homogenitas Levene ($\alpha = 0,05$) terhadap diameter zona hambat ($\alpha = 0,05$) menunjukkan bahwa data bervariasi homogen ($p < 0,05$) (Lampiran 10). Hasil uji Anava 1-faktor ($\alpha = 0,05$) menunjukkan terdapat perbedaan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ($P > 0,05$) (Lampiran 11). Hasil uji perbandingan berganda *Least Significance Difference* (LSD) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata pada diameter zona hambat antara nystatin dengan kontrol dan ekstrak. Berdasarkan histogram (Gambar 4.8.(2)), diketahui aktivitas anti-*Candida albicans* terbesar terdapat pada ekstrak E4, yaitu dengan menghasilkan zona hambat sebesar 8,33 mm meskipun tidak berbeda nyata dengan E5. Data kontrol tidak menunjukkan adanya diameter zona hambat sehingga berbeda nyata dengan perlakuan dan nystatin. Data E1, E2, dan nystatin menunjukkan diameter zona hambat yang tidak berbeda nyata, yaitu 3,50, 5,16 dan 5,50. Berdasarkan data yang diperoleh, rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan semakin meningkat dari E1 hingga E4, selanjutnya mengalami penurunan pada E5.

Penelitian ini memberikan hasil bahwa terdapat pengaruh konsentrasi sukrosa yang terdapat dalam medium fermentasi dengan aktivitas anti-*Candida albicans*. Ekstrak E4 (sukrosa 102,3 mM) menunjukkan aktivitas tertinggi dalam menghasilkan senyawa anti-*Candida albicans*, ditunjukkan dengan diameter zona hambat terbesar dibandingkan ekstrak lain.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Terdapat pengaruh konsentrasi sukrosa 0 mM, 58,5 mM, 73 mM, 87,7 mM, 102,3 mM dan 116,9 mM terhadap aktivitas anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360, yaitu meningkatkan aktivitas anti-*Candida albicans* pada konsentrasi sukrosa 0 mM sampai dengan 102,3 mM.
2. Ekstrak E4 (sukrosa 102,3 mM) menunjukkan aktivitas anti-*Candida albicans* terbesar dari *Aspergillus flavus* UICC 360, dengan diameter zona hambat yang terbentuk pada pengujian menggunakan metode *Paper Disk Assay* sebesar $8,33 \text{ mm} \pm 1,61$ (setara dengan aktivitas antifungi nystatin 1.515,2 ppm).

5.2. Saran

1. Perlu dilakukan analisis kimia senyawa anti-*Candida albicans* untuk mengetahui senyawa antifungi yang dihasilkan dari *Aspergillus flavus* UICC 360.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh nutrisi lain dalam medium CDB dalam menghasilkan antifungi dari *Aspergillus flavus* UICC 360.

DAFTAR REFERENSI

- Alexopoulos, C. J., C. W. Mims, & M. Blackwell. 1996. *Introductory mycology*. John Wiley & Sons, Inc. Canada: x + 487 hlm.
- Arikan, S., L. O. Zeichner, M. L. Chiu, V. Paetznick, D. Gordon, T. Wallace, & J. H. Rex. 2002. In vitro activity of nystatin compared with those of liposomal nystatin, amphotericin B, and fluconazole against clinical *Candida* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **4**(40): 1406--1412.
- Atalla, M. M., Hamed, E. R. & A. R. El-Shami. 2008. Optimization of culture medium for increased mevinolin production by *Asp. terreus* strain. *Malaysian Journal of Microbiology* **4**(2): 6--10.
- Atlas, R. M. 2010. *Handbook of microbial media*. CRC Press Inc., Florida: vi + 2036 hlm.
- Barnett, J. A., R. W. Payne, D. Yarrow, & L. Barnett. 2000. *Yeast: Characteristic and identification*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge: 1150 hlm.
- Bennett, J. W. & Klich, M. A. 1992. *Aspergillus: Biology and industrial applications*. Butterworth-Heinemann, Boston.
- Benson, H. J. 2001. *Microbiological application: Laboratory manual in general microbiology*. The MacGraw-Hills Company, Inc., New York: xi + 478 hlm.
- Bhatiya, R. & G. R. Jadeja. 2010. Optimization of environmental and nutritional factors for alkaline protease production. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* **9**(3): 594--599.
- Bhetariya, P. J., T. Madan, S. F. Basir, A. Varma, & S. P. Usha. 2011. Allergens/antigens, toxins and polyketides of important *Aspergillus* species. *Indian Journal Clinical Biochemistry* **26**(2): 104--119.
- Bilgrami, K. S. & R. N. Verma. 1978. *Physiology of fungi*. Vikas Publishing House PVT, Ltd., India: x + 507 hlm.
- Bizukojc, M. & S. Ledakowicz. 2004. The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Asp. niger* in citric acid fermentation. *Process Biochemistry* **39**: 2261--2268.

