



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENGARUH KONSENTRASI NATRIUM NITRAT  
TERHADAP KEMAMPUAN ANTI-*Candida albicans*  
DARI *Aspergillus flavus* UICC 360**

**SKRIPSI**

**EKA DESI LESTARI  
0706263782**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
DEPOK  
JUNI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENGARUH KONSENTRASI NATRIUM NITRAT  
TERHADAP KEMAMPUAN ANTI-*Candida albicans*  
DARI *Aspergillus flavus* UICC 360**

**SKRIPSI**

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

**EKA DESI LESTARI  
0706263782**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
DEPOK  
JUNI 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 : Eka Desi Lestari**

**NPM : 0706263782**

**Tanda Tangan : **

**Tanggal : 15 Juni 2012**

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh

Nama : Eka Desi Lestari  
NPM : 0706263782  
Program Studi : Biologi  
Judul Skripsi : Pengaruh Konsentrasi Natrium Nitrat Terhadap Kemampuan 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 S1 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 : 15 Juni 2012

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, Rabb semesta alam, atas segala berkah, rahmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Salawat dan salam penulis haturkan kepada tauladan terbaik sepanjang zaman, Muhammad SAW. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. selaku dosen pembimbing, atas segala perhatian, motivasi, waktu, tenaga, dukungan dan kasih sayangnya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Ariyanti Oetari, Ph.D. dan Dra. Setiorini, M.Kes. selaku dosen penguji I dan II yang telah memberikan saran-saran dan motivasi selama penulis melakukan penelitian dan penulisan skripsi ini.
3. Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI sekaligus selaku Penasihat Akademik atas segala dukungan dan nasehatnya selama penulis menjadi mahasiswa.
4. Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan, dan seluruh staf pengajar Departemen Biologi FMIPA UI atas bekal ilmu yang diberikan kepada penulis selama penulis menjadi mahasiswa.
5. Staf karyawan Departemen Biologi FMIPA UI (Ahmad Supriyadi, SIP., Pak Taryono, Bu Rusmalina, Bu Sofi, Mbak Ida, Mbak Asri, dan Mas Dedi) atas segala bantuannya.
6. Kedua orang tua terkasih yang sangat penulis cintai, Bapak Afandi dan Ibu Siti Rumanah atas segala dukungan, kasih sayang, motivasi, ridho dan doa yang tiada henti dan sangat berarti.

7. Adik-adik yang luar biasa penuh cinta, Muhammad Mukhtar, Khofifah Indar Wanti, Machariel Ikhwan Syahputra dan nenek tersayang serta Bapak Nor Taufik, S.Ag. (guru SMA 1 Pekalongan) atas segala doanya.
8. AZKIYA (Sari, Ulfa, Mimin, Anik, Fitri) atas dorongan semangat, kasih sayang, dan doa dalam sebuah persahabatan yang telah memotivasi penulis untuk selalu terus melangkah dan berusaha tidak menyerah.
7. Adis, Naya, Dwi, Uvi, Maridha, Aulia, Namey, Kak Vita, Kak Eka, Kak Mardha, Kak Ida, Kak Anjar, Blossom'07, Biosentris'08, Zygomorphic'09, teman-teman kos POKUS dan teman-teman lab. mikrobiologi atas segala bantuan dan segala bentuk keceriaan yang sangat berarti dalam kehidupan penulis selama kuliah di Departemen Biologi.
9. Semua pihak yang telah membantu dari awal penulis kuliah di Departemen Biologi FMIPA UI hingga lulus dan tidak bisa disebutkan namanya satu per satu.

Akhir kata, penulis berdoa agar Allah SWT membalas setiap kebaikan dari semua pihak yang telah membantu. Penulis berharap skripsi yang masih jauh dari sempurna ini dapat memberikan manfaat bagi penulis, pembaca, dan dunia ilmu pengetahuan.

Depok, 15 Juni 2012

Penulis

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

---

---

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

Nama : Eka Desi Lestari  
NPM : 0706263782  
Program Studi : S1  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis Karya : Skripsi

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

Pengaruh Konsentrasi Natrium Nitrat Terhadap Kemampuan Anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada Tanggal : 15 Juni 2012

Yang menyatakan



(Eka Desi Lestari)

## ABSTRAK

Nama : Eka Desi Lestari  
Program Studi : Biologi  
Judul : Pengaruh Konsentrasi Natrium Nitrat Terhadap Kemampuan Anti-*Candida albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360

*Aspergillus flavus* UICC 360 telah diketahui dapat menghasilkan senyawa anti-*Candida albicans*. Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi natrium nitrat terhadap kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360. Sebanyak  $(2,8--3,7) \times 10^7$  CFU/ml inokulum *Aspergillus flavus* UICC 360 dengan konsentrasi 1,96% (v/v), diinokulasikan ke dalam medium *Czapek's Dox Broth* yang berisi variasi konsentrasi natrium nitrat (0 mM, 23 mM, 29 mM, 35 mM, 41 mM, dan 47 mM). Fermentasi dilakukan selama 7 hari pada suhu ruang (27--30° C). Pengujian kemampuan anti-*C. albicans* dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar cara cakram. Kemampuan anti-*C. albicans* ditunjukkan oleh terbentuknya zona hambat. Uji perbandingan berganda *Least Significance Difference* (LSD) ( $P < 0,05$ ) memperlihatkan adanya pengaruh nyata pemberian variasi konsentrasi natrium nitrat terhadap ukuran diameter zona hambat. Hasil penelitian menunjukkan  $\text{NaNO}_3$  29 mM (ekstrak E3 dalam etil asetat) merupakan konsentrasi terbaik untuk aktivitas anti-*C. albicans*, ditandai dengan diameter zona hambat, yaitu  $8,70 \pm 0,53$  mm (setara dengan nistatin pada konsentrasi 1.581,8 ppm).

Kata kunci:

Anti-*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, ekstrak etil asetat, fermentasi, natrium nitrat, zona hambat.

xiii + 77 halaman ; 13 gambar; 12 lampiran; 9 tabel  
Daftar Acuan : 79 (1977--2012)



## ABSTRACT

Name : Eka Desi Lestari  
Study Program : Biology  
Title : Effect of Sodium Nitrate Concentration on *Aspergillus flavus* UICC 360 in Producing Anti-*Candida albicans*

*Aspergillus flavus* UICC 360 has been known to produce anti-*Candida albicans* compound. The research aims to determine the effect of sodium nitrate concentration on *Aspergillus flavus* UICC 360 in producing anti-*C. albicans*. Inoculum of  $(2.8\text{--}3.7) \times 10^7$  CFU/ml of *Aspergillus flavus* UICC 360 in 1.96% (v/v) concentration was inoculated into *Czapek's Dox Broth* medium containing various sodium nitrate concentration (0 mM, 23 mM, 29 mM, 35 mM, 41 mM, and 47 mM). The fermentation was carried out for 7 days at 27--30° C. Investigation of anti-*C. albicans* test was carried out by disc agar diffusion method. Anti-*C. albicans* from *Aspergillus flavus* UICC 360 was shown by the formation of inhibitory zones. *Least Significance Difference* test ( $P < 0.05$ ) showed significant effect of the varying sodium nitrate concentration on inhibitory zone diameter. The result showed that highest anti-*C. albicans* was shown by highest inhibition zone diameter at  $8.70 \pm 0.53$  (equivalent to the activity of nystatin at concentration of 1,581.8 ppm) which was achieved at 29 mM  $\text{NaNO}_3$  (extract of E3 in ethyl acetate).

Keywords:

Anti-*Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, ethyl acetate extract, fermentation, inhibition zone, sodium nitrate.

xiii + 77 pages ; 12 appendix; 13 pictures; 9 table  
Bibliography : 79 (1977--2012)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1. Fungi .....	5
2.2. <i>Aspergillus flavus</i> .....	7
2.3. <i>Candida albicans</i> .....	8
2.4. Metabolit Sekunder .....	9
2.5. Nitrogen.....	11
2.5.1. Peran Nitrogen bagi Kapang.....	12
2.5.2. Nitrat .....	12
2.6. Fermentasi .....	13
2.7. Pertumbuhan Mikroorganisme.....	14
2.8. Senyawa Antifungi.....	16
2.9. Ekstraksi Metabolit Sekunder .....	18
2.10. Pengujian Kemampuan Antifungi.....	19
<b>3. METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>21</b>
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian .....	21
3.2. Alat.....	21
3.3. Bahan.....	22
3.3.1. Mikroorganisme .....	22
3.3.2. Medium .....	22
3.3.3. Bahan Kimia.....	22
3.3.4. Bahan Habis Pakai .....	23
3.4. Cara Kerja .....	23
3.4.1. Pembuatan Medium .....	23
3.4.1.1. <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	23
3.4.1.2. <i>Yeast Malt Agar</i> (YMA).....	23
3.4.1.3. <i>Czapex Dox Broth</i> (CDB) .....	24
3.4.2. Pembuatan <i>Stock Culture</i> dan <i>Working Culture</i> .....	24
3.4.3. Pengamatan Morfologi Kapang dan Khamir .....	25

3.4.3.1.	Pengamatan Morfologi Kapang ( <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360).....	25
3.4.3.2.	Pengamatan Morfologi Khamir ( <i>Candida albicans</i> UICC Y-29).....	25
3.4.4.	Perhitungan Sel Kapang dan Khamir dengan Metode <i>Total Plate Count</i> (TPC).....	26
3.4.5.	Produksi Senyawa Antifungi oleh <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 .....	27
3.4.5.1.	Pembuatan Inokulum Sel Kapang.....	27
3.4.5.2.	Fermentasi .....	27
3.4.6.	Ekstraksi Senyawa Antifungi dari <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 .....	28
3.4.7.	Pengeringan Biomassa <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360.....	28
3.4.8.	Pengujian Aktivitas Anti- <i>C. albicans</i> Ekstrak <i>Aspergillus Flavus</i> UICC 360 dengan Metode Difusi Agar Cara Cakram .....	29
3.4.8.1.	Pembuatan Inokulum Sel Khamir .....	29
3.4.8.2.	Pengujian Aktivitas Anti- <i>C. albicans</i> .....	29
3.4.9.	Pengolahan dan Analisis Data.....	30
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>31</b>
4.1.	Pengamatan Morfologi Kapang dan Khamir .....	31
4.1.1.	<i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 .....	31
4.1.2.	<i>Candida albicans</i> UICC Y-29.....	34
4.2.	Perhitungan Sel Kapang dan Khamir dengan Metode <i>Total Plate Count</i> (TPC).....	37
4.2.1.	Perhitungan Sel <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 .....	37
4.2.2.	Perhitungan Sel <i>Candida albicans</i> UICC Y-29 .....	39
4.3.	Produksi Senyawa Antifungi Oleh <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 ....	40
4.3.1.	Warna Medium Fermentasi.....	41
4.3.2.	pH Akhir Fermentasi.....	43
4.3.3.	Berat Kering Biomassa <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 .....	44
4.4.	Pengujian Kemampuan Anti- <i>C. albicans</i> Ekstrak <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 dengan Metode Difusi Agar Cara Cakram .....	47
<b>5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>56</b>
5.1.	Kesimpulan .....	56
5.2.	Saran.....	56
<b>6.</b>	<b>DAFTAR REFERENSI .....</b>	<b>57</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.1.	Hasil pengamatan morfologi <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 secara makroskopik dan mikroskopik, umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang (27--30° C) .....	33
Tabel 4.1.2.	Hasil pengamatan morfologi <i>Candida albicans</i> UICC Y-29 secara makroskopik dan mikroskopik, umur 2 hari pada medium YMA di suhu ruang (27--30° C) .....	35
Tabel 4.2.1.	<i>Total Plate Count</i> (TPC) sel kapang <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 berumur 2 hari pada medium PDA di suhu ruang (27--30° C) .....	37
Tabel 4.2.2.	<i>Total Plate Count</i> (TPC) sel khamir <i>Candida albicans</i> UICC Y-29 berumur 2 hari pada medium YMA di suhu ruang (27--30° C) .....	40
Tabel 4.3.	Hasil fermentasi <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360, waktu inkubasi 7 hari, di suhu ruang (27--30° C), pengocokan 100 rpm .....	41
Tabel 4.3.3.	Hasil pengeringan biomassa <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 pada suhu 50° C selama 24 jam .....	45
Tabel 4.4.(1).	Hasil pengujian kemampuan anti- <i>C. albicans</i> ekstrak <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 dalam etil asetat menggunakan difusi agar cara cakram, inkubasi selama 24 jam pada medium YMA di suhu ruang (27--30° C) .....	50
Tabel 4.4.(2).	Konsentrasi ekstrak <i>Aspergillus flavus</i> UICC yang disetarakan dengan konsentrasi antifungi nistatin berdasarkan perbandingan diameter zona hambat .....	52

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.2.	Struktur morfologi mikroskopik <i>Aspergillus</i> .....	8
Gambar 2.3.	Struktur morfologi mikroskopik <i>C. albicans</i> .....	9
Gambar 2.4.	Struktur kimia lovastatin .....	11
Gambar 2.7.	Kurva pertumbuhan fungi .....	15
Gambar 4.1.1.(1).	Hasil pengamatan <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 secara makroskopik, umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang (27--30° C) .....	32
Gambar 4.1.1.(2).	Hasil pengamatan <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 secara mikroskopik, umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang (27--30° C) .....	34
Gambar 4.1.2.(1).	Hasil pengamatan <i>Candida albicans</i> UICC secara makroskopik, umur 2 hari pada medium YMA di suhu ruang (27--30° C) .....	36
Gambar 4.1.2.(2).	Hasil pengamatan <i>Candida albicans</i> UICC secara mikroskopik, umur 2 hari pada medium YMA di suhu ruang (27--30° C) .....	36
Gambar 4.3.1.	Hasil fermentasi <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360, waktu inkubasi 7 hari, di suhu ruang (27--30° C), pengocokan 100 rpm .....	42
Gambar 4.3.2.	Grafik berat kering biomassa <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 .....	46
Gambar 4.4.(1).	Ekstrak antifungi <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 dari masing-masing perlakuan fermentasi.....	48
Gambar 4.4.(2).	Hasil pengujian kemampuan anti- <i>C. albicans</i> ekstrak <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 dengan difusi agar cara cakram, inkubasi selama 48 jam pada medium YMA di suhu ruang (27--30° C) .....	51
Gambar 4.4.(3).	Grafik pengaruh konsentrasi NaNO <sub>3</sub> terhadap rata-rata diameter zona hambat kemampuan anti- <i>C. albicans</i> dari <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 .....	53

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Perhitungan Konsentrasi Natrium Nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) .....	65
Lampiran 2.	Uji Normalitas Shapiro-Wilk terhadap Data Diameter Zona Hambat Rata-rata Anti- <i>C. albicans</i> dari <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360.....	66
Lampiran 3.	Uji Homogenitas Levene Terhadap Data Diameter Zona Hambat Rata-rata Anti- <i>Candida albicans</i> dari <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 .....	67
Lampiran 4.	Uji perbandingan berganda <i>Least Significancy Difference</i> (LSD) Terhadap Data Diameter Zona Hambat Rata-rata Anti- <i>C.albicans</i> dari <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360.....	68
Lampiran 5.	Skema Kerja Penelitian .....	70
Lampiran 6.	Skema Cara Kerja Pengamatan Morfologi Kapang ( <i>Aspergillus Flavus</i> UICC 360) .....	71
Lampiran 7.	Skema Cara Kerja Pengamatan Morfologi Khamir ( <i>Candida albicans</i> UICC Y-29) .....	72
Lampiran 8.	Skema Cara Kerja Perhitungan Sel Kapang ( <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360) .....	73
Lampiran 9.	Skema Cara Kerja Produksi Senyawa Antifungi Oleh <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 .....	74
Lampiran 10.	Skema Cara Kerja Ekstraksi Senyawa Antifungi dan Pengeringan Biomassa <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360.....	75
Lampiran 11.	Skema Cara Kerja Pengujian Aktivitas Senyawa Anti- <i>C. albicans</i> Ekstrak <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360 Dengan Metode Difusi Agar Cara Cakram.....	76
Lampiran 12.	Panduan Warna Castell-Polychromos No. 9216.....	77

## **BAB 1**

### **PENDAHULUAN**

Indonesia merupakan salah satu negara beriklim tropis. Kondisi iklim tersebut sangat mendukung pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme, seperti fungi dan bakteri, baik bersifat patogen maupun non-patogen. Pertumbuhan mikroorganisme patogen dapat menyebabkan dampak negatif pada kesehatan (Akmal *dkk.* 1993: 107). Salah satu contoh dampak negatif tersebut adalah munculnya penyakit kandidiasis yang disebabkan oleh fungi dari genus *Candida*. *Candida albicans* (Berkhout 1923) merupakan fungi utama penyebab penyakit kandidiasis yang dapat terjadi pada kulit, rongga mulut, bibir dan vagina (Levinson 2008: 534).

*Candida albicans* hidup sebagai mikroorganisme normal dalam tubuh inang, seperti manusia, misalnya dalam saluran pencernaan, saluran pernapasan, saluran kemih dan dalam aliran darah. Akan tetapi, *C. albicans* dapat berubah menjadi patogen apabila keseimbangan sistem imunitas tubuh inang terganggu. Oleh karena itu, *C. albicans* digolongkan sebagai fungi patogen oportunistik (Madigan *dkk.* 2012: 795, 926).

Dampak negatif yang disebabkan oleh *C. albicans* dapat diatasi dengan senyawa antifungi. Antifungi adalah suatu senyawa yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan fungi (Madigan *dkk.* 2012: 776--777). Contoh antifungi adalah nistatin, amphotericin B, *azole* dan echinocandin (Andriole 1999: 151). Antifungi dapat diproduksi oleh mikroorganisme dalam bentuk metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan senyawa ekstraseluler hasil metabolisme mikroorganisme dan tidak berperan dalam proses pertumbuhan mikroorganisme yang menghasilkannya (Magan & Aldred 2007: 121). Beberapa penelitian melaporkan bahwa metabolit sekunder dari kapang mampu menghambat pertumbuhan fungi lain. Kumar *dkk.* (2000: 103) melaporkan bahwa metabolit sekunder lovastatin (bentuk asam  $\beta$ -hidroksi) dari *Aspergillus terreus* (Thom 1918) ATCC 20541 mampu menghambat pertumbuhan *Neurospora crassa*

(Shear & Dodge 1927) dan *Rhodotorula rubra* (Harrison 1928). Jackson *dkk.* (1995: 612) melaporkan bahwa fuscasandin dari *Fusarium sambucinum* (Fueckel 1870) mampu menghambat sintesis glukosa pada *C. albicans*.

Produksi metabolit sekunder dipengaruhi oleh metode fermentasi dan nutrisi dalam medium fermentasi. Salah satu metode fermentasi untuk memproduksi senyawa antifungi dari kapang adalah fermentasi cair. Melalui metode tersebut, penyerapan nutrisi oleh kapang dapat terjadi secara optimal karena seluruh bagian kapang berada dalam medium sehingga memungkinkan terjadinya pertumbuhan optimal dan produksi metabolit sekunder lebih banyak (Nauli & Udin 2006: 100). Nutrisi dalam proses fermentasi meliputi makronutrisi dan mikronutrisi (Griffin 1981: 138). Makronutrisi, misalnya karbon dan nitrogen memiliki peran penting dalam metabolisme sel dan pembentukan biomassa sel. Karbon berperan sebagai komponen *building block* selama pertumbuhan (Madigan *dkk.* 2012: 86). Nitrogen berperan sebagai komponen biosintesis protein, asam amino, asam nukleat dan prekursor biosintesis metabolit sekunder (Hogg 2005: 80).

Medium yang dapat digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder adalah *Czapek's Dox Broth* (CDB). Medium CDB merupakan medium basal yang berisi nutrisi-nutrisi untuk mendukung pertumbuhan kapang (Hanson 2008: 18). Jain dan Pundir (2010: 73) menggunakan medium CDB untuk memproduksi senyawa antifungi dari *Aspergillus terreus*. Sumber nitrogen yang digunakan dalam medium CDB adalah natrium nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) (Hanson 2008: 19; Oxoid 2010: 1).

Senyawa  $\text{NaNO}_3$  dapat dimanfaatkan oleh kapang sebagai sumber nitrogen untuk menghasilkan metabolit sekunder (Marzluf 1997: 17). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penggunaan  $\text{NaNO}_3$  oleh kapang dapat menghasilkan metabolit sekunder yang lebih baik dibandingkan sumber nitrogen lain. Bao-Jun Xu *dkk.* (2008: 82) menyatakan bahwa penggunaan  $\text{NaNO}_3$  untuk memproduksi lovastatin dari *Monascus ruber* (Tiegh 1884) memberikan hasil optimal. Jain dan Pundir (2010: 73) meneliti pengaruh sumber nitrogen (pepton, *yeast extract*, ammonium sulfat, natrium nitrat, ammonium klorida) terhadap kemampuan



antifungi *Aspergillus terreus*. Kemampuan antifungi tertinggi terhadap *C. albicans* ditunjukkan oleh natrium nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ), ditandai dengan zona hambat berdiameter 23,00 mm.

Kemampuan kapang dalam memproduksi metabolit sekunder juga dipengaruhi oleh ketersediaan jumlah nutrien (Casas López *dkk.* 2004: 1119). Kapang mampu memproduksi metabolit sekunder apabila tersedia nitrogen dalam jumlah  $\pm 10^{-3}$  M (Griffin 1981: 138). Bao-Jun Xu *dkk.* (2008: 82) melaporkan bahwa konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  memengaruhi kadar lovastatin yang diproduksi oleh *M. ruber*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa  $\text{NaNO}_3$  konsentrasi 23 mM merupakan konsentrasi terbaik bagi kapang *M. ruber* dalam memproduksi lovastatin.

*University of Indonesia Culture Collection* (UICC) memiliki koleksi biakan kapang kelompok *Aspergillus* yang dapat menghasilkan senyawa antifungi. Rafliyanti (2010: 32) melakukan penelitian kemampuan antifungi dari 40 biakan *Aspergillus* koleksi UICC terhadap *Candida albicans* UICC Y-29. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 40 biakan *Aspergillus* yang diteliti, 12 biakan memiliki kemampuan antifungi terhadap *Candida albicans* UICC Y-29. Sebanyak 10 biakan *Aspergillus* pada penelitian tersebut berpotensi menghasilkan senyawa anti-*C. albicans*, yaitu *Aspergillus* sp. Shi 3.2, *Aspergillus* sp. Shi 18.1, *Aspergillus flavus* UICC 359, *Aspergillus awamori* UICC 31, *Aspergillus flavus* UICC 360, *Aspergillus* sp. Shi 2.2, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus* sp. Awy V.1, *Aspergillus terreus* UICC 370, dan *Aspergillus* sp. UICC 317 ditumbuhkan dalam medium fermentasi CDB berisi  $\text{NaNO}_3$  35 mM. Hasil penelitian menyimpulkan bahwa *Aspergillus flavus* UICC 360 memiliki kemampuan tertinggi dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* UICC Y-29. Analisis *Thin Layer Chromatography* (TLC) pada penelitian tersebut menunjukkan bahwa senyawa anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 adalah lovastatin. Ferrón *dkk.* (2005: 125) melaporkan bahwa lovastatin dari *Aspergillus terreus* ATCC 20542 mampu menghambat pertumbuhan *C. albicans*. Berdasarkan potensi anti-*Candida* yang dihasilkan oleh *Aspergillus flavus* UICC 360, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan.

Penelitian pengaruh konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  terhadap kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  terhadap kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 dengan memberikan variasi konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  (0 mM; 23 mM; 29 mM; 35 mM; 41 mM; dan 47 mM) dalam medium fermentasi CDB. Pemberian variasi konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  dilakukan dengan cara menaikkan dan menurunkan konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  sebanyak 5 mM dari konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  yang digunakan oleh Rafliyanti (2010), yaitu 35 mM.

Kemampuan antifungi dari mikroorganisme dapat diketahui dengan metode difusi agar cara cakram (Akmal *dkk.* 1993: 109; Kumar *dkk.* 2000: 101; Ferrón *dkk.* 2005: 124). Kemampuan antifungi suatu senyawa dapat dilihat dari adanya zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram. Semakin besar zona hambat yang terbentuk, maka senyawa antifungi semakin efektif dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji (Hogg 2005: 368).

Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  (0 mM; 23 mM; 29 mM; 35 mM; 41 mM; dan 47 mM) pada kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 dan mendapatkan konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  yang mampu meningkatkan kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360. Hipotesis penelitian adalah penambahan  $\text{NaNO}_3$  dapat meningkatkan kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Fungi

Fungi merupakan mikroorganisme eukariotik, tidak memiliki klorofil, berbentuk filamen, bereproduksi secara aseksual maupun seksual dan termasuk organisme heterotrof (Webster & Weber 2007: 1). Fungi dapat ditemukan tumbuh pada beberapa habitat, seperti *Aureobasidium pullulans* (de Bary 1957) di hutan mangrove, *Rhizophylactis rosea* (de Bary & Woronin 1981) di perairan tawar, dan *Aspergillus ochraceus* (Wilhelm 1877) di laut. Fungi mampu hidup sebagai saprofit, parasit atau simbion. Sebagai saprofit, fungi mendapatkan nutrisi dengan mengurai serasah-serasah atau organisme mati dan memiliki peran dalam siklus nutrisi. Contoh fungi saprofit adalah *Fusarium* sp. dan *Paecilomyces* sp. Fungi parasit memperoleh nutrisi dari organisme hidup, contohnya adalah *Coelomyces* yang hidup pada nyamuk. Fungi juga dapat bersimbion dengan tumbuhan dan dikenal sebagai mikorhiza (Gandjar dkk. 2006: 37, 106--111). Dinding sel fungi tersusun atas senyawa kitin, glukukan, dan manan (Kavanagh 2005: 211). Penyerapan nutrisi oleh fungi dilakukan melalui hifa-hifa dengan terlebih dahulu mengekresikan enzim ekstraseluler untuk mengurai nutrisi kompleks menjadi nutrisi sederhana (Hogg 2005: 199).

Berdasarkan reproduksi seksual, fungi dibedakan menjadi 5 filum yaitu *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Glomeromycota*, *Zygomycota* dan *Chytridiomycota* (Deacon 2006: 16). *Basidiomycota* bereproduksi seksual menggunakan basidiospora yang dihasilkan oleh basidium, sebagai contoh adalah *Amanita phalloides* (Link 1833) dan *Cryptococcus neoformans* (Vuillemin 1901) ( Webster & Weber 2007: 488). *Ascomycota* memiliki askus untuk memproduksi spora seksual berupa askospora. Contoh *Ascomycota* adalah *Aspergillus fumigatus* (Fresenius 1863) dan *Neurospora crassa* (Shear & Dodge 1927). *Glomeromycota* sering ditemukan hidup berasosiasi dengan akar tanaman sehingga disebut sebagai

*Arbuscular Mycorrhizal* (AM) dan merupakan fungi yang belum diketahui reproduksi seksualnya. *Zygomycota* bereproduksi seksual dengan menghasilkan zigospora, contohnya adalah *Mucor* (Fresenius 1850), *Rhizopus* (Ehrenberg 1820), dan *Phycomyces* (Kunze 1823). *Chytridiomycota* dikenal dengan istilah “*chytrids*”, spora seksual berupa zoospora dan bersifat motil karena memiliki flagel. Contoh *Chytridiomycota* adalah *Olpidium brassicae* (Dangeard 1886), *Basidiobolus ranarum* (Eidam 1886) dan *Allomyces arbuscula* (Bulter 1911) (Deacon 2006: 21, 23, 24, 27).

Berdasarkan morfologi, fungi dibedakan menjadi 3 kelompok, yaitu kapang (*mold*), cendawan (*mushroom*), dan khamir (*yeast*) (Madigan dkk. 2012: 601). Kapang dan cendawan (*mushroom*) merupakan fungi multiseluler (Hogg 2005 : 198). Kapang memiliki struktur berbentuk filamen, sedangkan cendawan memiliki struktur berupa tubuh buah. Khamir merupakan fungi uniseluler dan memiliki bentuk berupa sel tunggal (Madigan dkk. 2012: 602, 605, 607).

Kapang dikelompokkan ke dalam filum *Ascomycota*, *Basidiomycota*, dan *Zygomycota*. Kapang bereproduksi aseksual dengan menghasilkan spora aseksual, sedangkan reproduksi seksual menggunakan spora seksual seperti askospora, basidiospora, dan zigospora (Campbell dkk. 2003: 193). Dinding sel kapang tersusun atas senyawa kitin. Kapang menyerap nutrisi dari substrat menggunakan hifa substrat (hifa vegetatif). Hifa kapang dibedakan menjadi hifa monositik (hifa berinti satu) dan senositik (hifa berinti banyak). Hifa monositik dapat ditemukan pada *Aspergillus oryzae* (Cohn 1884), *Curvularia lunata* (Boedijn 1933) dan *Penicillium chrysogenum* (Thom 1910). Hifa senositik terdapat pada kelompok *Zygomycetes* (*Mucor* spp., *Rhizopus* spp., dan *Absidia* spp.) (Gandjar dkk. 2006: 11, 12, 17).

Khamir dikelompokkan ke dalam filum *Ascomycota* dan *Basidiomycota*. Sel khamir memiliki ukuran panjang 20--50  $\mu\text{m}$  dan lebar 1--10  $\mu\text{m}$ . Sel khamir memiliki beberapa bentuk misalnya elips pada *Saccharomyces*, silindris pada *Schizosaccharomyces*, ogival pada *Brettanomyces* dan bentuk lemon pada *Saccharomyces* (Kavanagh 2005: 3). Dinding sel khamir tersusun atas senyawa glukukan dan manan (Gandjar dkk. 2006: 18).

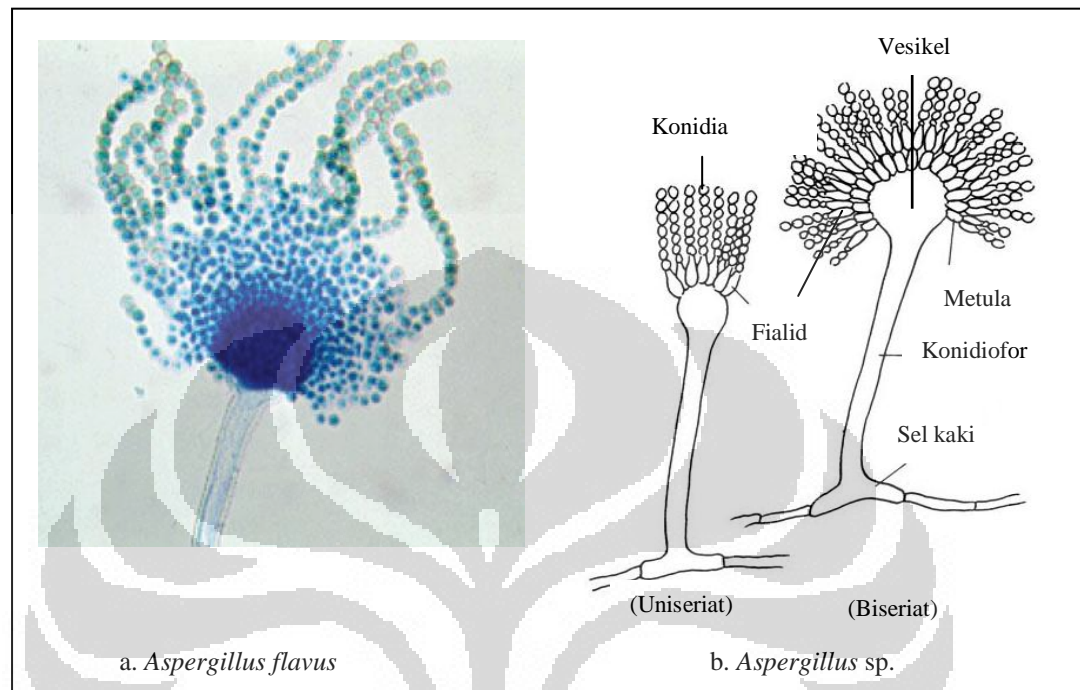
Reproduksi aseksual pada khamir dilakukan dengan cara pembelahan sel (*fission*), pertunasan (*budding*), dan produksi konidia dari sterigmata. Reproduksi aseksual dengan cara pembelahan sel (*fission*) terjadi pada genus *Schizosaccharomyces* (Lindner 1983). Berdasarkan tempat terjadinya tunas, pertunasan pada khamir dibedakan menjadi 3 tipe, yaitu monopolar, bipolar dan multipolar. Pertunasan monopolar hanya terjadi pada satu kutub saja, contohnya pada *Malassezia pachydermatis* (Dodge 1935). Pertunasan pada dua kutub disebut pertunasan bipolar, contohnya pada *Hanseniaspora osmophila* (Phaff, Miller & Shifrine 1956), sedangkan pertunasan pada beberapa kutub di permukaan sel disebut pertunasan multipolar, contohnya pada *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex.E.C. Hansen 1883). Reproduksi seksual khamir menggunakan askospora dan basidiospora (Gandjar *dkk.* 2006: 65--66).

## 2.2. *Aspergillus flavus*

Koloni *Aspergillus flavus* yang ditumbuhkan pada medium *Czapek's Dox* setelah 7 hari berwarna hijau kekuningan dan mencapai diameter 3--5 cm. Kepala konidia radial, dan berwarna hijau kekuningan. Konidiofor berwarna hialin, bertekstur kasar, dan panjang 1,0--2,5 mm. Vesikel berbentuk semibulat hingga bulat dan berdiameter 25--45  $\mu\text{m}$ . Fialid terbentuk langsung pada vesikel (uniseriat) atau metula (biseriat), dan berukuran (6--10) x (4,0--5,5)  $\mu\text{m}$ . Metula berukuran (6,5--10) x (3--5)  $\mu\text{m}$ . Konidia berbentuk semibulat hingga bulat, berdiameter 3--6  $\mu\text{m}$ , dan berwarna hijau pucat (Samson *dkk.* 1984: 58; Gandjar *dkk.* 1999: 22).

*Aspergillus flavus* dapat tumbuh pada substrat dengan kandungan air (*water activity*) 0,86--0,96 (Vujanovic *dkk.* 2001: 5), suhu 12--48° C, dan pertumbuhan optimal terjadi pada suhu 37° C (Hedayati *dkk.* 2007: 1677). *Aspergillus flavus* disebut sebagai kapang gudang (*storage mould*) karena mengkontaminasi dan merusak bahan pangan pokok yang disimpan di dalam gudang seperti kacang tanah (Kasno 2004: 79), jagung (Miskiyah & Widaningrum

2008: 2), rempah-rempah, sereal, buah-buahan yang sudah dikeringkan (Gandjar *dkk.* 1999: 22), kacang hijau dan kedelai (Gandjar *dkk.* 2006: 100).