- Brooks, D. 1974. *Student's guide to chemistry, a modern introduction*. W. B. Saunders Company, Philadelphia: xvii + 233 hlm.
- Busi, S., P. Peddikotla, S. M. Upadyayula & V. Yenamandra. 2009. Isolation and biological evaluation of two bioactive metabolites from *Aspergillus gorakhpurensis*. *Records Natural Product* **3**(3): 161--164.
- Campbell, N. A., J. B. Reece, L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky, & R. B. Jackson. 2008. *Biology*. 8th ed. Pearson Benjamin Cummings Inc., San Fransisco: xlvi + 1267 hlm.
- Carlile, M. J. & S. C. Watkinson. 1994. *The fungi*. Academic Press, London: xiii + 482 hlm.
- Carlile, M. J. S. C. Watkinson, & G. W. Gooday. 2001. *The fungi*. Academic Press, California: xix + 588 hlm.
- Cannon, R. D, E. Lamping, A. R. Holmes, K. Niimi, K. Tanabe, M. Niimi, & B. C. Monk. 2007. *Candida albicans* drug resistance – another way to cope with stress. *Microbiology* **153**: 3211--3217.
- Cannon, R. D., E. Lamping, A. R. Holmes, K. Niimi, P. V. Baret, M. V. Keniya, K. Tanabe, M. Niimi, A. Goffeau, & B. C. Monk. 2009. Efflux mediated antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology reviews* **22**(2): 291--321.
- Chanakya, P., P. M. Latha, & M. Srikanth. 2011. Solid state fermentation fro the production of lovastatin by *Aspergillus fischeri*. *Resource Journal Pharmaceutical Science Biotechnology* **1**(1): 9--13.
- Cleveland, T. E., J. Yu, D. Bhatnagar, Z. Y. Chen, R. L. Brown, P. K. Chang & J. W. Cary. 2004. Progress in elucidating the molecular basis of the host plant-*Aspergillus flavus* interaction, a basis for devising strategies to reduce aflatoxin contamination in crops. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews* **23** (2): 345-380.
- Cochrane, V. W. 1958. *Physiology of fungi*. John Wiley & Sons, Inc., New York: xiii + 524 hlm.
- Deacon, J. W. 2006. *Fungal biology*. Blackwell publishing, Cornwall: iv + 371 hlm.
- Deak, T. 2008. *Handbook of food spoilage yeasts*. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton: xxii + 325 hlm.

- Ferron, M. A. V., J. L. C. Lopez, J. A. S. Perez, J. M. F. Sevilla, & Y. Chisti. 2005. Rapid screening of *Aspergillus terreus* mutans for overproduction of lovastatin. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **21**: 123--125.
- Fox, E. M. & B. J. Howlett. 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology* **11**: 481--487.
- Gandjar, I., I. R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. Jurusan Biologi FMIPA UI, Depok: vii + 87 hlm.
- Gandjar, I., R.A. Samson, K. Van den Twel Vermeulen, A. Oetari & I. Santoso. 1999. *Pengenalan kapang tropik umum*. Yayasan Obor, Jakarta: xiii + 136 hlm.
- Gandjar, I., W. Sjamsuridzal & A. Oetari. 2006. *Mikologi: Dasar dan terapan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: xii + 234 hlm.
- Georgopapadakou, N. H. 1998. Antifungal: mechanism of action and resistance, established and novel drug. *Current Opinion in Microbiology* **1**: 547--557.
- Glazer, A. N. & Nikkaido, H. 2007. *Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology*. 2nd ed. Cambridge University Press, UK: xix + 556 hlm.
- Goldman, G. H., M. E. S. Ferreira, E. R. Marques, M. Savoldi, D. Perlin, S. Park, P. C. G. Martinez, M. H. S. Goldman & A. L. Colombo. 2004. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **50**: 25--32.
- Griffin, D. H. 1981. *Fungal physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Kanada: vii + 383.
- Gupta, R., P. Gigras, H. Mohapatra, V. K. Goswami & B. Chauhan. 2003. Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochemistry* **38**: 1599--1616.
- Hajjaj, H., P. Niederberger & P. Duboc. 2001. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *American Society for Microbiology* **67** (6): 2569--2602.