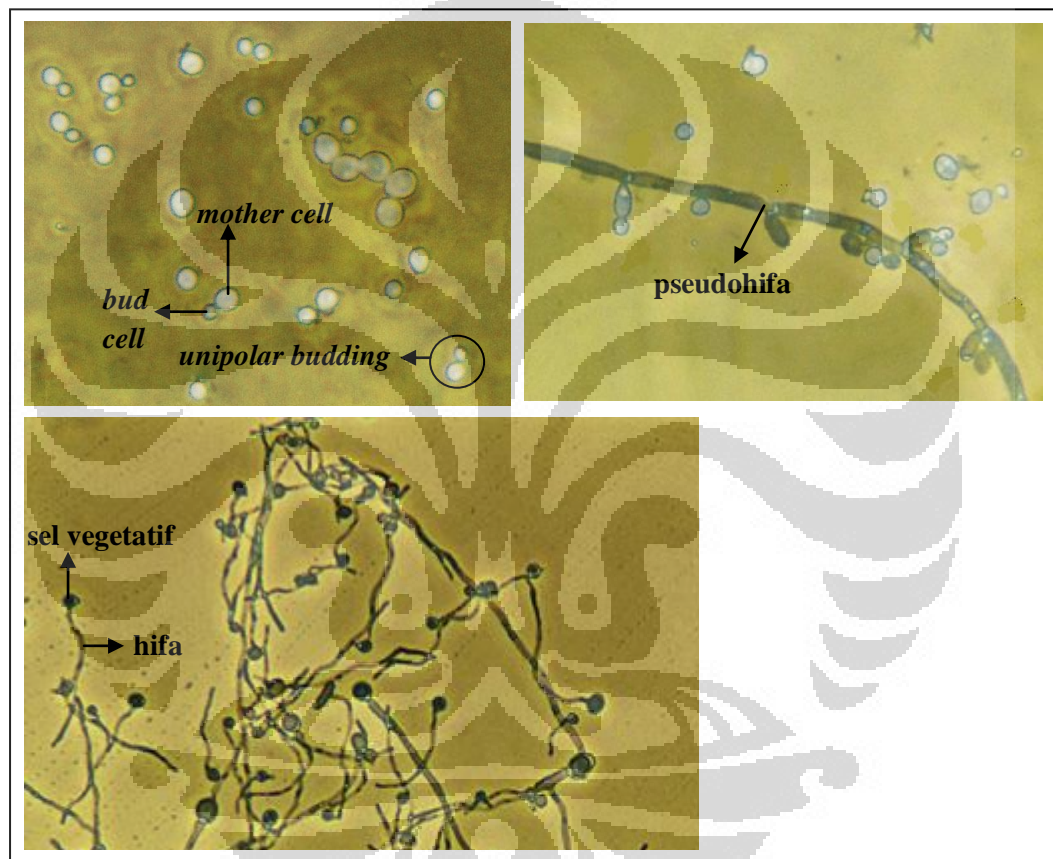
Gambar 2.2. Struktur morfologi mikroskopik *Aspergillus*  
[Sumber: Collins & Lyne 2004: 422; Hedayati *dkk.* 2007: 1682, diterjemahkan sesuai aslinya.]

### 2.3. *Candida albicans*

*Candida albicans* merupakan khamir dari kelompok *Ascomycetes*. Koloni *C. albicans* yang ditumbuhkan pada *Corn Meal Agar* (CMA) setelah 7 hari pada suhu 25° C berwarna putih hingga krem, permukaan mengilap, bertekstur *butyrous* (seperti mentega), *soft* (lembut), dan *smooth* (halus), dan pertumbuhan pada *glucose-yeast extract-peptone* cair setelah 3 hari pada suhu 25° C. Sel *C. albicans* berbentuk bulat hingga semibulat, berukuran (3,5--6,0) x (4,0--8,0)  $\mu\text{m}$ , tersusun tunggal, berpasangan, berantai, dan berkelompok (Kurtzman & Fell 1998: 477).

*Candida albicans* dapat hidup dalam bentuk sel, hifa maupun pseudohifa, dan memiliki ciri khas dapat membentuk klamidospora dari hifa maupun

pseudohifa (Webster & Weber 2007: 277). Klamidospora merupakan sel berdinding tebal, berbentuk bulat, semibulat, atau silindris, terbentuk apabila kondisi lingkungan tidak menguntungkan, dan berfungsi sebagai *resting cell* yang akan berkecambah menjadi hifa apabila kondisi lingkungan mendukung perkecambahan (Gandjar dkk. 2006: 62). *Candida albicans* merupakan fungi patogen oportunistik dan dapat ditemukan dalam saluran pencernaan, saluran pernapasan, saluran kemih dan dalam aliran darah (Madigan dkk. 2012: 795; 926).



Gambar 2.3. Struktur morfologi mikroskopik *Candida albicans*  
[Sumber: Staniszewska dkk. 2011: 7--8.]

#### 2.4. Metabolit Sekunder

Metabolisme merupakan keseluruhan proses kimia yang terjadi di dalam sel hidup organisme untuk mendapatkan nutrisi. Proses kimia tersebut berupa anabolisme dan katabolisme. Anabolisme adalah proses pembentukan nutrisi,

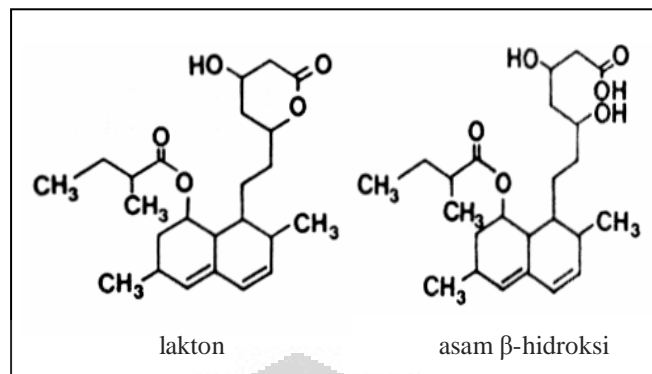


sedangkan katabolisme adalah proses pemecahan nutrisi (Madigan *dkk.* 2012: 86). Berdasarkan produk yang dihasilkan, metabolisme terdiri atas metabolisme primer dan metabolisme sekunder (Kavanagh 2005: 115).

Fungi melakukan metabolisme primer untuk menghasilkan metabolit primer yang dibutuhkan bagi pertumbuhan (Kavanagh 2005: 115). Sebaliknya, metabolisme sekunder pada fungi menghasilkan produk ekstraseluler berupa metabolit sekunder yang tidak dibutuhkan bagi pertumbuhan (Griffin 1981: 95). Menurut Hanson (2008: 22) metabolit sekunder memiliki efek sebagai alat pertahanan diri terhadap organisme lain. Metabolit sekunder memiliki beberapa karakter, yaitu setiap jenis metabolit sekunder hanya diproduksi oleh organisme tertentu, metabolit sekunder tidak memiliki peranan penting dalam pertumbuhan dan reproduksi, pembentukan metabolit sekunder dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan mikroorganisme, misalnya ketersediaan nutrisi, pH dan suhu, setiap spesies mampu menghasilkan lebih dari satu senyawa metabolit sekunder yang berbeda-beda (Madigan *dkk.* 1997: 434).

*Aspergillus flavus* memiliki kemampuan menghasilkan senyawa metabolit sekunder, misalnya lovastatin (Samiee *dkk.* 2003: 31). Rafliyanti (2010: 32) melaporkan bahwa *Aspergillus flavus* UICC 360 mampu memproduksi lovastatin. Lovastatin, umumnya dikenal sebagai obat antihiperkolesterolemia yang bekerja dengan menghambat enzim *hydroxymethylglutaryl coenzyme A* (HMG-CoA) reduktase dalam mengkatalisis HMG-CoA menjadi mevalonat selama proses biosintesis kolesterol. Lovastatin terdapat dalam 2 bentuk, yaitu asam  $\beta$ -hidroksi dan lakton (Gambar 2.4) (Samiee *dkk.* 2003: 29). Namun demikian, dari beberapa penelitian, lovastatin diketahui memiliki kemampuan antifungi. Ferrón *dkk.* (2005: 125) melaporkan bahwa lovastatin dari *Aspergillus terreus* ATCC 20542 mampu menghambat pertumbuhan *C. albicans*. Lovastatin bentuk asam  $\beta$ -hidroksi yang dihasilkan oleh *Aspergillus terreus* ATCC 20541 terbukti mampu menghambat pertumbuhan *Neurospora crassa* dan *Rhodotorula rubra* (Kumar *dkk.* 2000: 103).





Gambar 2.4 Struktur kimia lovastatin  
[Samiee *et al.* 2003: 29.]

Lovastatin merupakan produk metabolit sekunder yang dibentuk melalui jalur pembentukan (*biosynthetic pathway*) poliketida (Manzoni & Rollini 2002: 558). Jalur pembentukan poliketida melibatkan prekursor berupa asetil-CoA. Jalur pembentukan poliketida dimulai dengan karboksilasi asetil-CoA membentuk malonil-CoA. Sebanyak tiga molekul malonil-CoA tersebut akan berkondensasi dengan asetil-CoA membentuk susunan rantai. Susunan rantai tersebut selanjutnya mengalami siklisasi membentuk struktur cincin yang akan termodifikasi menjadi berbagai produk, misalnya antibiotik seperti griseofulvin dari *Penicillium griseofulvum*, okratoksin dari genus *Penicillium* dan *Aspergillus*, dan patulin dari *Penicillium patulum* (Deacon 2006: 135). Selain digunakan dalam metabolisme sekunder, Asetil-CoA juga digunakan dalam metabolisme primer, misalnya untuk biosintesis lipid (Hogg 2005: 149).

## 2.5. Nitrogen

Nitrogen merupakan salah satu makronutrien penting bagi semua makhluk hidup. Nitrogen berperan sebagai komponen biosintesis asam amino, protein, asam nukleat pada sel dan metabolit sekunder (Hogg 2005: 80). Nitrogen terdapat dalam bentuk senyawa organik dan anorganik. Sumber nitrogen organik, misalnya urea, asam amino, dan asam glutamat, sedangkan nitrogen anorganik,

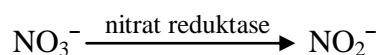
misalnya ammonium nitrat, potassium nitrat, ammonium sulfat, dan natrium nitrat (Bilgrami & Verma 1981: 212--213; Gandjar *dkk.* 2006: 32--33).

### 2.5.1. Peran Nitrogen bagi Kapang

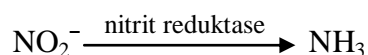
Kapang merupakan organisme heterotrof yang memanfaatkan senyawa organik sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan metabolisme. Namun demikian, kapang juga dapat menggunakan senyawa anorganik (Gandjar *dkk.* 2006: 24). Sumber nitrogen organik memiliki potensi untuk meningkatkan pertumbuhan sel kapang, sedangkan sumber nitrogen anorganik berpotensi sebagai prekursor untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder. Carels dan Shepherd (1977:1) melaporkan bahwa sumber nitrogen organik mampu meningkatkan sporulasi sel *Monascus* secara optimal, namun kurang potensial apabila digunakan untuk produksi pigmen dari *Monascus*, sedangkan sumber nitrogen anorganik mampu meningkatkan produksi pigmen dari *Monascus*. Menurut Griffin (1981: 138) nitrogen dibutuhkan oleh kapang dalam jumlah  $\pm 10^{-3}$  M.

### 2.5.2. Nitrat

Salah satu nitrogen anorganik yang dapat digunakan oleh kapang terdapat dalam bentuk nitrat, misalnya  $\text{NaNO}_3$ . *Aspergillus* dan *Neurospora* merupakan kapang yang mampu menggunakan nitrat sebagai sumber nitrogen (Marzluf 1997: 17). Nitrat dapat digunakan oleh kapang sebagai sumber nitrogen melalui proses penguraian dengan melibatkan enzim nitrat reduktase dan nitrit reduktase. Enzim nitrat reduktase akan mengubah nitrat menjadi nitrit



dan enzim nitrit reduktase yang mengubah senyawa nitrit menjadi amonium



kemudian amonium akan diasimilasi menjadi senyawa glutamat dan glutamin. Kedua senyawa tersebut berperan dalam metabolisme seluler, baik metabolisme primer maupun metabolisme sekunder (Kavanagh 2005: 25--26). Penggunaan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) dapat menyebabkan perubahan pH medium fermentasi menjadi basa karena adanya pelepasan ion  $\text{OH}^-$  ke lingkungan medium sehingga terjadi peningkatan pH dalam medium (Bago *dkk.* 1996: 278).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penggunaan  $\text{NaNO}_3$  sebagai sumber nitrogen dapat mengoptimalkan produksi metabolit sekunder. Bao-Jun Xu *dkk.* (2005: 83) melaporkan bahwa penggunaan  $\text{NaNO}_3$  oleh *Monascus ruber* menghasilkan lovastatin dengan jumlah tertinggi dibandingkan dengan sumber nitrogen lain. Jain dan Pundir (2010: 73) menunjukkan bahwa kemampuan antifungi *Aspergillus terreus* terhadap *C. albicans* lebih tinggi saat menggunakan  $\text{NaNO}_3$  dibandingkan sumber nitrogen lain.

## 2.6. Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu proses katabolisme senyawa organik yang menghasilkan energi (Stanbury *dkk.* 2003: 1). Berdasarkan substrat, fermentasi dibedakan menjadi fermentasi substrat padat (*solid substrate fermentation*) dan fermentasi cair (*liquid substrate fermentation*). Fermentasi substrat padat berlangsung dalam medium padat, seperti daging, singkong, beras, dan agar, sedangkan fermentasi substrat cair berlangsung dalam medium cair, misalnya air kelapa, susu, dan sari buah (Gandjar *dkk.* 1992: 62).

Produksi senyawa antifungi dapat dilakukan menggunakan fermentasi substrat cair. Jackson *dkk.* (1995: 609) menggunakan fermentasi substrat cair dengan pengocokan untuk memproduksi fuscasandin dari *Fusarium sambucinum*. Proses pengocokan berfungsi menghomogenkan inokulum dan nutrisi dalam medium. Proses tersebut memberikan keuntungan berupa kontak antara nutrisi dengan mikroorganisme terjadi optimal, sehingga memungkinkan penyerapan nutrisi oleh mikroorganisme secara optimal (Stanbury *dkk.* 2003: 154).

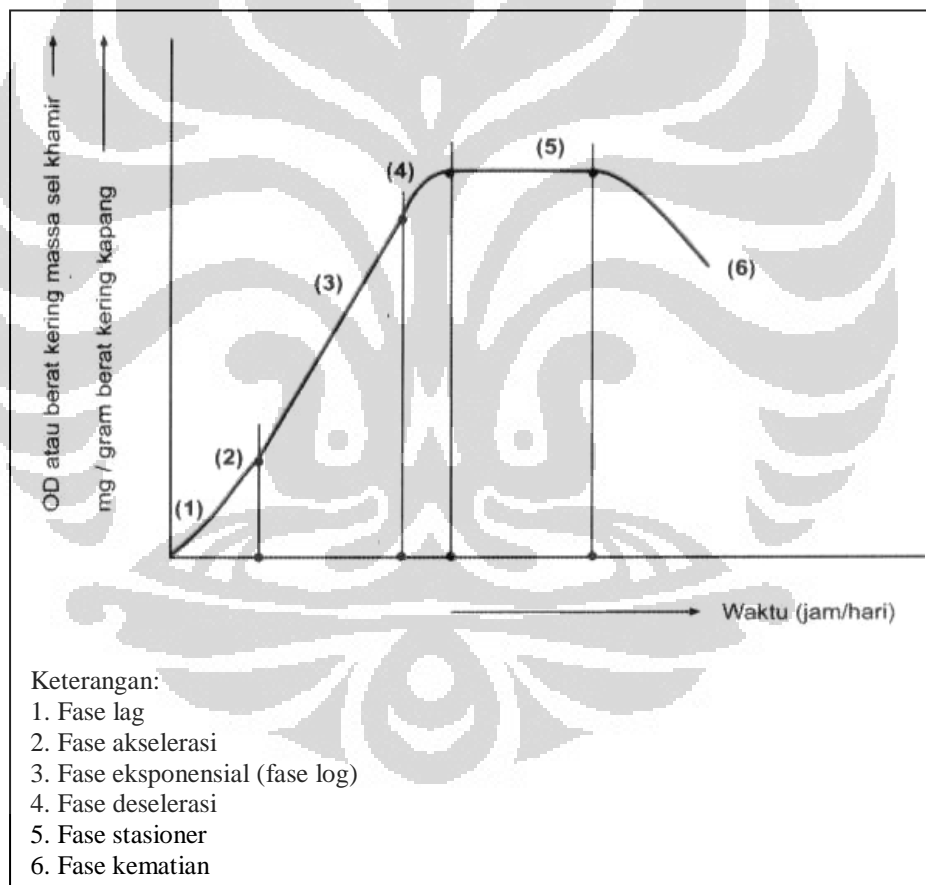
Proses fermentasi dipengaruhi oleh kondisi suhu dan derajat keasaman (pH). Suhu menentukan kecepatan pertumbuhan mikroorganisme. Peningkatan suhu mengakibatkan aktivitas enzim dan metabolisme sel meningkat. Namun demikian, suhu yang terlalu tinggi dapat merusak aktivitas enzim sehingga metabolisme sel menjadi terganggu, sedangkan suhu yang terlalu rendah menyebabkan enzim kehilangan kemampuan aktivasi sehingga metabolisme tidak terjadi. Derajat keasaman (pH) menyatakan konsentrasi ion  $H^+$  dan  $OH^-$  dalam lingkungan. Tingginya konsentrasi ion  $H^+$  dalam lingkungan menyebabkan pH asam, sedangkan tingginya konsentrasi ion  $OH^-$  dalam lingkungan menyebabkan pH basa (Madigan *dkk.* 1997: 162, 168). Menurut Griffin (1981: 162) sebagian besar kapang mengalami pertumbuhan optimal pada pH 4--7.

Proses fermentasi juga dipengaruhi oleh ketersediaan oksigen (aerasi) dan medium fermentasi. Ketersediaan oksigen (aerasi) diperlukan oleh organisme untuk melakukan proses respirasi selama pertumbuhan. Medium fermentasi harus berisi nutrisi, baik makronutrien maupun mikronutrien yang dibutuhkan oleh mikroorganisme. Makronutrien dibutuhkan sebesar  $10^{-3}$  M dan mikronutrien sebesar  $10^{-9}$  M. Makronutrien meliputi C, H, O, N, P, S, K, Mg, dan Ca, sedangkan mikronutrien meliputi Fe, Cu, Mn, dan Zn. Keseluruhan nutrisi tersebut berperan dalam metabolisme sel (Griffin 1981: 138, 150--152).

## 2.7. Pertumbuhan Mikroorganisme

Pertumbuhan adalah terjadinya peningkatan jumlah sel yang dihasilkan dari proses pembelahan (Madigan *dkk.* 2012: 3). Terdapat beberapa fase pertumbuhan pada mikroorganisme, yaitu fase lag, fase akselerasi, fase eksponensial, fase deselerasi, fase stasioner, dan fase kematian. Fase lag merupakan fase saat sel-sel mulai beradaptasi dengan lingkungan substrat dan sel-sel mulai membentuk enzim-enzim untuk mengurai substrat. Fase akselerasi adalah fase saat sel-sel mulai mengalami pembelahan. Fase eksponensial merupakan fase yang menunjukkan terjadinya peningkatan aktivitas sel, seperti pembelahan sel sehingga jumlah sel meningkat. Fase tersebut umumnya

dimanfaatkan untuk proses pemanenan enzim-enzim mikroorganismenya. Fase deselerasi adalah akhir dari fase eksponensial. Pada fase deselerasi, sel-sel mulai kurang aktif dalam melakukan pembelahan. Proses pemanenan biomassa sel dapat dilakukan pada fase deselerasi. Fase stasioner menunjukkan keadaan jumlah sel yang hidup relatif seimbang dengan jumlah sel yang mati. Pada fase stasioner terjadi proses metabolisme sekunder yang menghasilkan senyawa-senyawa metabolit sekunder. Fase kematian menunjukkan bahwa sel-sel telah mati karena terjadinya kekurangan atau bahkan ketidakterediaan nutrisi untuk pertumbuhan (Gandjar *dkk.* 2006: 39). Fase-fase pertumbuhan mikroorganismenya dapat dilihat pada kurva pertumbuhan pada Gambar. 2.7.



Gambar 2.7. Kurva pertumbuhan fungi  
[Sumber: Gandjar *dkk.* 2006: 40.]

Kurva pertumbuhan dapat digunakan untuk menetapkan waktu optimal fermentasi berdasarkan produk yang ingin diperoleh (Razak *dkk.* 2009: 5). Fermentasi cair selama 8 hari dilakukan oleh Oshoma dan Ikenebomeh (2005: 33) untuk memproduksi biomassa *Aspergillus niger*. Atalla *dkk.* (2008: 7) melakukan fermentasi cair selama 7 hari terhadap *Aspergillus terreus* untuk menghasilkan lovastatin. Produksi lovastatin dari *Aspergillus fischeri* NCIM 509 dilaporkan oleh Chanakya *dkk.* (2011: 10) terjadi optimal dengan inkubasi selama 7 hari, selanjutnya terjadi penurunan produksi. Vidyalakshmi *dkk.* (2009: 26) menggunakan fermentasi pada selama 15 hari untuk memproduksi pigmen berwarna merah yang merupakan senyawa monascorubrin dari *Monascus ruber*.

## 2.8. Senyawa Antifungi

Senyawa antifungi dapat berperan sebagai fungisidal dan fungistatik. Fungisidal adalah senyawa yang dapat membunuh fungi, sedangkan fungistatik merupakan senyawa yang hanya bersifat menghentikan atau menghambat pertumbuhan fungi (Hawser & Islam 1999: 411). Menurut Bhanderi *dkk.* (2009: 204--205) berdasarkan mekanisme penghambatan antifungi dapat dibedakan menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok antifungi yang menghambat biosintesis ergosterol, *polyene* dan *5-flucytosin* (5-FC).

Antifungi yang menghambat biosintesis ergosterol, misalnya dari golongan *azole* (*fuconazole*, *itraconazole*). Antifungi tersebut bekerja dengan menghambat enzim sitokrom P-450 (*C-14- $\alpha$ -demethylase*) yang berperan dalam mengubah lanosterol menjadi ergosterol, sehingga pembentukan ergosterol menjadi terhambat. Ergosterol merupakan sterol pada membran fungi yang berfungsi mempertahankan fluiditas dan rigiditas membran fungi. Membran berperan sebagai tempat transportasi nutrisi dan oksigen dari luar ke dalam sel dan transportasi sisa metabolisme sel ke luar sel. Terhambatnya pembentukan ergosterol dapat menyebabkan gangguan pada fungsi membran tersebut sehingga menyebabkan kematian sel. Antifungi tersebut diketahui mampu membunuh *C. albicans*, *C. glabrata*, *Fusarium* spp., dan *Aspergillus* spp. (Andriole 1999: 153).

*Polyene*, contohnya adalah amphotericin B dan nistatin. Antifungi kelompok *polyene* bekerja dengan cara merusak membran sel fungi. Proses perusakan diawali dengan menempelnya antifungi pada membran sel fungi. Selanjutnya terbentuk suatu saluran (*channel*) yang menyebabkan kebocoran pada dinding sel dan sel kehilangan elektrolit ( $K^+$ ). Hal tersebut mengakibatkan keseimbangan gradien proton membran terganggu sehingga sel mengalami kematian (Bhanderi dkk. 2009: 2005).

Antifungi *5-flucytosine* (5-FC) merupakan antifungi yang bekerja dengan menghambat sintesis DNA dan sintesis protein. Antifungi tersebut masuk ke dalam sel fungi dengan bantuan enzim sitosin permease. Bentuk 5-FC akan mengalami deaminasi dengan bantuan enzim sitosin deaminase menjadi *5-fluorouracil* (5-FU). Selanjutnya 5-FU akan terkonversi menjadi *5-fluoro-dUMP* (FUMP) dan *5-fluoro-dUTP* (FUTP). FUMP merupakan inhibitor spesifik terhadap *thymidylatesynthetase*, yaitu suatu enzim yang berperan dalam sintesis DNA, sedangkan FUTP akan bergabung dengan RNA sehingga sintesis protein terhambat (Bhanderi dkk. 2009: 205).

Mekanisme penghambatan oleh senyawa antifungi juga dapat terjadi dengan menghambat sintesis glukan sel fungi (Vicente dkk. 2003: 16). Glukan merupakan penyusun dinding sel fungi. Dinding sel berperan untuk melindungi dan memberi bentuk pada sel. Antifungi tersebut bekerja dengan menghambat enzim  $\beta$ -1,3-*glucan synthase* dalam mensintesis pembentukan glukan pada dinding sel fungi. Contoh antifungi tersebut adalah *echinocandin* dan *pneumocandin* yang menghambat sintesis glukan pada *C. albicans* (Didomenico 1999: 511).

Kemampuan kapang sebagai penghasil senyawa antifungi telah dilaporkan. *Aspergillus fumigatus* (Fresenius 1863) dilaporkan menghasilkan senyawa gliotoksin yang mampu menghambat pertumbuhan *C. albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* (Castellani & Chalmers 1919), dan *Trichophyton rubrum* (Sabouraud 1911) (Coleman dkk. 2011: 1). *Fusarium sambucinum* (Fueckel 1870) menghasilkan senyawa *fuscasandin* yang menghambat pertumbuhan *C. albicans* (Jackson 1995: 608). *Cryptocandin* merupakan

senyawa antifungi dari golongan *echinocandin*, dihasilkan oleh *Cryptosporiopsis quercina* (Pettrak 1924), mampu menghambat pertumbuhan *C. albicans* dan *Histoplasma capsulatum* (Darling 1906) (Strobel *dkk.* 1999: 1925).

## 2.9. Ekstraksi Metabolit Sekunder

Ekstraksi adalah pemisahan senyawa dari bahan padat atau cair dengan menggunakan pelarut sebagai ekstraktor. Pemisahan terjadi karena adanya kemampuan senyawa untuk larut dalam pelarut. Proses ekstraksi melibatkan 3 tahap, yaitu pencampuran, pemisahan, dan isolasi. Proses pencampuran dilakukan dengan mencampurkan bahan padat atau cair dengan pelarut sehingga terjadi saling kontak. Selama proses tersebut, senyawa dari bahan akan terlarut dalam pelarut berdasarkan sifat kepolaran, sehingga akan terbentuk dua lapisan larutan, yaitu lapisan berisi ekstrak dan lapisan berisi sisa bahan. Proses pemisahan dapat dilakukan menggunakan kertas saring, sehingga diperoleh cairan berisi ekstrak. Proses isolasi bertujuan mendapatkan ekstrak murni yang telah terpisah dari pelarut. Proses tersebut dilakukan dengan menguapkan filtrat menggunakan evaporator sehingga diperoleh ekstrak dalam bentuk kering atau pekat (Bernasconi *dkk.* 1995: 177--178).

Keberhasilan ekstraksi sangat dipengaruhi oleh sifat pelarut. Beberapa hal perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut, yaitu pelarut bersifat selektif artinya pelarut hanya melarutkan ekstrak yang diinginkan, tidak menyebabkan perubahan kimiawi pada komponen-komponen bahan yang diekstraksi, dan tidak eksplosif bila bercampur dengan udara serta memiliki kestabilan kimiawi dan suhu (Bernasconi *dkk.* 1995: 179--181). Contoh pelarut dalam proses ekstraksi adalah metanol, etanol, etil asetat, kloroform, dan eter (Gritter *dkk.* 1991: 84).

Rafliyanti (2010: 12) menggunakan etil asetat dalam mengekstraksi lovastatin dari *Aspergillus flavus* UICC 360. Etil asetat merupakan pelarut semipolar sehingga hanya senyawa-senyawa semipolar yang dapat terlarut (Suhirman *dkk.* 2006: 32). Khopkar (2002: 86--87) menyatakan bahwa senyawa yang bersifat polar akan terlarut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa yang



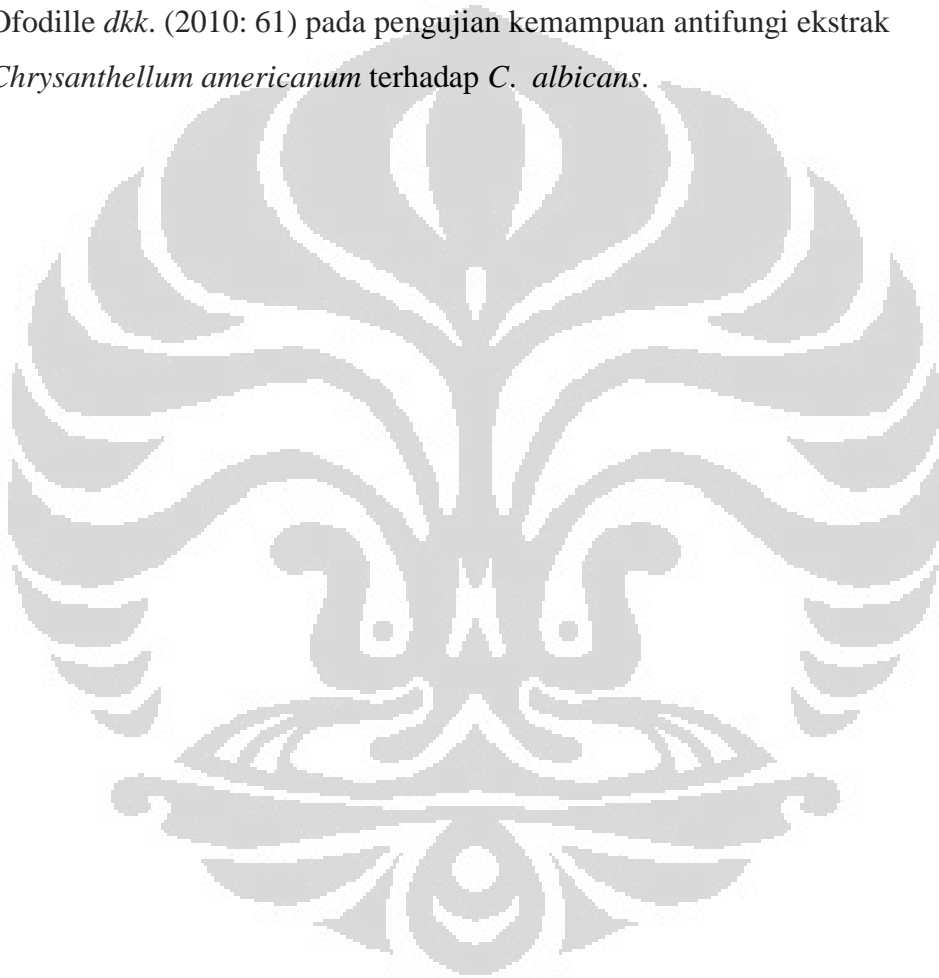
bersifat nonpolar akan terlarut dalam pelarut nonpolar. Menurut Sayyad *dkk.* (2007: 1055), lovastatin adalah senyawa yang bersifat semipolar sehingga dapat terlarut dalam etil asetat. Kumar *dkk.* (2000: 102), Samiee *dkk.* (2003: 30), dan Ferrón *dkk.* (2005: 124) juga menggunakan pelarut etil asetat untuk mengekstraksi lovastatin dari *Aspergillus terreus*. Senyawa semipolar dari kapang *Aspergillus* di antaranya adalah aflatoksin (Kosalec & Pepeljnjak 2005: 367), gliotoksin (Kosalec *dkk.* 2005: 271), flufuran (Evidente *dkk.* 2009: 333), dan okratoksin (Chakraborty & Verma 2010: 64).

## 2.10. Pengujian Kemampuan Antifungi

Uji kemampuan antifungi merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui kemampuan suatu senyawa antifungi terhadap mikroorganisme uji (Wu 2010: 1). Salah satu metode pengujian tersebut adalah metode difusi agar cara cakram, dilakukan dengan meletakkan kertas cakram berisi tetesan senyawa antifungi di atas permukaan medium agar yang telah diinokulasikan dengan mikroorganisme uji. Kemampuan suatu senyawa antifungi dapat dilihat dari adanya zona hambat (*zone inhibition*) di sekitar kertas cakram. Zona hambat merupakan daerah bening di sekitar kertas cakram dan tidak terdapat pertumbuhan mikroorganisme uji. Semakin besar zona hambat yang terbentuk, maka senyawa antifungi semakin efektif dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji (Hogg 2005: 368).

Keberhasilan terbentuknya zona hambat dipengaruhi oleh medium dan inokulum. Medium untuk uji aktivitas antifungi harus berisi nutrisi-nutrisi untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme uji dan tidak berisi zat yang berperan antagonis terhadap senyawa antifungi. Zona hambat yang terbentuk pada agar juga dipengaruhi oleh ketebalan medium. Ketebalan medium yang disarankan berkisar antara  $4 \pm 0,5$  mm. Standar jumlah inokulum yang digunakan memiliki kisaran kepadatan sel  $10^4$ -- $10^8$  CFU/ml (Collins & Lyne 2004: 169).

Berbagai penelitian tentang pengujian kemampuan antifungi menggunakan metode difusi agar cara cakram telah dilaporkan. Akmal *dkk.* (1993: 109) menggunakan metode difusi agar cara cakram pada uji kemampuan antifungi dari *Streptomyces* sp. terhadap *Aspergillus niger* (Tieghem 1867). Metode difusi agar cara cakram juga dilakukan oleh Herlina (2009: 3) untuk membuktikan bahwa *Trichoderma harzianum* (Rifai 1969) memiliki kemampuan antifungi terhadap fungi patogen pada buah tomat, yaitu *Fusarium oxysporum* (Schlechtendal 1824). Ofodille *dkk.* (2010: 61) pada pengujian kemampuan antifungi ekstrak *Chrysanthellum americanum* terhadap *C. albicans*.



## 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 dilakukan selama 6 bulan, dimulai dari bulan Mei 2011 hingga Oktober 2011.

### 3.2. Alat

Peralatan yang digunakan selama penelitian berlangsung adalah autoklaf [Hirayama], oven [Heraeus], lemari pendingin [Gassio], timbangan digital [Acculab model 121], timbangan analitik [Sartorius], vortex [Bio-Rad], *transfer box*, inkubator *shaker* [OSK], tabung reaksi, labu Erlenmeyer 250 ml [Iwaki Pyrex], mikroskop cahaya [Boeco], mikroskop binokular [Zeiss], mikropipet [Gilson], tips 100  $\mu$ l, tips 1000  $\mu$ l, mikroskop trinokular [Carl Zeiss], corong pemisah [Duran], *rotary evaporator* [Boeco RVO 400SD], gelas ukur, cawan petri steril, jarum tanam tajam, jarum tanam bulat (*ose*), spatel *drygalsky*, gelas objek dan kaca penutup, gelas *beaker*, dispenser, penangas air, kamera, jangka sorong, botol alkohol, pembakar spirtus, rak tabung reaksi, gunting, pinset dan korek api. Analisis data menggunakan peralatan *software* perhitungan statistik [*Statistical Product and Service Solution (SPSS) 16.0 for Windows*] dan *software* tabulasi data [*Ms. Office Excel 2007*].

### 3.3. Bahan

#### 3.3.1. Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian yaitu biakan *Aspergillus flavus* UICC 360 dan *Candida albicans* UICC Y-29. *Aspergillus flavus* UICC 360 digunakan sebagai mikroorganisme penghasil senyawa antifungi, sedangkan *Candida albicans* UICC Y-29 digunakan sebagai mikroorganisme uji kemampuan antifungi. Kedua spesies tersebut merupakan koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC) Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi FMIPA-UI.

#### 3.3.2. Medium

Medium untuk pertumbuhan kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA), sedangkan untuk pertumbuhan khamir *Candida albicans* UICC Y-29 adalah *Yeast Malt Agar* (YMA). Medium untuk fermentasi adalah *Czapek's Dox Broth* (CDB) dengan konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  yang dimodifikasi.

#### 3.3.3. Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan terdiri atas  $\text{NaNO}_3$  [Merck],  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  [Merck],  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  [Merck], KCl [Analar],  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  [Merck], sukrosa [Britania], HCl [Merck], NaOH [Merck], *yeast extract* [Bacto], *malt extract* [BD], *peptone* [Merck], etil asetat, nistatin [Pharos], alkohol 70% teknis, aseton teknis, spiritus, dan *lactophenol cotton blue* [Merck].

### 3.3.4. Bahan Habis Pakai

Bahan habis pakai yang digunakan adalah kertas saring, kertas pH [Merck], plastik tahan panas [Bell], masker, tissue gulung, kapas, kertas *yellow pages*, karet gelang, dan kertas cakram (*paper disk*) 10 mm [Whatman no.1]

## 3.4. Cara Kerja

Skema cara kerja penelitian terdapat pada Lampiran 5--11.