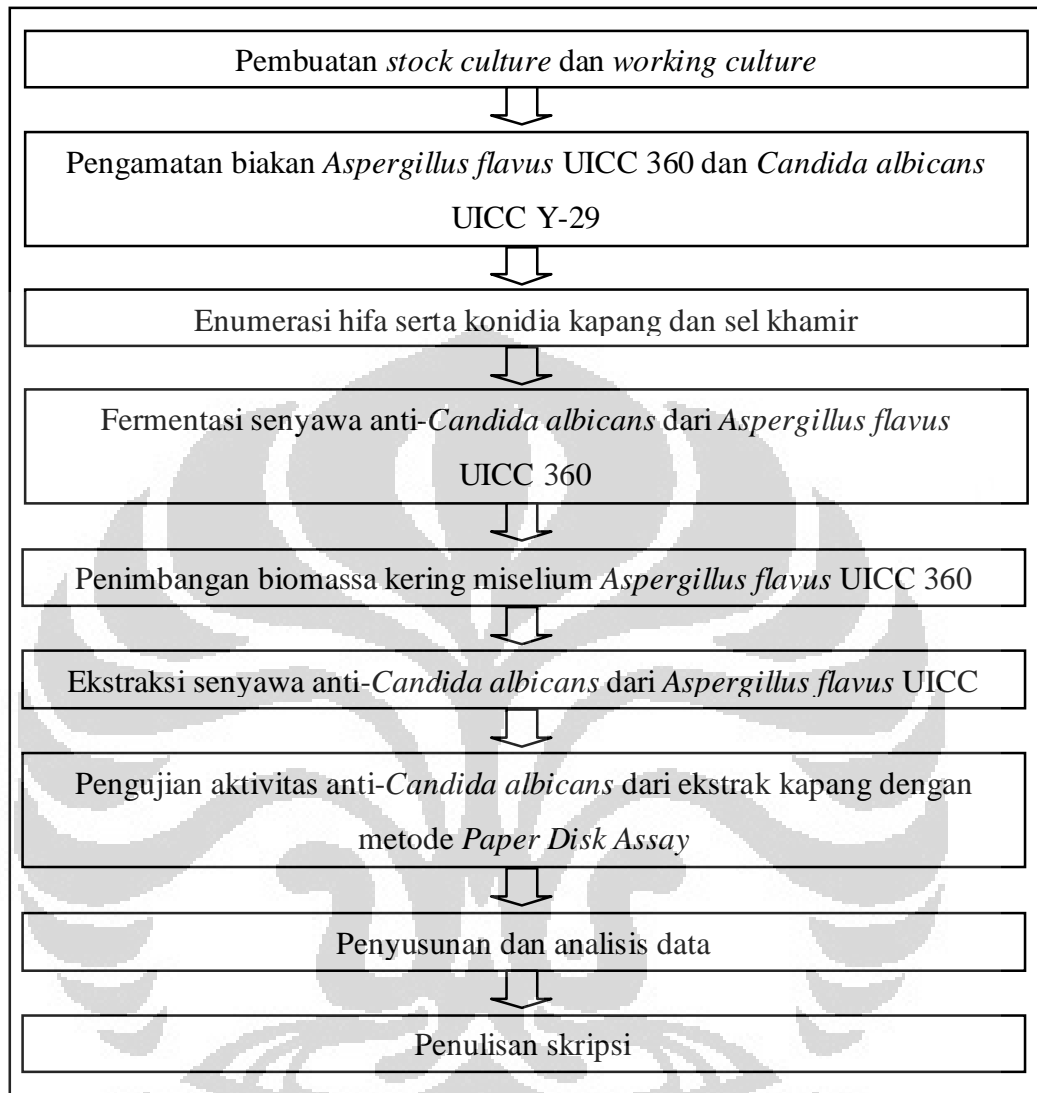
- Hanson, J. R. 2008. *The chemistry of fungi*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge:1--221.
- Hardiningtyas, S. D. 2009. Aktivitas antibakteri ekstrak kapang lunak *Sarcophyton* sp. yang difragmentasi dan tidak difragmentasi di perairan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu. Skripsi Institut Pertanian Bogor.
- Harley, J.P. 2005. *Laboratory exercises microbiology*. 6th ed. McGraw-Hill, New York: xiv + 466 hlm.
- Hedayati, M. T., A. C. Pasqualotto, P.A. Warn, P. Bowyer & D. W. Denning. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* **153**: 1677--1692.
- Hewitt, W. 2005. *Microbiological assay for pharmaceutical analysis: A rational approach*. CRC Press, Florida: i + 244 hlm.
- Hogg, S. 2005. *Essential microbiology*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex: x + 468 hlm.
- Hua, S. S., J. L. Baker, & M. F. Espiritu. 1999. Interactions of saprophytic yeasts with a *nor* Mutant of *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(6): 2738--2740.
- Hui, Y., M. A. Jingming, F. Chun, C. Ying, Z. Suwen, & C. Beiju. 2009. The breeding of a pigment mutant strain of steroid hydroxylation *Aspergillus flavus* by low energy ion implantation. *Plasma Science and Technology* **11**(1): 122--126.
- Jogezai, N., A. Razal, F. Abbas, M. Bajwa, D. Mohammad, W. Kakar, M. Saeed, & A. Awan. 2011. Optimization of cultural conditions for microbial alpha amylase production. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* **3**(9): 221--227.
- Khopkar, S. M. 2003. *Konsep dasar kimia analitik*. Edisi pertama. UI-Press, Jakarta: xvi + 429 hlm.
- Kiel, H., R. Guvrin, & Y. Henis. 1981. Citric acid fermentation by *Aspergillus niger* on low sugar concentrations and cotton waste. *Applied and Environmental Microbiology* **42**(1): 1-4.
- Kumar, M. S., M. K. Pallapothu, M. S. Hermant & Sadhukun. 2000. A rapid technique for screening of lovastatin producing strains of *Aspergillus*

- terreus* by agar plug and *Neurospora crassa* bioassay. *Journal of Microbiology Methods* **40**: 99--104.
- Kurtzman, C. P. & J. W. Fell. 1998. *The yeast, a taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: xvii + 1055 hlm.
- Lavermicocca, P., F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti & M. Gobbetti. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied And Enviromental Microbiology* **66**(9): 4084--4090.
- Lehninger, A.L. 1995. *Dasar-dasar biokimia*. Jilid 1. Terj. dari *Principles of biochemistry* oleh M. Thenawidjaja. Erlangga, Jakarta: xv + 369 hlm.
- Hyde, K. D., J. E. Taylor & J. Frohlich. 2000. *Genera of Ascomycetes of palms*. Hongkong: 247 hlm.
- Lin, W. H., H. Z. Fu, J. Li, & P. Proksch. 2001. Novel chromone derivatives from marine fungus *Aspergillus versicolor* isolated from the sponge *Xestospongia exigua*. *Chinese Chemical Letters* **12**(3): 235--238.
- Listiandiani, K. 2011. Identifikasi kapang endofit ES1, ES2, ES3, dan ES4 dari *Broussonetia papyfera* dan pengujian aktivitas antimikroba. Skripsi Departemen Biologi FMIPA UI, Depok: xiv + 78 hlm.
- Lopez, J. L., J. A. S. Perez, J. M. F. Sevilla, F. G. A. Fernandez, E. M. Grima & Y. Christi. 2003. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio. *Enzyme and Microbial Technology* **33**: 270--277.
- Losada, L., O. Ajayi, J. C. Frisvard, J. Yu, & W. C. Nierman. 2009. Effect of competition on the production and activity of secondary metabolites in *Aspergillus* species. *Medical Mycology*: 1--9.
- Lu, P., X. Zhao, & T. Cui. 2010. Production of emodin from *Aspergillus ochraceus* at preparative scale. *African Journal of Biotechnology* **9**(4): 512--517.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, D. A. Stahl, & D. P. Clark. 2012. *Biology of microorganism*. 13th ed. Pearson Education Inc., San Fransisco: ii + 1044 hlm.
- Maier, R. M., I. L. Pepper & C. P. Gerba. 2000. *Environmental microbiology*. Academic Pess, California: xix + 585 hlm.