### 3.4.1. Pembuatan Medium

#### 3.4.1.1. *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Medium PDA dibuat berdasarkan petunjuk pada kemasan. Sebanyak 39 g bubuk PDA ditambahkan akuades hingga volume akhir mencapai 1 l. Medium kemudian dipanaskan dengan penangas air hingga terlarut. Selanjutnya medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

#### 3.4.1.2. *Yeast Malt Agar* (YMA)

Medium YMA dibuat berdasarkan Gandjar *dkk.* (1992: 83). Sebanyak 3 g *yeast extract*, 3 g *malt extract*, 5 g pepton, 10 g glukosa dan 15 g agar ditambahkan akuades hingga volume akhir mencapai 1 l. Medium kemudian dipanaskan dengan penangas air hingga terlarut. Selanjutnya medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

### 3.4.1.3. *Czapek's Dox Broth* (CDB)

Medium CDB dibuat berdasarkan Gandjar *dkk.* (1992: 7) yang telah dimodifikasi. Modifikasi yang dilakukan adalah penggunaan  $\text{NaNO}_3$  dengan konsentrasi yang bervariasi (0 mM; 23 mM; 29 mM; 35 mM; 41 mM; dan 47 mM). Tiap konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  dicampur dengan 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g KCl, 0,01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , dan 30 g sukrosa. Sehingga diperoleh 6 medium CDB dengan konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  yang berbeda-beda dan digunakan sebagai medium perlakuan dalam fermentasi. Selanjutnya campuran bahan tersebut ditambahkan akuades hingga volume akhir mencapai 1 l. Medium kemudian dipanaskan hingga terlarut. Medium disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^\circ \text{C}$  dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

### 3.4.2. Pembuatan *Stock Culture* dan *Working Culture*

Pembuatan *stock culture* dan *working culture* dilakukan dengan menginokulasikan masing-masing biakan kapang dan khamir yang telah murni ke dalam 4 tabung reaksi berisi 5 ml agar miring, 2 tabung untuk biakan kapang dan 2 tabung untuk biakan khamir. Medium yang digunakan adalah PDA untuk kapang dan YMA untuk khamir. Inokulasi biakan kapang dilakukan dengan metode *streak* menggunakan jarum tanam tajam, sedangkan inokulasi biakan khamir menggunakan jarum tanam bulat (*ose*). Medium yang telah diinokulasikan masing-masing biakan selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang ( $27\text{--}30^\circ \text{C}$ ) selama 7 hari untuk biakan kapang dan 2 hari untuk biakan khamir. Dua tabung biakan digunakan sebagai *working culture* dan disimpan pada suhu ruang, sedangkan dua tabung lainnya digunakan sebagai *stock culture* dan disimpan dalam lemari pendingin bersuhu  $4^\circ \text{C}$ .

### 3.4.3. Pengamatan Morfologi Kapang dan Khamir

#### 3.4.3.1. Pengamatan Morfologi Kapang (*Aspergillus flavus* UICC 360)

Pengamatan morfologi kapang dilakukan untuk mengetahui deskripsi kapang berdasarkan morfologi. Pengamatan dilakukan dengan menginokulasikan biakan kapang dari *working culture* menggunakan metode *stab* 3 titik pada medium PDA dalam cawan petri. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang (27--30° C) selama 7 hari hingga bersporulasi. Pengamatan morfologi dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik berdasarkan Gandjar *dkk.* (1992: 25--28) pada 3 koloni kapang yang terbentuk sebagai pengulangan.

Pengamatan morfologi secara makroskopik meliputi warna koloni, warna sebalik koloni (*reverse colony*), tekstur koloni, ada tidaknya tetes eksudat (*exudates drops*), garis-garis radial (*radial furrow*), zona pertumbuhan (*growing zone*), sporulasi, zonasi, dan diameter koloni. Pengamatan morfologi secara mikroskopik meliputi bentuk dan ukuran kepala konidia, ukuran fialid, ukuran metula, sterigmata (biseriat atau uniseriat), bentuk dan diameter vesikel, ukuran konidiofor, jenis hifa, bentuk dan ukuran konidia. Pengamatan menggunakan mikroskop trinokular dari perbesaran terkecil hingga terbesar. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan program *infinity Analyze* yang terhubung dengan mikroskop trinokular. Pengamatan dilakukan pada 20 kepala konidia sebagai pengulangan. Hasil pengamatan dibandingkan dengan deskripsi *Aspergillus flavus* pada monograf *Pengenalan Kapang Tropik Umum* oleh Gandjar *dkk.* (1999), dan *Identification of Common Aspergillus Species* oleh Klich (2002).

#### 3.4.3.2. Pengamatan Morfologi Khamir (*Candida albicans* UICC Y-29)

Pengamatan morfologi khamir dilakukan untuk mengetahui deskripsi khamir berdasarkan morfologi. Pengamatan morfologi khamir dilakukan dengan menumbuhkan biakan khamir dari *working culture* pada medium YMA dalam cawan petri dan tabung reaksi dengan metode *streak* dan diinkubasi selama 2 hari

pada suhu ruang (27--30° C). Pengamatan morfologi khamir dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik berdasarkan Kurtzman & Fell (1998: 477).

Pengamatan morfologi secara makroskopik meliputi warna koloni, tekstur koloni, permukaan koloni, profil koloni, dan tepi koloni. Pengamatan morfologi secara makroskopik dilakukan pada biakan dalam cawan petri dan tabung reaksi menggunakan mikroskop binokular. Pengamatan morfologi secara mikroskopik meliputi bentuk sel, pola pertunasan, susunan sel, dan ukuran sel khamir. Pengamatan dilakukan pada 20 sel sebagai bentuk pengulangan. Pengamatan menggunakan mikroskop trinokular dari perbesaran terkecil hingga terbesar. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan program *infinity Analyze* yang terhubung dengan mikroskop trinokular. Hasil pengamatan dibandingkan dengan deskripsi *Candida albicans* pada monograf *The yeast: a taxonomic study* oleh Kurtzman & Fell (1998).

#### 3.4.4. Perhitungan Sel Kapang dan Khamir dengan Metode *Total Plate Count* (TPC)

Biakan kapang dan khamir dari *working culture*, masing-masing diinokulasi ke dalam tabung reaksi berisi 5 ml medium PDA miring dengan metode gores (*streak*). Jumlah goresan adalah 15 gores. Biakan kemudian diinkubasi selama 7 hari untuk kapang dan 2 hari untuk khamir pada suhu ruang (27--30° C). Sebanyak 5 ml akuades steril ditambahkan ke dalam tabung biakan dan dikeric menggunakan ose kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks hingga terbentuk suspensi sel kapang dan khamir. Masing-masing diencerkan menggunakan akuades steril hingga faktor pengenceran  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  untuk kapang dan  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  untuk khamir. Sebanyak 0,1 ml masing-masing suspensi dari tiga pengenceran terakhir disebar menggunakan *spatel Drygalski* di atas 15 ml medium PDA dalam cawan petri dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Medium tersebut diinkubasi selama 2 hari pada suhu ruang (27--30° C) untuk diamati dan dihitung jumlah koloninya. Jumlah sel kapang dan khamir per ml



sampel dihitung berdasarkan Cappuccino & Sherman (1996: 119) menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Jumlah CFU/ml} = \frac{\text{Rata-rata jumlah koloni}}{\text{Volume inokulum x faktor pengenceran}}$$

#### 3.4.5. Produksi senyawa antifungi oleh *Aspergillus flavus* UICC 360

##### 3.4.5.1. Pembuatan Inokulum Sel Kapang

Biakan kapang dari *working culture* diinokulasi ke dalam tabung reaksi berisi 5 ml medium PDA miring dengan metode gores (*streak*). Jumlah goresan adalah 15 gores. Biakan kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang (27-30° C). Inokulum dibuat dengan menambahkan 5 ml akuades steril ke dalam tabung biakan kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks hingga terbentuk suspensi sel kapang dan siap digunakan sebagai inokulum.

##### 3.4.5.2. Fermentasi

Fermentasi dilakukan berdasarkan Atalla *dkk.* (2008: 7) menggunakan metode fermentasi cair dengan pengocokan. Metode tersebut bertujuan memaksimalkan produksi senyawa-senyawa ekstraselular oleh kapang. Fermentasi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan untuk tiap perlakuan. Sebanyak 1ml (1,96% (v/v)) inokulum *Aspergillus flavus* UICC 360 dengan kepadatan (2,8--3,7) x 10<sup>7</sup> CFU/ml diinokulasi ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml medium CDB steril dengan konsentrasi NaNO<sub>3</sub> yang bervariasi (0 mM; 23 mM; 29 mM; 35 mM; 41 mM; dan 47 mM), kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang (27--30 °C) dalam inkubator *shaker* dengan kecepatan pengocokan 100 rpm. Derajat keasaman (pH) medium di awal (sebelum

fermentasi) diatur menjadi 7, dan pH di akhir fermentasi (setelah hari ke-7) diukur menggunakan kertas pH universal.

#### 3.4.6. Ekstraksi Senyawa Antifungi dari *Aspergillus flavus* UICC 360

Ekstraksi dilakukan berdasarkan Samiee *dkk.* (2003: 30). Hasil fermentasi difiltrasi menggunakan kertas saring sehingga diperoleh filtrat dan residu berupa miselium. Asam klorida (HCl) 2 N ditambahkan ke dalam filtrat hingga pH filtrat mencapai 3. Filtrat diekstraksi dengan menambahkan etil asetat sebanyak 2 kali volume filtrat. Campuran antara filtrat dengan etil asetat yang telah dikocok kemudian didiamkan selama 24 jam hingga terbentuk dua lapisan larutan, yaitu ekstrak cair (etil asetat yang mengandung senyawa antifungi) dan filtrat. Ekstraksi menggunakan etil asetat diulangi sebanyak 3 kali. Hasil ekstraksi diuapkan dengan *rotary evaporator* selama 10--15 menit pada suhu 40° C. Ekstrak pekat yang diperoleh dibandingkan dengan panduan warna *Castell-Polychromos* No.9216. Ekstrak tersebut dilarutkan kembali menggunakan etil asetat sehingga terbentuk konsentrat senyawa antifungi dengan volume 5ml (larutan *stock*) dan siap digunakan sebagai larutan uji kemudian disimpan pada suhu 4° C.

#### 3.4.7. Pengeringan Biomassa *Aspergillus flavus* UICC 360

Pengeringan biomassa dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  terhadap produksi miselium *Aspergillus flavus* UICC 360. Biomassa *Aspergillus flavus* UICC 360 yang telah terpisah dari filtrat kemudian dikeringkan. Pengeringan dilakukan dalam inkubator pada suhu 50° C selama 24 jam. Berat biomassa yang telah kering diukur menggunakan timbangan (Herlina 2009: 2--3).

### 3.4.8. Pengujian Kemampuan Anti-*C. albicans* Ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 dengan Metode Difusi Agar Cara Cakram

#### 3.4.8.1. Pembuatan Inokulum Sel Khamir

Biakan khamir dari *working culture* diinokulasi ke dalam tabung reaksi berisi 5 ml medium YMA miring dengan metode gores (*streak*). Jumlah goresan adalah 15 gores. Biakan kemudian diinkubasi selama 2 hari pada suhu ruang. Inokulum dibuat dengan menambahkan 5 ml akuades steril ke dalam tabung biakan kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks hingga terbentuk suspensi sel khamir dan siap digunakan sebagai inokulum.

#### 3.4.8.2. Pengujian Kemampuan Anti-*C. albicans*

Pengujian kemampuan Anti-*C. albicans* dilakukan berdasarkan Herlina (2009: 3). Sebanyak 0,2 ml inokulum sel khamir dengan kepadatan  $(3,0-3,7) \times 10^8$  CFU/ml diinokulasi ke dalam tabung berisi 15 ml medium YMA cair pada suhu  $\pm 40^\circ\text{C}$ , kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Selanjutnya medium yang berisi mikroorganisme uji (*Candida albicans* UICC Y-29) dituang ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan hingga mengeras. Setelah medium mengeras, kemudian dibagi menjadi 4 kuadran.

Pengujian dilakukan menggunakan metode difusi agar cara cakram. Kertas cakram steril berdiameter 10 mm diletakkan ke masing-masing kuadran dalam medium. Sebanyak 30  $\mu\text{l}$  larutan uji diteteskan pada kertas cakram steril yang berada di kuadran 1. Sebagai kontrol positif, sebanyak 30  $\mu\text{l}$  nistatin 1.000 ppm diteteskan pada kertas cakram yang berada di kuadran 2. Sebagai kontrol negatif, sebanyak 30  $\mu\text{l}$  etil asetat diteteskan pada kertas cakram yang berada di kuadran 3. Sebagai kontrol medium, sebanyak 30  $\mu\text{l}$  akuades steril diteteskan pada kertas cakram yang berada di kuadran 4. Inkubasi medium berisi mikroorganisme uji dilakukan pada suhu ruang ( $27-30^\circ\text{C}$ ) selama 24--48 jam. Kemampuan anti-*C. albicans* ditandai dengan terbentuknya zona hambat di

sekitar kertas cakram. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong.

#### 3.4.9. Pengolahan dan Analisis Data

Data hasil penelitian berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data disusun dalam bentuk Tabel dan Gambar. Data kualitatif meliputi hasil pengamatan morfologi kapang dan khamir, hasil pengamatan fermentasi, hasil pengamatan ekstrak antifungi, hasil pengamatan pengujian kemampuan anti-*C. albicans* menggunakan metode difusi agar cara cakram. Data kuantitatif meliputi hasil perhitungan sel kapang dan khamir menggunakan metode TPC, pengukuran pH akhir fermentasi, hasil berat kering biomassa *Aspergillus flavus* UICC 360, dan hasil pengukuran diameter zona hambat pengujian kemampuan anti-*C. albicans* menggunakan metode difusi agar cara cakram. Data hasil pengukuran diameter zona hambat pengujian kemampuan anti-*C. albicans* menggunakan metode difusi agar cara cakram diolah dan dianalisis menggunakan *software* perhitungan statistik [*Statistical Product and Service Solution (SPSS) 16.0 for Windows*] dan *software* tabulasi data [*Ms. Office Excel 2007*]. Analisis statistik dilakukan dengan beberapa uji, yaitu uji normalitas Shapiro-Wilk untuk mengetahui bahwa data berdistribusi normal, kemudian uji homogenitas Levene untuk mengetahui bahwa data bervariasi homogen. Selanjutnya dilakukan uji ANOVA untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan nyata untuk tiap perlakuan.

## BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

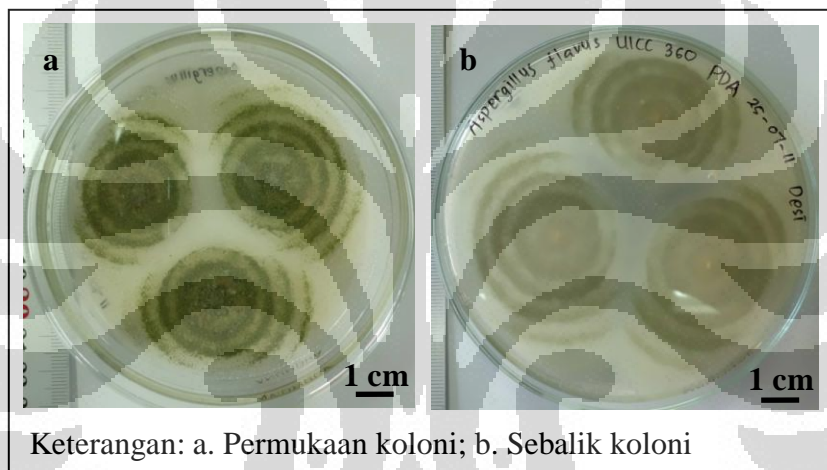
### 4.1. Pengamatan Morfologi Kapang dan Khamir

#### 4.1.1. *Aspergillus flavus* UICC 360

Pengamatan morfologi terhadap kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 berumur 7 hari, pada medium PDA, di suhu ruang (27--30° C) dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik. Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopik adalah sebagai berikut: koloni berdiameter 4,5--7,7 cm, berwarna hijau cemara berdasarkan panduan warna *Castell Polychromos* No. 9216 (Lampiran 12), telah bersporulasi, dan bertekstur granular (*granulose*). Sebaliknya koloni tidak memberikan warna pada medium atau hialin. Terdapat *exudate drops*, *growing zone*, zonasi, dan tidak terdapat *radial furrow*. Hasil pengamatan morfologi secara makroskopik kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 dapat dilihat pada Tabel 4.1.1 dan Gambar 4.1.1.(1).

Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik dari kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 memperlihatkan struktur-struktur sebagai berikut: kepala konidia berbentuk radial dan berukuran (67,8--166,4) x (70,0--165,0)  $\mu\text{m}$ . Vesikel berbentuk semibulat hingga bulat dan berukuran (50,1--95,2) x (44,6--86,2)  $\mu\text{m}$ . Fialid berukuran (6,1--8,8) x (2,4--4,4)  $\mu\text{m}$ , tidak memiliki metula, dan fialid langsung melekat pada vesikel sehingga sterigmata (tipe kepala konidia) adalah uniseriat. Konidiofor berukuran (102,9--323,0) x (18,3--26,4)  $\mu\text{m}$ . Jenis hifa adalah hifa *septate* atau hifa bersekat dan berwarna hialin. Konidia berbentuk bulat, berwarna hijau, dan berdiameter 4,2--8,8  $\mu\text{m}$ . Hasil pengamatan morfologi secara mikroskopik kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 dapat dilihat pada Tabel 4.1.1 dan Gambar 4.1.1.(2).

Hasil pengamatan karakter morfologi *Aspergillus flavus* UICC 360 secara makroskopik dan mikroskopik sesuai dengan beberapa karakter *Aspergillus flavus* yang dideskripsikan Gandjar *dkk.* (1999) dan Klich (2002). Menurut Gandjar *dkk.* (1999: 22), koloni *Aspergillus flavus* yang ditumbuhkan pada medium *Czapek's Dox Agar* (CDA) berwarna hijau kekuningan, kepala konidia berbentuk radial, vesikel berbentuk semibulat hingga bulat, memiliki fialid yang langsung melekat pada vesikel (uniseriat) atau metula (biseriat), konidia berbentuk bulat dan berwarna hijau. Menurut Klich (2002: 46), *Aspergillus flavus* yang ditumbuhkan pada medium *Czapek's Yeast Agar* (CYA) dapat menghasilkan *exudate drops* dan *reverse colony* (sebalik koloni) tidak berwarna.

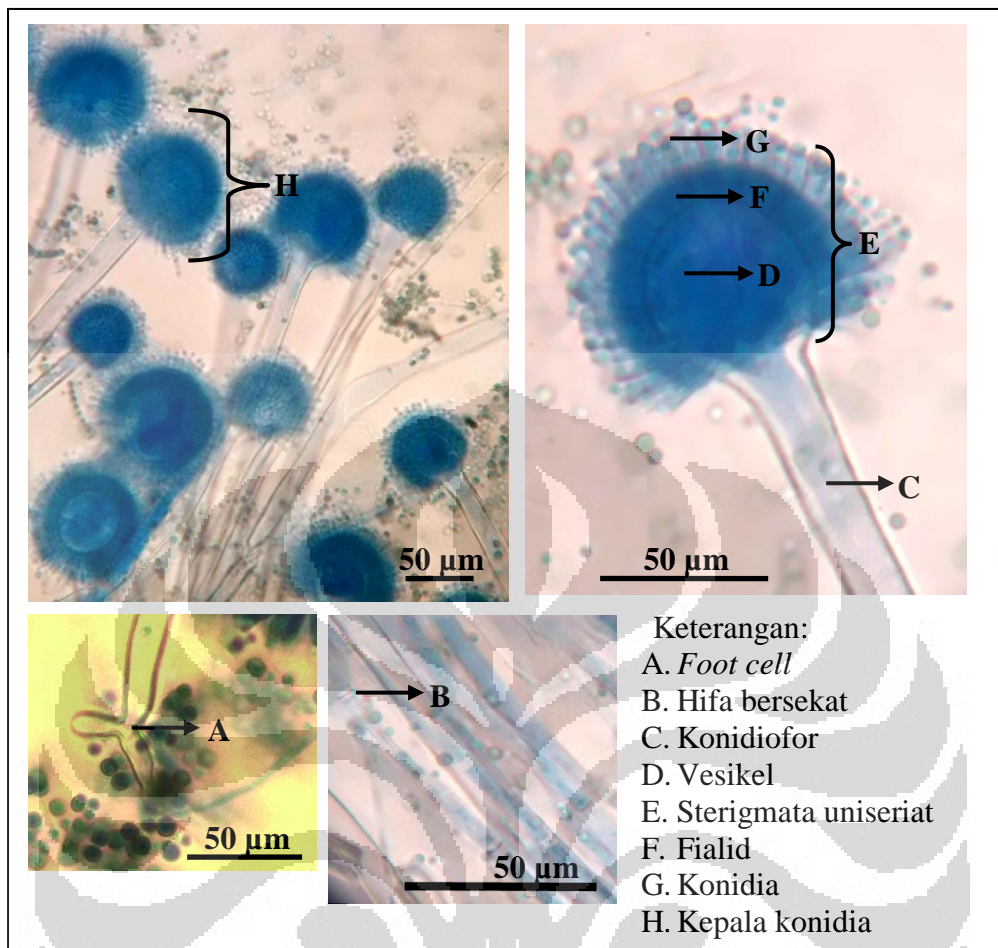


Gambar 4.1.1.(1). Hasil pengamatan morfologi *Aspergillus flavus* UICC 360 secara makroskopik, umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang (27--30° C)

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Tabel 4.1.1. Hasil pengamatan morfologi *Aspergillus flavus* UICC 360 secara makroskopik dan mikroskopik, umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang (27--30° C)

Pengamatan Morfologi	Karakter	Keterangan
Makroskopik	a. Warna koloni	Hijau cemara
	b. Warna sebalik koloni	Hialin
	c. Tekstur koloni	Granular
	d. <i>Exudates drops</i>	Ada
	e. <i>Radial furrow</i>	Tidak ada
	f. <i>Growing zone</i>	Ada
	g. Sporulasi	Ada
	h. Zonasi	Ada
	i. Diameter koloni	4,5--7,7 cm
Mikroskopik	a. Bentuk kepala konidia	Radial
	b. Ukuran kepala konidia	(67,8--166,4) x (70,0--165,0) $\mu\text{m}$
	c. Bentuk vesikel	Semibulat hingga bulat
	d. Diameter vesikel	(50,1--95,2) x (44,6--86,2) $\mu\text{m}$
	e. Metula	Tidak ada
	f. Sterigmata	Uniseriat
	g. Fialid	Ada
	h. Ukuran fialid	(6,1--8,8) x (2,4--4,4) $\mu\text{m}$
	i. Ukuran konidiofor	(102,9--323,0) x (18,3--26,4) $\mu\text{m}$
	j. Jenis hifa	Bersekat ( <i>septate</i> )
	k. Bentuk konidia	Bulat
	l. Warna konidia	Hijau
	m. Diameter konidia	4,2--8,8 $\mu\text{m}$



Gambar 4.1.1.(2). Hasil pengamatan morfologi *Aspergillus flavus* UICC 360 secara mikroskopik, umur 7 hari pada medium PDA di suhu ruang (27--30° C)  
 [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

#### 4.1.2. *Candida albicans* UICC Y-29

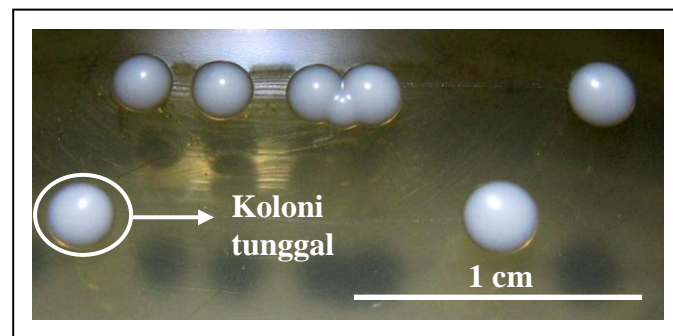
Pengamatan karakter morfologi khamir *Candida albicans* UICC Y-29 yang ditumbuhkan pada medium YMA selama 2 hari dan di suhu ruang (27--30° C) dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik. Hasil pengamatan pada koloni tunggal adalah sebagai berikut: koloni berwarna putih, bertekstur seperti mentega (*butyrous*), memiliki permukaan halus dan mengilap. Tepian koloni berbentuk lurus dan profil terlihat menggunung. Hasil pengamatan *Candida albicans* UICC Y-29 dapat dilihat pada Tabel 4.1.2. dan Gambar 4.1.2.(1).



Hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopik adalah sebagai berikut: sel berbentuk bulat hingga oval dan berukuran (5,1--9,7) x (4,1--7,2)  $\mu\text{m}$ , tersusun berkelompok (*cluster*), tipe pertunasan (*budding*) adalah unipolar dan tidak terdapat baik miselium sejati maupun miselium palsu. Hasil pengamatan *Candida albicans* UICC Y-29 dapat dilihat pada Tabel 4.1.2. dan Gambar 4.1.2.(2). Karakter morfologi *Candida albicans* UICC Y-29 secara makroskopik dan mikroskopik sesuai dengan beberapa karakter *Candida albicans* yang dideskripsikan oleh Kurtzman dan Fell (1998). Menurut Kurtzman dan Fell (1998: 477) koloni *C. albicans* pada *Corn Meal Agar* (CMA) berwarna putih, bertekstur *butyrous* (seperti mentega), permukaan mengkilap, dan pertumbuhan pada *glucose-yeast extract-peptone* cair selnya tersusun berkelompok.

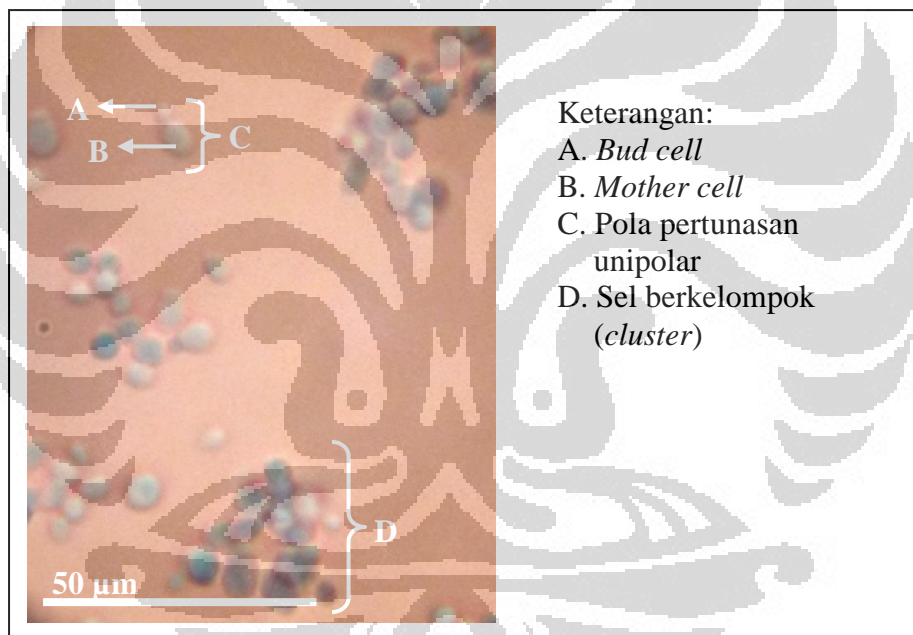
Tabel 4.1.2. Hasil pengamatan morfologi *Candida albicans* UICC Y-29 secara makroskopik dan mikroskopik, umur 2 hari pada medium YMA di suhu ruang (27--30° C)

Pengamatan Morfologi	Karakter	Keterangan
Makroskopik	a. Warna koloni	Putih
	b. Tekstur koloni	<i>Butyrous</i>
	c. Permukaan koloni	Halus dan mengkilap
	d. Profil koloni	Menggunung
	e. Tepi koloni	Lurus
Mikroskopik	a. Bentuk sel	Bulat hingga oval
	b. Ukuran sel	(5,1--9,7) x (4,1--7,3) $\mu\text{m}$
	c. Pola pertunasan	Unipolar
	d. Susunan sel	<i>Cluster</i> (berkelompok)
	e. Miselium palsu	Tidak ada
	f. Miselium sejati	Tidak ada



Gambar 4.1.2.(1). Hasil pengamatan morfologi *Candida albicans* UICC Y-29 secara makroskopik, umur 2 hari pada medium YMA di suhu ruang (27--30° C)

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]



Gambar 4.1.2.(2). Hasil pengamatan morfologi *Candida albicans* UICC Y-29 secara mikroskopik, umur 2 hari pada medium YMA di suhu ruang (27--30° C)

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

## 4.2. Perhitungan Sel Kapang dan Sel Khamir dengan Metode *Total Plate Count* (TPC)

### 4.2.1. Perhitungan sel kapang *Aspergillus flavus* UICC 360

Perhitungan sel kapang dengan metode TPC dilakukan untuk mengetahui jumlah inokulum sel kapang berupa hifa dan konidia *Aspergillus flavus* UICC 360 yang digunakan dalam fermentasi untuk memproduksi senyawa antifungi. Jumlah sel kapang yang diinokulasikan ke dalam medium fermentasi memengaruhi keberhasilan produksi senyawa antifungi. Berdasarkan perhitungan TPC, jumlah sel kapang yang diinokulasikan untuk fermentasi adalah  $(2,8--3,8) \times 10^7$  CFU/ml sampel. Hasil perhitungan sel *Aspergillus flavus* UICC 360 dapat dilihat pada Tabel 4.2.1. Jumlah tersebut diperkirakan sudah cukup bagi pertumbuhan *Aspergillus flavus* UICC 360 selama fermentasi untuk memproduksi senyawa antifungi. Hajjaj *dkk.* (2001: 2596) menggunakan inokulum *Aspergillus terreus* Thom ATCC 74135 dengan kepadatan sel  $10^7$  CFU/ml dalam fermentasi untuk memproduksi lovastatin.

Tabel 4.2.1. *Total Plate Count* (TPC) sel kapang *Aspergillus flavus* UICC 360 berumur 2 hari pada medium PDA di suhu ruang (27--30° C)

Mikroorganisme	Pengenceran	Pengulangan	Jumlah Koloni	Jumlah CFU/ml	Nilai Total CFU/ml
<i>Aspergillus flavus</i> UICC 360	$10^{-4}$	1	293	$2,8 \times 10^7$	$(2,8--3,7) \times 10^7$
		2	288		
		3	247		
	$10^{-5}$	1	36	$3,4 \times 10^7$	
		2	27		
		3	40		
	$10^{-6}$	1	2	$3,7 \times 10^7$	
		2	7		
		3	2		

Proses fermentasi dilakukan selama 7 hari dengan menginokulasikan sebanyak 1 ml inokulum ke dalam 50 ml medium, artinya jumlah inokulum setara dengan konsentrasi 1,96% (v/v). Konsentrasi tersebut sedikit, namun diperkirakan sudah cukup untuk menghasilkan pertumbuhan *Aspergillus flavus* UICC 360 dalam memproduksi antifungi selama fermentasi. Konsentrasi inokulum yang sedikit memberikan keuntungan berupa kelimpahan nutrisi dalam medium. Hal tersebut memperbesar rasio penyerapan nutrisi oleh hifa dan konidia selama metabolisme primer sehingga pertumbuhan optimal dapat terjadi dan memungkinkan metabolisme sekunder juga terjadi secara optimal. Proses metabolisme sekunder yang optimal memungkinkan produksi antifungi oleh *Aspergillus flavus* UICC 360 juga optimal. Sebaliknya, konsentrasi inokulum yang semakin besar akan meningkatkan kompetisi antar hifa dan konidia dalam memetabolisme nutrisi sehingga menyebabkan keterbatasan nutrisi dalam medium. Nutrisi yang terbatas tidak mampu mendukung metabolisme primer untuk membentuk materi sel dan energi sehingga pertumbuhan terhambat. Hal tersebut menyebabkan metabolisme sekunder juga terhambat karena metabolisme sekunder terjadi setelah metabolisme primer. Proses metabolisme sekunder yang terhambat menyebabkan *Aspergillus flavus* UICC 360 tidak optimal dalam memproduksi antifungi. Menurut Shafee *dkk.* (2005: 2), konsentrasi inokulum yang sedikit menyebabkan kelimpahan nutrisi sehingga memperbesar rasio penyerapan nutrisi oleh mikroorganisme selama proses metabolisme primer. Menurut Jogeza *dkk.* (2011: 225), konsentrasi inokulum yang semakin besar menyebabkan keterbatasan nutrisi dalam mendukung metabolisme primer sehingga menghambat proses pertumbuhan. Atalla *dkk.* (2008: 7) menggunakan konsentrasi inokulum sebesar 1,96% (v/v) dalam fermentasi *Aspergillus terreus* selama 7 hari untuk memproduksi lovastatin.

Proses fermentasi dilakukan selama 7 hari. Konsentrasi inokulum yang sedikit menyebabkan kelimpahan nutrisi dalam medium sehingga proses pemecahan nutrisi kompleks menjadi sederhana oleh *Aspergillus flavus* UICC 360 kemungkinan berlangsung lebih lama. Waktu fermentasi 7 hari bertujuan mengimbangi konsentrasi inokulum yang sedikit dan diperkirakan pada waktu

tersebut *Aspergillus flavus* UICC 360 telah memasuki fase stasioner. Fermentasi selama 7 hari diharapkan dapat memperpanjang masa pemanfaatan nutrisi oleh *Aspergillus flavus* UICC 360 yang dibutuhkan selama metabolisme primer dan sekunder sehingga pertumbuhan dan produksi antifungi terjadi secara optimal. Sebaliknya, pada masa fermentasi yang terlalu pendek, diperkirakan *Aspergillus flavus* UICC 360 belum selesai melewati fase pertumbuhan (fase log) sehingga belum terjadi fase stasioner karena fase stasioner terjadi setelah fase log. Hal tersebut menyebabkan pemanenan senyawa antifungi tidak optimal. Menurut Gandjar dkk. (2006: 39), produksi metabolit sekunder oleh kapang terjadi secara optimal pada fase stasioner. Latha dkk. (2012: 29) melaporkan bahwa produksi lovastatin oleh *Aspergillus fischeri* NCIM 509 terjadi secara optimal pada hari ke-7 fermentasi, namun setelah hari ke-7 produksi lovastatin mengalami penurunan karena telah memasuki fase kematian.

#### 4.2.2. Perhitungan sel khamir *Candida albicans* UICC Y-29

Perhitungan sel khamir juga dilakukan menggunakan metode TPC. Perhitungan bertujuan mengetahui jumlah inokulum yang digunakan pada uji kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 menggunakan metode difusi agar cara cakram. Jumlah sel khamir yang diperoleh adalah  $(3,0--3,7) \times 10^8$  CFU/ml sampel. Hasil perhitungan sel *Candida albicans* UICC Y-29 dapat dilihat pada Tabel 4.2.2. Jumlah kepadatan sel khamir sebesar  $10^8$  CFU/ml diperkirakan sudah cukup digunakan untuk uji kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360. Ofodile dkk. (2010: 61) menggunakan inokulum *Candida albicans* dengan kepadatan sel  $10^6$  CFU/ml untuk menguji kemampuan antifungi dari ekstrak *Chrysanthellum americanum*. Menurut Collins dan Lyne (2004: 169--171) jumlah inokulum memengaruhi efektivitas antifungi dalam menghambat mikroorganisme uji saat dilakukan pengujian kemampuan antifungi dan jumlah kepadatan sel mikroorganisme uji yang disarankan untuk uji kemampuan antimikroba berkisar antara  $10^4$  CFU/ml hingga  $10^8$  CFU/ml.