- Mann, J. 1995. *Secondary metabolism*. 2nd ed. Oxford University Press Inc., New York: xv + 347 hlm.
- Maryanto, H. 2004. Isolasi & identifikasi kapang *Aspergilli* xerotoleran pada biji-bijian dan serelia serta pengaruh beberapa medium pada aktivitas senyawa bioaktif *Aspergillus anti-Candida*. Tesis Departemen Biologi FMIPA UI.
- Mizoguchi, J., T. Saito, K. Mizuno, & K. Hayano. 1977. On the mode of action of a new antifungal antibiotic, aculeacin A: inhibitory of cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Antibiotics* **30**(4): 308--313.
- Nedal, A. H. Sletta, T. Brautaset, S. E. F. Borgos, O. N. Sekurova, T. E. Ellingsen, & S. B. Zotchevi. 2007. Analysis of the mycosamine biosynthesis and attachment genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces noursei*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(22): 7400--7407.
- Ngampanya, B. & S. Phongtongpasuk. 2006. Effects of sucrose concentration on crude bromelain production of *in vitro* culture of pineapple (*Ananas comosus* var. 'Pattavia'). *Natural Science* **40**: 129--134.
- Pelczar, M. J., R. D. Reid & E. C. S. Chan. 1977. *Microbiology*. Ed. Ke-4. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York: vii + 952 hlm.
- Poeloengan, M. 2009. Uji aktivitas antibakteri ekstrak methanol daun miana (*Coleus seutellarioides* (L.) Benth) terhadap bakteri *Salmonella enteridis* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Biotika* **7**(2): 61-68.
- Rafliyanti, Y. 2010. Produksi lovastatin kapang *Aspergillus* spp. & pengaruhnya terhadap kadar kolesterol dalam darah tikus (*Rattus norvegicus* L.) galur *Sprague dawley*. Tesis Departemen Biologi FMIPA UI, Depok: xviii + 96 hlm.
- Rosa, C. A. & G. G. Peter. 2006. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer-Verlag, Berlin: x + 579 hlm.
- Salle, A. J. 1961. *Fundamental principle of bacteriology*. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York: viii + 812 hlm.
- Samiee, S.M., N. Moazami, S. Haghghi, F.A. Mohseni, S. Mirdamadi, & M.R. Bakhtiari. 2003. Screening of lovastatin production by filamentous fungi. *Iranian Biomedical Journal*. **7**(1): 29--33.

- Samson, R. A., E. S. Hoekstra, & C. A. N. V. Oorschot. 1984. *Introduction to food and airborne fungi*. 2nd ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Utrecht: 248 hlm.
- Silva, L., A. Coutinho, A. Fedorov, & M. Prieto. 2006. Competitive binding of cholesterol and ergosterol to the polyene antibiotic nystatin: A fluorescence study. *Biophysical Journal* **90**: 3625--3631.
- Solomon, E. P., L. R. Berg, & D.W. Martin. 2008. *Biology*. 8th ed. Thompson Corporation, USA: xxxiv + 1234 hlm.
- Sukmawati, D. 2002. Skrining kapang *Aspergillus terreus* yang berpotensi menghasilkan senyawa anti-*Candida albicans*, dan pengaruh perbedaan medium fermentasi terhadap aktivitas senyawa anti-*Candida albicans* dari isolat-isolat kapang *A. terreus* koleksi UICC. Tesis Departemen Biologi FMIPA UI, Depok: x + 37 hlm.
- Sutedjo, M.M., A.G. Kartasapoetra & R.S. Sastroatmodjo. 1991. *Mikrobiologi tanah*. Penerbit Rineke Cipta, Jakarta: xxi + 447 hlm.
- Webster, J. & R. W. S. Weber. 2007. *Introduction to fungi*. 3rd ed. Cambridge University Press, New York: xix + 841 hlm.
- Wu, G. 2010. *Assay development: Fundamentals and practices*. John Wiley & Sons, Inc., Kanada: xi + 425 hlm.