Tabel 4.2.2. *Total Plate Count (TPC) sel khamir Candida albicans UICC Y-29 berumur 2 hari pada medium YMA di suhu ruang (27--30° C)*

Mikroorga- nisme	Pengen- ceran	Pengula- ngan	Jumlah Koloni	Jumlah CFU/ml	Nilai Total CFU/ml
<i>Candida albicans UICC Y-29</i>	10 <sup>-5</sup>	1	234	3,0 x 10 <sup>8</sup>	(3,0--3,7) x 10 <sup>8</sup>
		2	340		
		3	332		
	10 <sup>-6</sup>	1	47	3,7 x 10 <sup>8</sup>	
		2	24		
		3	40		
	10 <sup>-7</sup>	1	3	3,3 x 10 <sup>8</sup>	
		2	3		
		3	4		

#### 4.3. Produksi Senyawa Antifungi oleh *Aspergillus flavus* UICC 360

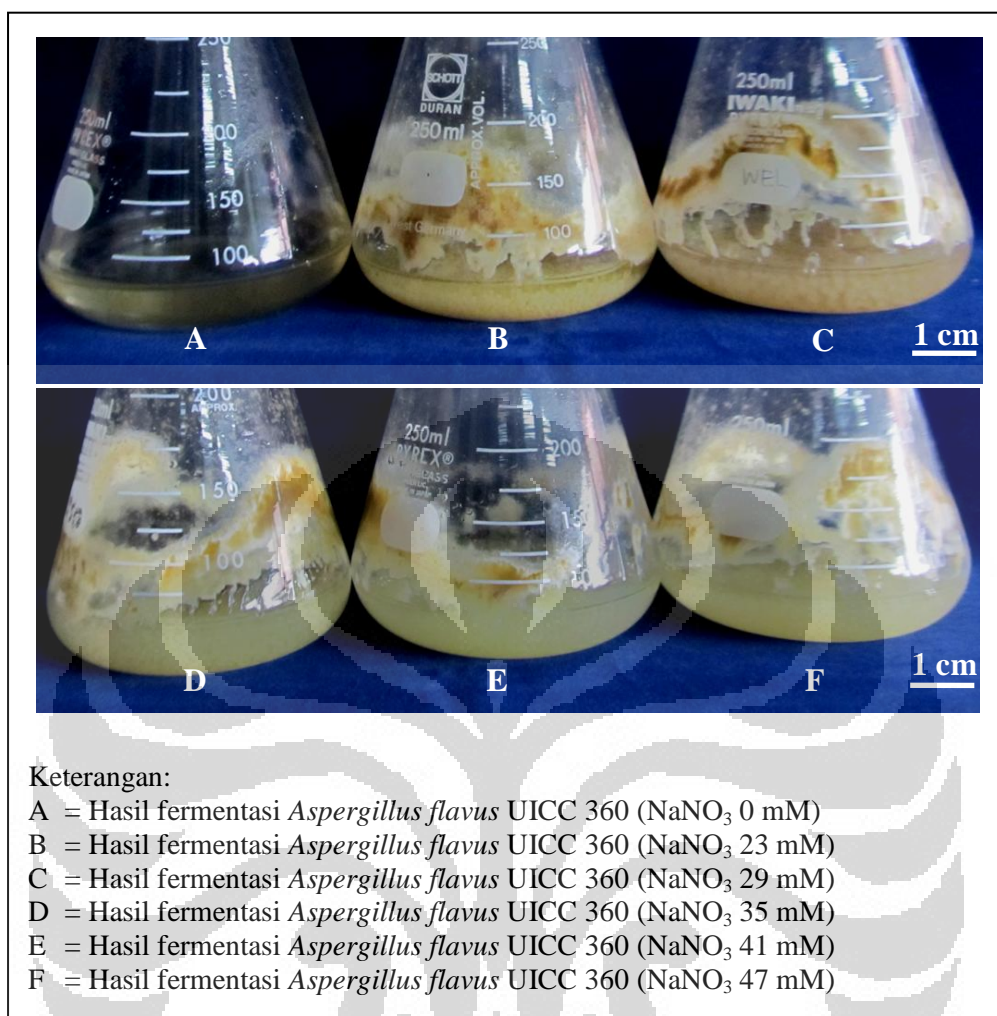
Fermentasi *Aspergillus flavus* UICC 360 untuk memproduksi senyawa antifungi dilakukan dengan menggunakan metode fermentasi cair dalam medium CDB dengan pengocokan. Pengocokan bertujuan agar nutrisi dalam medium dapat diserap oleh *Aspergillus flavus* UICC 360 secara optimal karena seluruh miselium *Aspergillus flavus* UICC 360 berada di dalam medium, sehingga pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder juga optimal. Sebelum proses fermentasi, dilakukan pengaturan terhadap pH medium (pH awal fermentasi) sebesar 7. Pengamatan terhadap pertumbuhan *Aspergillus flavus* UICC 360 setelah fermentasi 7 hari pada medium CDB meliputi warna medium, pH akhir fermentasi dan berat kering biomassa. Menurut Griffin (1981: 162), sebagian besar kapang dapat mengalami pertumbuhan optimal pada pH 4--7. Bago *dkk.* (1996: 275) melaporkan bahwa adanya perubahan pH dan warna pada medium agar untuk kultur *Glomus intraradices* (Arbuscular Mycorrhizal) mengindikasikan terjadinya pertumbuhan kapang tersebut. Casas López *dkk.* (2004: 1122) melaporkan bahwa adanya produksi biomassa *Aspergillus terreus* ATCC 20542 mengindikasikan adanya pertumbuhan kapang tersebut. Hasil pengamatan fermentasi dapat dilihat pada Tabel 4.3. dan Gambar 4.3.1.

Tabel 4.3. Hasil pengamatan fermentasi *Aspergillus flavus* UICC 360, waktu inkubasi 7 hari, di suhu ruang (27--30° C), pengocokan 100 rpm.

Perlakuan Konsentrasi NaNO <sub>3</sub> (mM)	Pengulangan	Warna medium	pH Awal	pH Akhir
0 (Kontrol)	1	Abu-abu perak	7	5
	2	Abu-abu perak	7	6
	3	Abu-abu perak	7	6
23	1	Jingga muda	7	8
	2	Jingga muda	7	8
	3	Jingga muda	7	6
29	1	Jingga tua	7	9
	2	Jingga tua	7	9
	3	Jingga tua	7	9
35	1	Kuning limau	7	9
	2	Kuning limau	7	9
	3	Kuning limau	7	9
41	1	Kuning kepodang	7	9
	2	Kuning kepodang	7	8
	3	Kuning kepodang	7	9
47	1	Kuning kepodang	7	9
	2	Kuning kepodang	7	9
	3	Kuning kepodang	7	9

#### 4.3.1. Warna Medium Fermentasi

Medium fermentasi memiliki tampilan bening atau tidak berwarna, namun setelah hari ke-7 fermentasi terjadi perubahan warna medium. Penentuan warna medium dilakukan dengan membandingkan warna medium setelah fermentasi dengan panduan warna *Castell Polychromos* No. 9216 (Lampiran 12). Hasil pengamatan terhadap warna medium dari tiap perlakuan fermentasi dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan Gambar 4.3.1.



Gambar 4.3.1. Hasil fermentasi *Aspergillus flavus* UICC 360, waktu inkubasi 7 hari, di suhu ruang ( $27\text{--}30^\circ\text{C}$ ), pengocokan 100 rpm [Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Perubahan warna medium fermentasi kemungkinan karena *Aspergillus flavus* UICC 360 menghasilkan metabolit sekunder secara ekstraseluler berupa pigmen. Selanjutnya, pigmen terlarut dalam medium dan menyebabkan medium berwarna. Warna medium dari masing-masing perlakuan fermentasi terlihat berbeda-beda (Gambar 4.3.1.(1)). Warna medium dari perlakuan  $\text{NaNO}_3$  0 mM adalah abu-abu perak, perlakuan  $\text{NaNO}_3$  23 mM adalah jingga muda, perlakuan  $\text{NaNO}_3$  29 mM adalah jingga tua, perlakuan  $\text{NaNO}_3$  35 mM adalah kuning limau, perlakuan  $\text{NaNO}_3$  41 mM dan  $\text{NaNO}_3$  47 mM adalah kuning kepodang. Adanya perbedaan warna medium mengindikasikan bahwa



*Aspergillus flavus* UICC 360 mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder berupa beberapa pigmen. Pigmen tersebut juga mengindikasikan bahwa senyawa metabolit sekunder dari *Aspergillus flavus* UICC 360 bersifat antifungi. Hosoe *dkk.* (2011: 211) melaporkan bahwa *Aspergillus nishimurae* menghasilkan metabolit sekunder berwarna kuning yang merupakan senyawa anishidiol dan bersifat antifungi terhadap *C. albicans*. Dehghan *dkk.* (2008: 134) melaporkan bahwa *Aspergillus flavus* NCPF 2008 menghasilkan pigmen berwarna oranye kekuningan yang merupakan senyawa aflatoksin. Hua *dkk.* (1999: 2739) melaporkan *Aspergillus flavus* NRRL 25347 menghasilkan pigmen berwarna oranye kemerahan yang merupakan senyawa aflatoksin.

#### 4.3.2. pH Akhir Fermentasi

Hasil pengukuran terhadap pH medium setelah fermentasi menunjukkan adanya kenaikan dan penurunan pH medium pada masing-masing perlakuan fermentasi. Hasil pengukuran pH medium dapat dilihat pada Tabel 4.3. Hasil pengukuran pH medium menunjukkan bahwa perlakuan fermentasi *Aspergillus flavus* UICC 360 tanpa  $\text{NaNO}_3$  memiliki pH asam (nilai pH 5--6). Pada perlakuan fermentasi dengan keberadaan  $\text{NaNO}_3$  menunjukkan pH medium bersifat basa (nilai pH 8--9), kecuali pada perlakuan fermentasi dengan  $\text{NaNO}_3$  23 mM ulangan ke-3 memiliki pH asam.

Perubahan pH pada medium diduga karena hasil metabolisme yang dieksresikan oleh *Aspergillus flavus* UICC 360. Kenaikan pH pada perlakuan fermentasi dengan  $\text{NaNO}_3$  disebabkan adanya akumulasi ion  $\text{OH}^-$  dalam medium. Proses penggunaan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) oleh *Aspergillus flavus* UICC 360 melibatkan peranan nitrat reduktase yang mengubah nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) menjadi nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), selanjutnya nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) akan diubah oleh nitrit reduktase menjadi ammonium ( $\text{NH}_3$ ). Selama proses penggunaan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), kapang akan menyerap ion  $\text{H}^+$  dari dalam medium untuk membentuk ammonium ( $\text{NH}_3$ ). Penyerapan ion  $\text{H}^+$  akan diikuti dengan pelepasan ion  $\text{OH}^-$  sehingga menyebabkan pH medium meningkat. Sebaliknya, ketiadaan  $\text{NaNO}_3$  dalam medium fermentasi

menyebabkan *Aspergillus flavus* UICC 360 tidak menggunakan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) untuk metabolisme sehingga tidak terjadi pelepasan ion  $\text{OH}^-$  ke lingkungan medium. Oleh karena itu, tidak tercipta kondisi basa pada medium.

Kondisi pH asam diduga karena terbentuknya senyawa asam dalam medium. Selama masa pertumbuhan, *Aspergillus flavus* UICC 360 menggunakan oksigen yang tersedia untuk melakukan respirasi. Hasil dari respirasi berupa senyawa karbondioksida ( $\text{CO}_2$ ) yang akan terlarut dalam medium, bereaksi dengan air ( $\text{H}_2\text{O}$ ) dan membentuk senyawa asam bikarbonat ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). Akumulasi  $\text{H}_2\text{CO}_3$  dalam medium menyebabkan pH medium turun (bersifat asam). Keadaan pH asam diduga disebabkan juga oleh akumulasi senyawa-senyawa asam organik yang dihasilkan oleh *Aspergillus flavus* UICC 360. Keadaan pH asam pada perlakuan fermentasi dengan  $\text{NaNO}_3$  23 mM ulangan ke-3 kemungkinan disebabkan oleh akumulasi konsentrasi senyawa asam dalam medium lebih besar dibandingkan konsentrasi ion  $\text{OH}^-$ . Bago *dkk.* (1996: 278) melaporkan bahwa penggunaan nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) dalam medium agar oleh *Glomus intraradices* (Arbuscular Mycorrhizal) menyebabkan pH medium menjadi basa karena adanya pelepasan ion  $\text{OH}^-$  ke lingkungan medium, sedangkan pH asam pada medium disebabkan oleh hasil respirasi *Glomus intraradices* (Arbuscular Mycorrhizal) berupa  $\text{CO}_2$  yang bereaksi dengan air dalam medium dan membentuk  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . El- Holi dan Al-Delaimy (2003: 359) melaporkan bahwa akumulasi senyawa metabolit sekunder berupa asam sitrat yang diproduksi oleh *Aspergillus niger* ATCC 9642 menyebabkan pH medium pertumbuhan kapang tersebut mengalami penurunan dari 3 menjadi 1,5. Mellon *dkk.* (2002: 650) melaporkan bahwa *Aspergillus flavus* AF13 (ATCC 96044) menghasilkan asam kojic dengan fermentasi cair selama 7 hari.

#### 4.3.3. Berat Kering Biomassa *Aspergillus flavus* UICC 360

Berat kering biomassa *Aspergillus flavus* UICC 360 tiap perlakuan fermentasi dari yang terbanyak hingga tersedikit secara berturut-turut adalah dari perlakuan fermentasi dengan konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  23 mM,  $\text{NaNO}_3$  29 mM,  $\text{NaNO}_3$

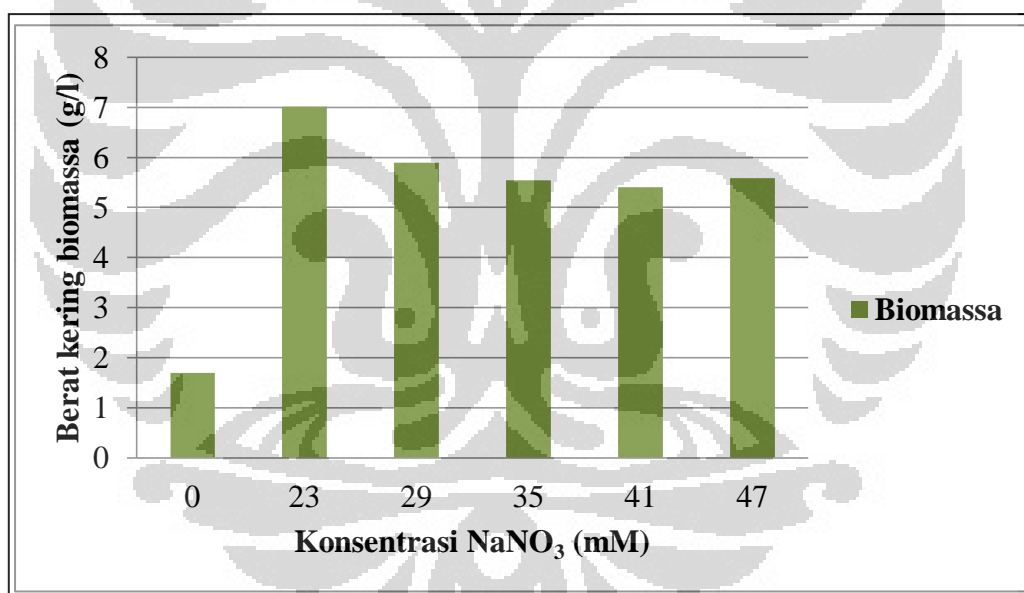
47 mM, NaNO<sub>3</sub> 35 mM, NaNO<sub>3</sub> 41 mM, dan NaNO<sub>3</sub> 0 mM. Produksi biomassa *Aspergillus flavus* UICC 360 mengindikasikan adanya pertumbuhan miselium. Hasil pengeringan biomassa *Aspergillus flavus* UICC 360 pada masing-masing perlakuan fermentasi setelah hari ke-7 dapat dilihat pada Tabel 4.3.3.

Tabel 4.3.3. Hasil pengeringan biomassa *Aspergillus flavus* UICC 360 pada suhu 50° C selama 24 jam

Perlakuan fermentasi konsentrasi NaNO <sub>3</sub> (mM)	Berat kering biomassa (g/l)
0 (kontrol)	1,70
23	7,01
29	5,89
35	5,54
41	5,41
47	5,59

Pembentukan miselium *Aspergillus flavus* UICC 360 dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi dalam medium CDB untuk produksi biomassa. Selama fase pertumbuhan (fase log), *Aspergillus flavus* UICC 360 memanfaatkan nutrisi, terutama karbon (sukrosa) dan nitrogen (natrium nitrat) dalam medium CDB untuk melakukan metabolisme primer yang menghasilkan metabolit primer berupa karbohidrat, lipid, protein dan asam nukleat yang diperlukan untuk *building block*. Pada hari ke-7 fermentasi, perlakuan fermentasi tanpa sumber nitrogen (NaNO<sub>3</sub> 0 mM) tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan miselium seperti pada perlakuan fermentasi lain. Namun demikian, terdapat sedikit miselium yang berwarna hitam (Gambar 4.3.1). Miselium yang berwarna hitam diduga sebagai miselium yang sempat tumbuh, tetapi mengalami kematian sebelum hari ke-7. Adanya miselium kemungkinan karena masih ada nutrisi selain nitrogen seperti karbon (sukrosa) yang dapat digunakan untuk membentuk materi sel, namun ketiadaan sumber nitrogen diduga menyebabkan *Aspergillus flavus* UICC 360 kehilangan kemampuan mensintesis protein, asam amino, dan asam nukleat yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sehingga miselium mengalami

kematian. Perlakuan fermentasi tanpa sumber nitrogen ( $\text{NaNO}_3$  0 mM) juga menghasilkan berat kering biomassa yang paling sedikit, yaitu 1,70 g/l. Berat biomassa pada perlakuan fermentasi tanpa sumber nitrogen menunjukkan bahwa keberadaan sumber nitrogen sangat penting untuk mendukung berlangsungnya pembentukan miselium *Aspergillus flavus* UICC 360. Madigan *dkk.* (2012: 86) menyatakan karbon berperan sebagai komponen pembentukan materi sel yang diperlukan untuk *building block* selama pertumbuhan. Menurut Hogg (2005: 80), nitrogen berperan sebagai komponen biosintesis protein, asam-asam amino dan asam nukleat yang dibutuhkan selama masa pertumbuhan. Zhan Ying Zhang *dkk.* (2008: 3874) melaporkan bahwa *Aspergillus niger* WEBL0901 menghasilkan berat kering biomassa terkecil (2,88 g/l) pada konsentrasi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0 mM dan biomassa terbesar (5,20 g/l) pada konsentrasi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  23 mM.