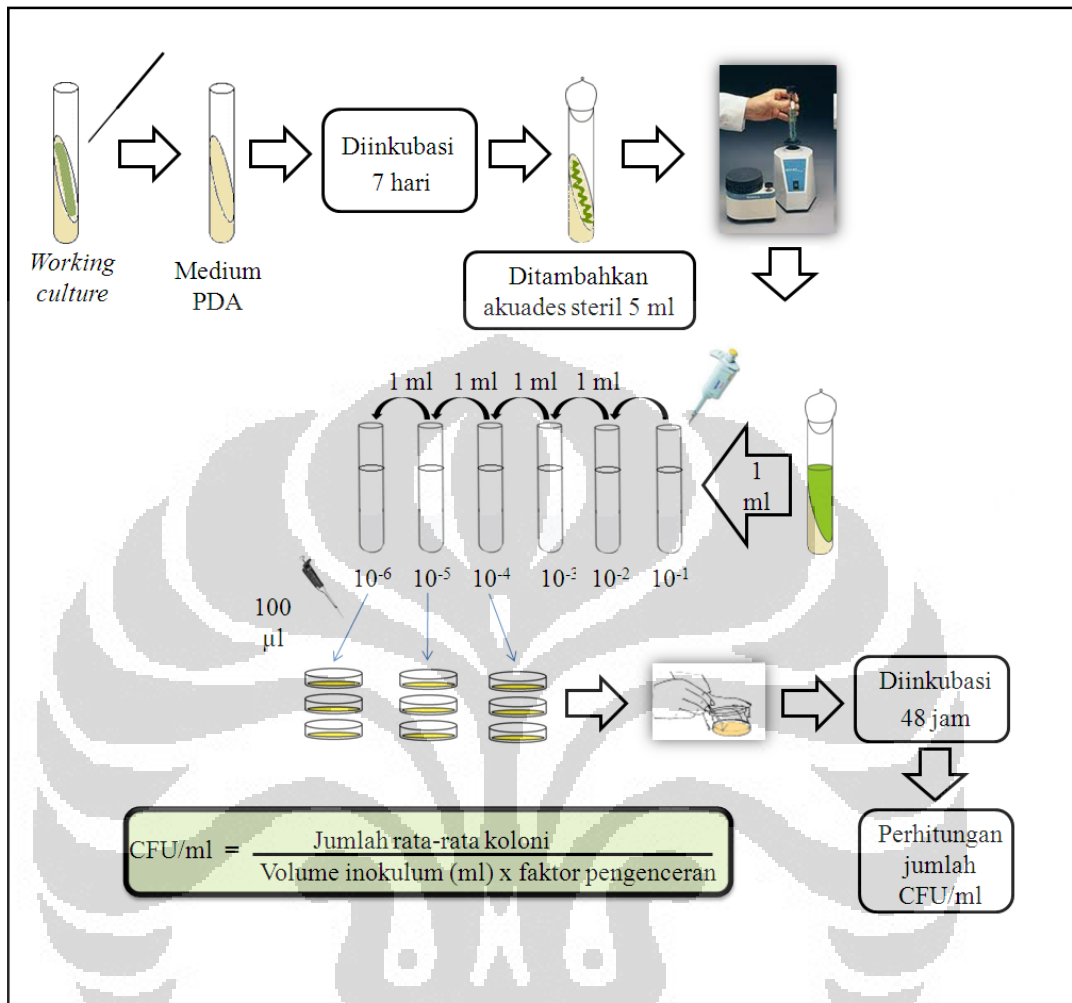
Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian



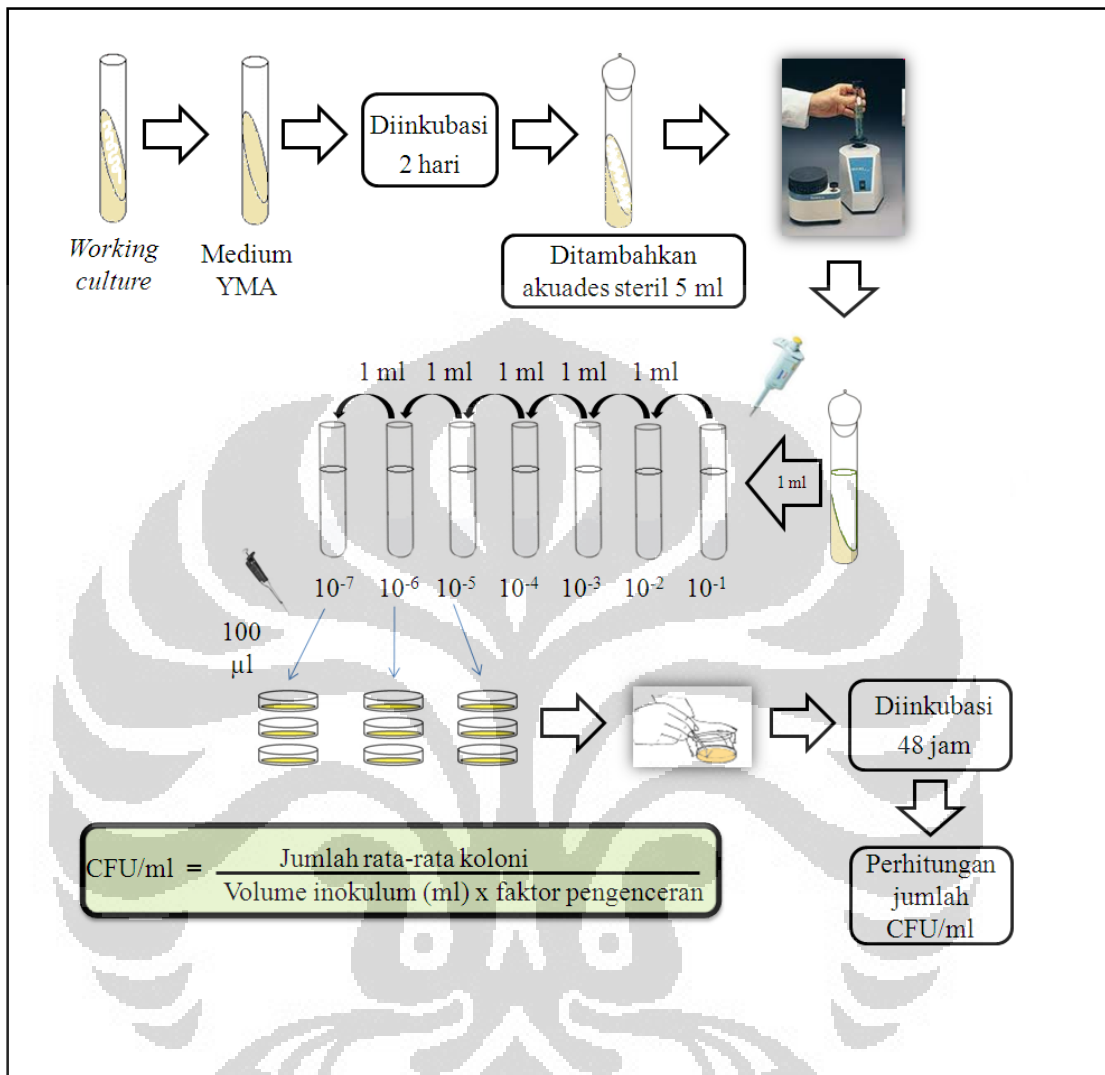
Lampiran 2. Panduan Warna Castell-Polychromos No.9216

PANDUAN WARNA CASTELL-POLYCHROMOS NO. 9216					
	101 Putih		136 Ungu loh		171 Hijau muda
	104 Kuning		137 Ungu terang		173 Hijau zaitun
	105 Kuning langsung		139 Ungu muda		174 Hijau cemara
	106 Kuning kunyit		141 Biru Delft		175 Sepia
	107 Kuning limau		144 Biru kobalt muda		176 Coklat
	108 Kuning kepodang		146 Biru langit		180 Coklat jangat
	109 Kuning jenar		147 Biru muda		182 Hartal coklat
	113 Jingga muda		148 Biru jelah		183 Hartal emas
	115 Jingga tua		149 Biru Cina		184 Hartal
	117 Merah merona		150 Biru Berlin		187 Hartal rentung
	118 Merah marak		151 Biru Prusia		189 Kayu manis
	121 Merah dadu		153 Biru merak		190 Merah Venetia
	124 Merah serah mawar		155 Balu		191 Merah Pompei
	126 Merah serah tua		159 Hijau rumput		192 Merah Indian
	127 Merah serah muda		161 Hijau tembaga		194 Lembayung
	128 Merah mengkudu mawar		162 Hijau jelah		195 Abu-abu muda
	129 Merah mengkudu jambon		163 Hijau zamrud		196 Abu-abu perak
	131 Merah daging medium		167 Hijau getah		197 Nilajada
	133 Merah anggur		168 Hijau lumut		198 Hitam sabak
	134 Merah lembayung		170 Hijau apel		199 hitam

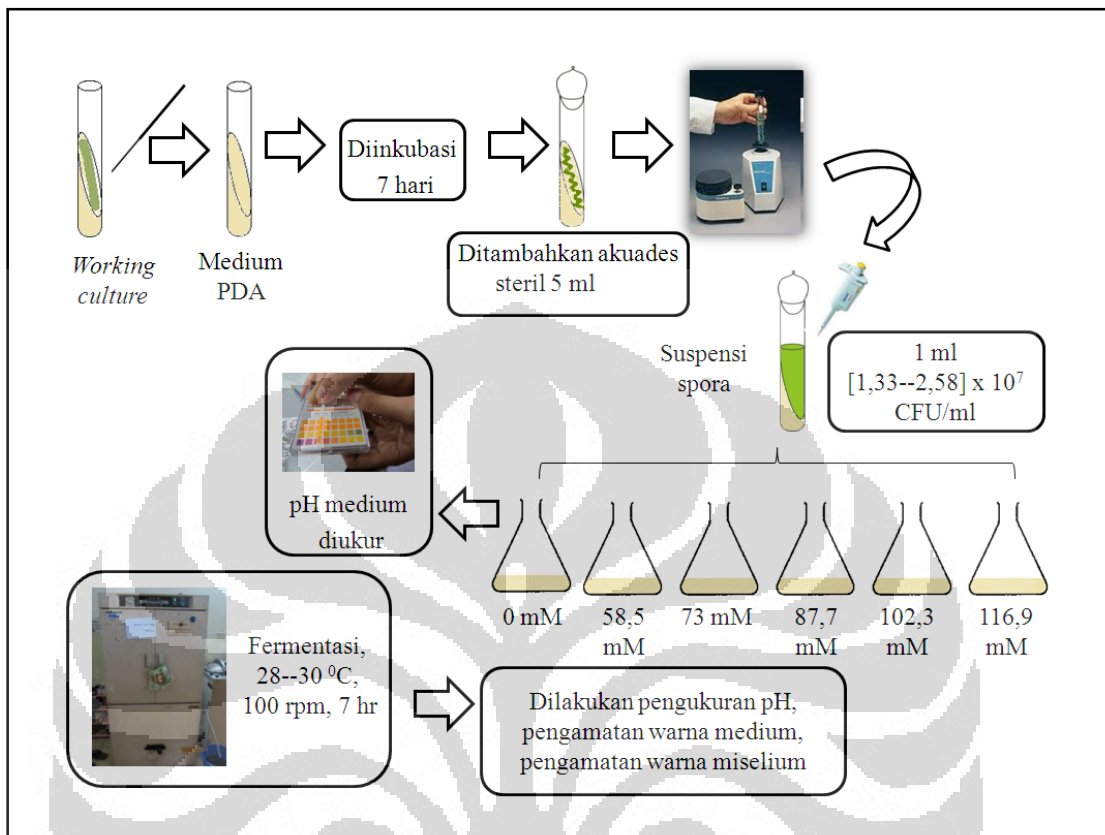
Lampiran 3. Enumerasi Hifa dan Konidia Kapang

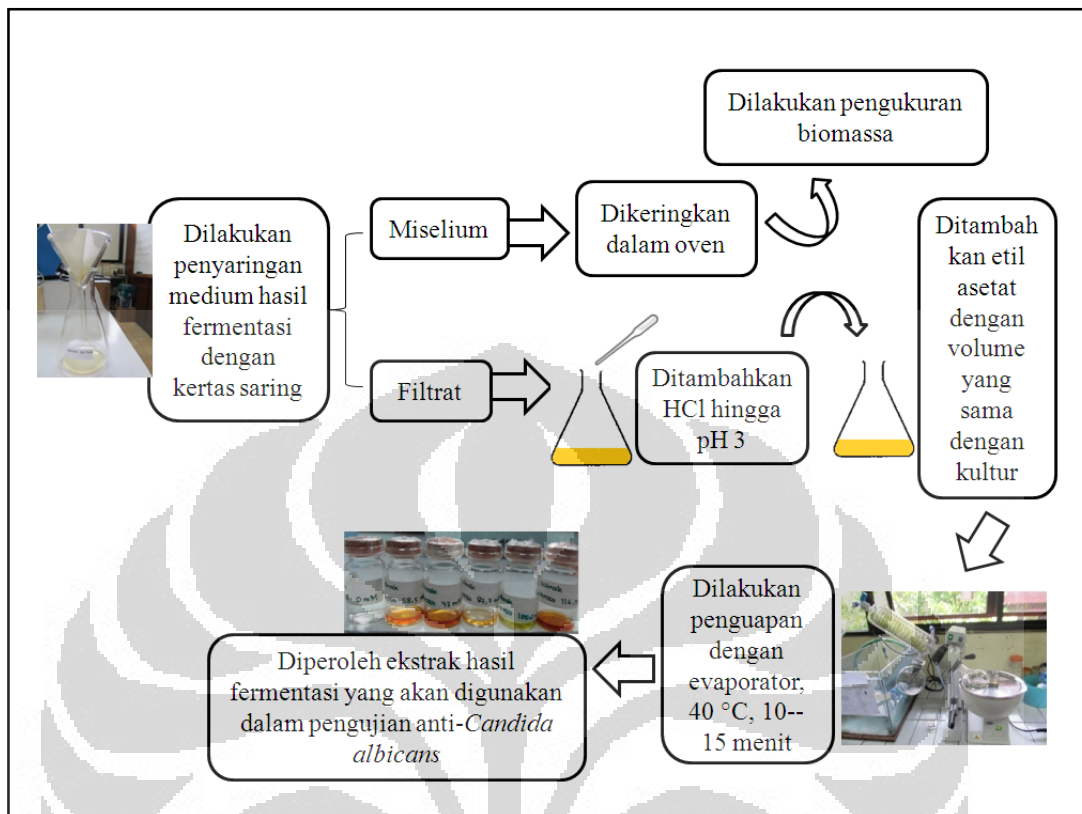


Lampiran 4. Enumerasi Sel Khamir

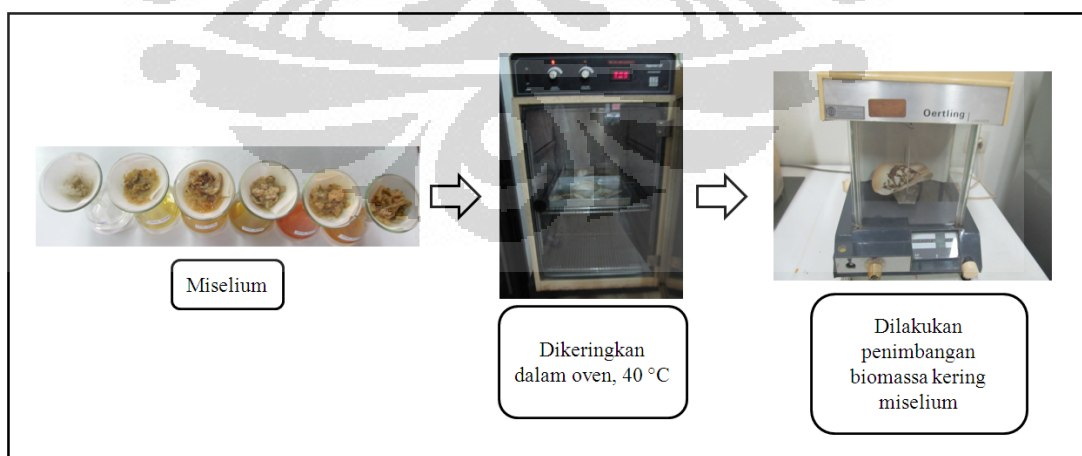


Lampiran 5. Fermentasi Senyawa Anti-*Candida albicans* dari
Aspergillus flavus UICC 360

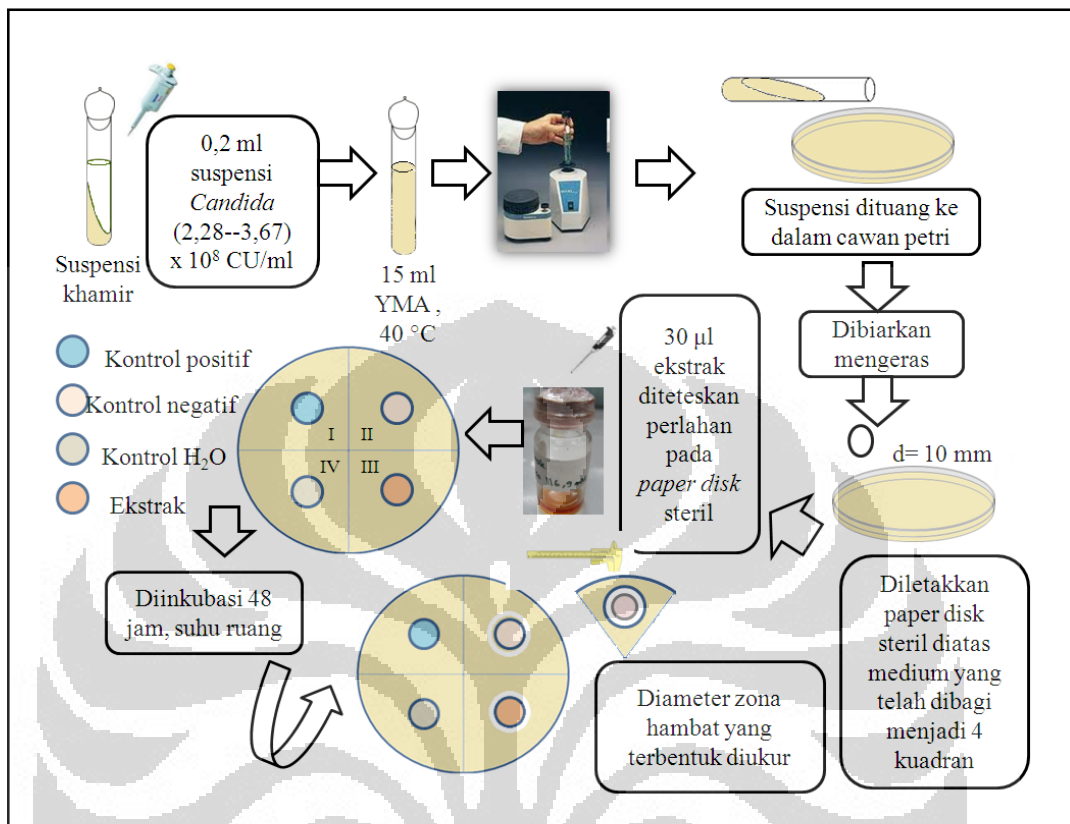


Lampiran 6. Ekstraksi Senyawa Anti-*Candida albicans*

Lampiran 7. Penimbangan Biomassa Kering



Lampiran 8. *Bioassay* ekstrak senyawa anti-*Candida albicans* menggunakan metode *Paper Disk Assay*



Lampiran 9.

Uji Shapiro & Wilk terhadap data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29

- Tujuan : untuk mengetahui normalitas data
- Hipotesis :
- H_0 : data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29 berdistribusi normal
- H_a : data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29 tidak berdistribusi normal

Keterangan:

Nilai yang digunakan adalah $df = n = 21$, $P =$ probabilitas

Kriteria keputusan:

1. Jika $P > 0,05$ maka H_0 diterima
 2. Jika $P < 0,05$ maka H_0 ditolak
- Hasil perhitungan uji normalitas Shapiro & Wilk terhadap data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29

	Shapiro-Wilk		
	<i>Statistic</i>	df	P
Diameter zona hambat	0,935	21	0,171

$P = 0,171 \rightarrow P > 0,05$ maka H_0 diterima

Kesimpulan:

1. Data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29 berdistribusi normal

Lampiran 10.

Uji homogenitas Levene terhadap data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29

- Tujuan : untuk mengetahui homogenitas data
- Hipotesis :
- H_0 : data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29 bervariasi homogen
- H_a : data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29 tidak bervariasi homogen

Keterangan:

P = probabilitas

Kriteria keputusan:

1. Jika $P > 0,05$ maka H_0 diterima
 2. Jika $P < 0,05$ maka H_0 ditolak
- Hasil perhitungan uji homogenitas Levene terhadap data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29

Levene Statistic	df1	df2	P
2,812	6	14	0,052

$P = 0,052 \rightarrow P > 0,05$ maka H_0 diterima

Kesimpulan:

1. Data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29 bervariasi homogen.

Lampiran 11.

Uji Anova terhadap data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29

Tujuan : untuk mengetahui nilai rata-rata diameter zona hambat berbeda nyata atau tidak

Hipotesis :

H_0 : nilai rata-rata data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29 tidak berbeda nyata

$H_a(1)$: nilai rata-rata data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29 berbeda nyata

Keterangan: P = probabilitas

Kriteria keputusan:

1. Jika $P > 0,05$ maka H_0 diterima
2. Jika $P < 0,05$ maka H_0 ditolak

Hasil perhitungan:

1. Uji berganda *Least Significancy Difference* (LSD) terhadap data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29

Diameter zona hambat	
<i>Chi-Square</i>	15,726
df	6
P	0,00

$P = 0,00 \rightarrow P < 0,05$, maka H_0 ditolak

Kesimpulan:

- Nilai rata-rata data diameter zona hambat dari ekstrak kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 terhadap *Candida albicans* UICC Y-29 berbeda nyata.