Gambar 4.3.2. Grafik berat kering biomassa *Aspergillus flavus* UICC 360

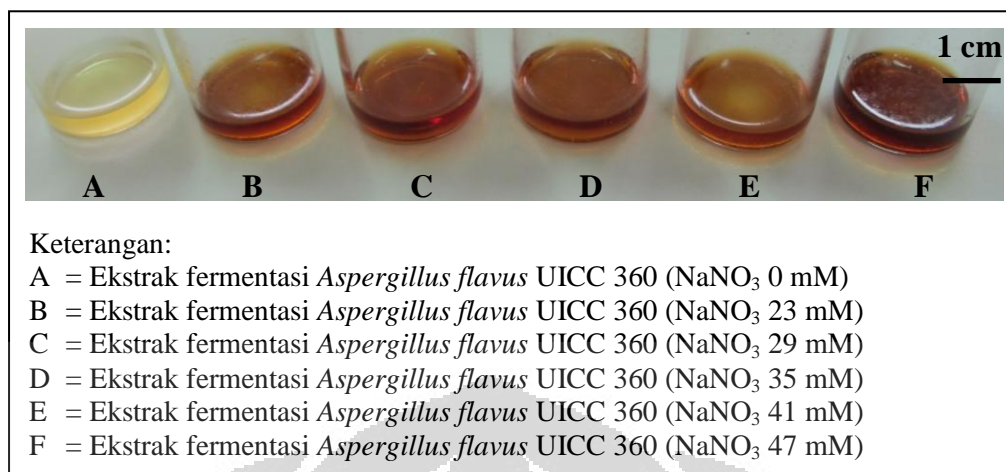
Konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  berpengaruh terhadap jumlah berat kering biomassa *Aspergillus flavus* UICC 360 yang diperlihatkan oleh Gambar 4.3.2. Produksi biomassa mengalami peningkatan sampai konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  23 mM, selanjutnya produksi biomassa cenderung mengalami penurunan. Konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  23 mM merupakan konsentrasi terbaik untuk produksi biomassa *Aspergillus flavus* UICC

360 karena menghasilkan berat biomassa terbesar, yaitu 7,01 g/l (Gambar 4.3.2.). Konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  di atas 23 mM diduga menyebabkan produksi berat kering biomassa *Aspergillus flavus* UICC 360 cenderung mengalami penurunan. Ul Haq dkk. (2001: 537--538) melaporkan bahwa produksi biomassa *Aspergillus niger* UV-6 mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan konsentrasi sumber nitrogen  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0,1%--0,2%), namun jika telah mencapai titik konsentrasi nitrogen optimal (0,2%), maka produksi biomassa cenderung mengalami penurunan meskipun konsentrasi nitrogen meningkat (0,2%--0,3%).

#### **4.4. Pengujian Kemampuan Anti-*C. albicans* Ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 dengan Metode Difusi Agar Cara Cakram**

Pengujian kemampuan senyawa anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 dilakukan dengan metode difusi agar cara cakram. Pengujian dilakukan terhadap ekstrak senyawa antifungi dari masing-masing perlakuan fermentasi. Ekstrak senyawa antifungi *Aspergillus flavus* UICC 360 dapat dilihat pada Gambar 4.4.(1). Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak senyawa antifungi *Aspergillus flavus* UICC 360 memiliki kemampuan antifungi terhadap *Candida albicans* UICC Y-29. Hasil pengamatan uji kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 dapat dilihat pada Tabel 4.4.(1) dan Gambar 4.4.(2).

Kemampuan anti-*C. albicans* dari pengujian ditandai dengan terbentuknya zona hambat di sekeliling kertas cakram yang berisi ekstrak senyawa antifungi dari *Aspergillus flavus* UICC 360 dalam etil asetat. Zona hambat terbentuk karena ekstrak senyawa antifungi dalam etil asetat pada kertas cakram berdifusi ke dalam medium agar dan membunuh atau menghambat pertumbuhan *Candida albicans* UICC Y-29. Terbentuknya zona hambat ditandai oleh daerah bening atau keruh di sekitar kertas cakram. Hasil zona hambat yang dibentuk oleh ekstrak senyawa antifungi *Aspergillus flavus* UICC 360 dapat dilihat pada Gambar 4.4.(2). Zona hambat pada Gambar 4.4.(2). menunjukkan bahwa *Aspergillus flavus* UICC 360 mampu menghasilkan senyawa antifungi.



Gambar 4.4.(1) Ekstrak antifungi *Aspergillus flavus* UICC 360 dari masing-masing perlakuan fermentasi

[Sumber: Dokumentasi pribadi.]

Mekanisme penghambatan senyawa antifungi dari *Aspergillus flavus* UICC 360 diduga terjadi dengan cara menghambat biosintesis ergosterol yang merupakan sterol pada membran sel fungi. Membran tersebut berfungsi untuk permeabilitas transportasi nutrisi-nutrien dari dan ke dalam sel. Apabila biosintesis ergosterol terhambat, maka fungsi membran dalam transportasi nutrisi akan terganggu. Hal tersebut dapat mengakibatkan pertumbuhan sel terhambat bahkan dapat menyebabkan kematian sel. Rafliyanti (2010: 32) melaporkan bahwa *Aspergillus flavus* UICC 360 menghasilkan lovastatin yang memiliki kemampuan antifungi terhadap *Candida albicans* UICC Y-29. Gyetvai *dkk.* (2006: 1146) melaporkan bahwa sel-sel *Candida albicans* AG05 yang diberi perlakuan lovastatin (produk sintetik) memiliki kadar ergosterol yang lebih rendah dibandingkan dengan sel-sel tanpa perlakuan lovastatin. Menurut Madigan *dkk.* (2012: 777) terhambatnya biosintesis ergosterol fungi dapat mengakibatkan permeabilitas membran terganggu sehingga pertumbuhan sel terhambat dan kemungkinan sel mengalami kematian.

Zona hambat yang dibentuk oleh ekstrak senyawa antifungi dari *Aspergillus flavus* UICC 360 adalah zona hambat total dan diduga tidak terdapat pertumbuhan *Candida albicans* UICC Y-29 di sekitar kertas cakram. Zona

hambat total ditunjukkan oleh daerah bening di sekitar kertas cakram. Hal tersebut mengindikasikan bahwa *Aspergillus flavus* UICC 360 menghasilkan senyawa antifungi yang bersifat fungisidal (membunuh) terhadap *Candida albicans* UICC Y-29. Poeloengan (2009: 65--66) menyatakan zona hambat total ditandai oleh daerah bening yang menunjukkan bahwa senyawa antimikroba bersifat fungisidal terhadap mikroorganisme sehingga tidak terdapat lagi pertumbuhan sel. Zona hambat parsial ditandai oleh daerah keruh yang menunjukkan bahwa senyawa antimikroba bersifat fungistatik terhadap mikroorganisme, karena masih terdapat pertumbuhan mikroorganisme.

Kemampuan anti-*C. albicans* ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 dalam etil asetat dapat dilihat dari ukuran zona hambat yang terbentuk. Diameter zona hambat rata-rata dari kontrol positif (nistatin) dengan konsentrasi 1.000 ppm (v/v) adalah  $5,50 \pm 0,50$  mm. Diameter zona hambat rata-rata yang dibentuk oleh ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 memiliki kisaran antara  $5,62 \pm 0,46$  mm sampai  $8,70 \pm 0,53$  mm (Tabel 4.4.(1)). Berdasarkan ukuran diameter zona hambat rata-rata, secara keseluruhan semua ekstrak dari *Aspergillus flavus* UICC 360 memiliki kemampuan menghambat *Candida albicans* UICC Y-29 lebih baik dibandingkan nistatin.

Tabel 4.4.(1). Hasil pengujian kemampuan anti-*C. albicans* ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 dalam etil asetat menggunakan difusi agar cara cakram, inkubasi selama 24 jam, pada medium YMA, di suhu ruang (27--30° C).

Perlakuan	Pengulangan	+/-	Diameter zona hambat (mm)	Rata-rata diameter zona hambat (mm)
Nistatin (kontrol)	1	+	5,50	5,50 ± 0,50
	2	+	5,00	
	3	+	6,00	
E1	1	+	7,85	6,73 ± 1,00
	2	+	6,45	
	3	+	5,90	
E2	1	+	8,40	8,27 ± 0,51
	2	+	7,70	
	3	+	8,70	
E3	1	+	8,65	8,70 ± 0,53
	2	+	8,20	
	3	+	9,25	
E4	1	+	6,40	6,40 ± 0,20
	2	+	6,60	
	3	+	6,20	
E5	1	+	5,10	5,62 ± 0,46
	2	+	5,75	
	3	+	6,00	
E6	1	+	8,50	8,65 ± 0,59
	2	+	8,15	
	3	+	9,30	

Keterangan:

- E1 = ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 (NaNO<sub>3</sub> 0 mM)  
 E2 = ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 (NaNO<sub>3</sub> 23 mM)  
 E3 = ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 (NaNO<sub>3</sub> 29 mM)  
 E4 = ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 (NaNO<sub>3</sub> 35 mM)  
 E5 = ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 (NaNO<sub>3</sub> 41 mM)  
 E6 = ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 (NaNO<sub>3</sub> 47 mM)  
 + = terbentuk zona hambat  
 - = tidak terbentuk zona hambat





Gambar 4.4.(2). Hasil pengujian kemampuan anti-*C. albicans* ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 dengan difusi agar cara cakram, inkubasi selama 48 jam pada medium YMA di suhu ruang (27--30° C).  
 [Sumber: Dokumentasi pribadi]

Konsentrasi kontrol positif, yaitu nistatin 1.000 ppm, dapat digunakan sebagai pembanding atau penyetara terhadap kemampuan anti-*C. albicans* ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 berdasarkan ukuran diameter zona hambat yang terbentuk. Hasil penyetaraan konsentrasi ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 dengan konsentrasi antifungi nistatin berdasarkan perbandingan diameter zona

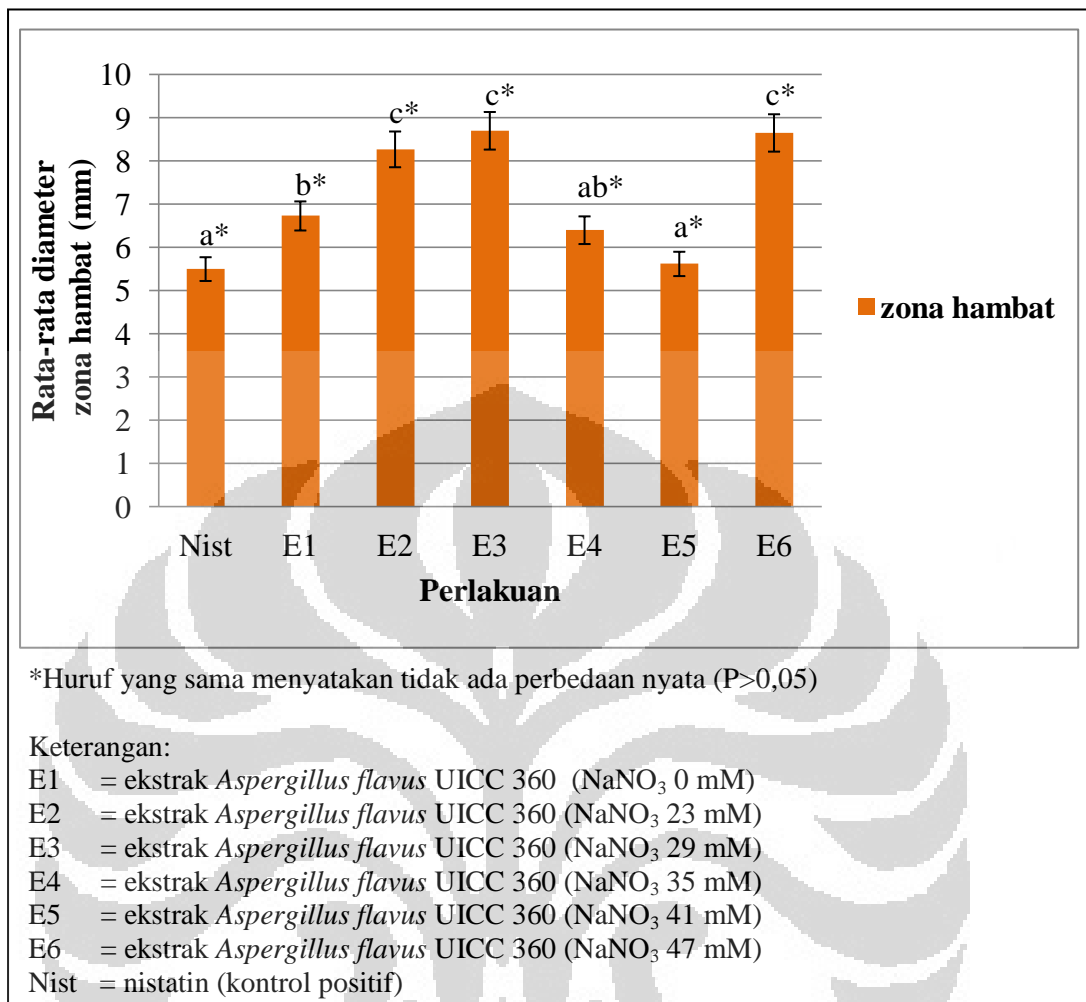
hambat dapat dilihat pada Tabel 4.4.(2). Konsentrasi antifungi ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 memiliki kisaran 1.021,8 ppm sampai 1.581,8 ppm.

Tabel 4.4.(2). Konsentrasi ekstrak *Aspergillus flavus* UICC yang disetarakan dengan konsentrasi antifungi nistatin berdasarkan perbandingan diameter zona hambat

Perlakuan	Pengulangan	Diameter zona hambat (mm)	Rata-rata diameter zona hambat (mm)	Konsentrasi
Nistatin	1	5,50	5,50 ± 0,50	1.000 ppm
	2	5,00		
	3	6,00		
E1	1	7,85	6,73 ± 1,00	1.223,6 ppm
	2	6,45		
	3	5,90		
E2	1	8,40	8,27 ± 0,51	1.503,6 ppm
	2	7,70		
	3	8,70		
E3	1	8,65	8,70 ± 0,53	1.581,8 ppm
	2	8,20		
	3	9,25		
E4	1	6,40	6,40 ± 0,20	1.163,6 ppm
	2	6,60		
	3	6,20		
E5	1	5,10	5,62 ± 0,46	1.021,8 ppm
	2	5,75		
	3	6,00		
E6	1	8,50	8,65 ± 0,59	1.572,7 ppm
	2	8,15		
	3	9,30		

Keterangan:

- E1 = ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 (NaNO<sub>3</sub> 0 mM)
- E2 = ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 (NaNO<sub>3</sub> 23 mM)
- E3 = ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 (NaNO<sub>3</sub> 29 mM)
- E4 = ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 (NaNO<sub>3</sub> 35 mM)
- E5 = ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 (NaNO<sub>3</sub> 41 mM)
- E6 = ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 (NaNO<sub>3</sub> 47 mM)



Gambar 4.4.(3). Grafik pengaruh konsentrasi NaNO<sub>3</sub> terhadap rata-rata diameter zona hambat kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360

Semua ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 dari masing-masing perlakuan fermentasi memiliki kemampuan anti-*C. albicans* yang berbeda-beda satu sama lain yang diperlihatkan oleh grafik pada Gambar 4.4.(3). Kemampuan anti-*C. albicans* dari ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 mengalami peningkatan dari E1 (NaNO<sub>3</sub> 0 mM) sampai E3 (NaNO<sub>3</sub> 29 mM) selanjutnya mengalami penurunan pada E4 (NaNO<sub>3</sub> 35 mM) sampai E5 (NaNO<sub>3</sub> 41 mM). Namun demikian, mengalami peningkatan kembali pada E6 (NaNO<sub>3</sub> 47 mM). Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi NaNO<sub>3</sub> berpengaruh terhadap peningkatan dan penurunan kemampuan anti-*C. albicans* dari ekstrak *Aspergillus flavus* UICC

360. Kemampuan anti-*C. albicans* yang berbeda-beda kemungkinan disebabkan oleh konsentrasi senyawa antifungi pada masing-masing ekstrak yang diproduksi *Aspergillus flavus* UICC 360 juga berbeda-beda. Ketiadaan sumber nitrogen pada E1 ( $\text{NaNO}_3$  0 mM) tetap menunjukkan adanya kemampuan antifungi. Hal tersebut mengindikasikan bahwa produksi senyawa antifungi tetap terjadi. Kemampuan *Aspergillus flavus* UICC 360 untuk tetap memproduksi senyawa antifungi tanpa sumber nitrogen, kemungkinan disebabkan oleh pemanfaatan nutrisi-nutrisi lain dalam medium fermentasi (medium CDB) untuk melakukan metabolisme sekunder. Bao-Jun Xu *dkk.* (2005: 82) melaporkan bahwa konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  (0 mM--59 mM) memengaruhi konsentrasi senyawa lovastatin yang diproduksi oleh *Monascus ruber* dan ketiadaan  $\text{NaNO}_3$  dalam medium fermentasi tetap menginduksi kapang tersebut untuk memproduksi lovastatin dengan fermentasi padat selama 14 hari.

Produksi senyawa antifungi yang terbanyak dari *Aspergillus flavus* UICC 360 tidak sebanding dengan produksi biomassa. Hal tersebut diperlihatkan oleh Gambar 4.3.2. dan Gambar 4.4.(3). Produksi senyawa antifungi terbanyak dihasilkan dari fermentasi dengan  $\text{NaNO}_3$  29 mM, sedangkan produksi biomassa terbanyak dihasilkan dari fermentasi dengan  $\text{NaNO}_3$  23 mM. Hal tersebut menunjukkan bahwa produksi biomassa tidak berkaitan dengan produksi metabolit sekunder. Biomassa diproduksi pada saat *Aspergillus flavus* UICC 360 berada pada fase pertumbuhan (fase log) karena pada fase tersebut terjadi proses metabolisme primer untuk membentuk miselium, sedangkan senyawa antifungi diproduksi pada saat *Aspergillus flavus* UICC 360 berada pada fase stasioner karena pada fase tersebut terjadi metabolisme sekunder yang menghasilkan produk metabolit sekunder, yaitu antifungi. Barboráková *dkk.* (2012: 471) melaporkan bahwa produksi fumagilin dari *Penicillium scrobosum* terjadi optimal pada saat biomassa diproduksi dalam jumlah sedikit. Casas López *dkk.* (2003: 273, 276) melaporkan bahwa produksi lovastatin dari *Aspergillus terreus* ATCC 20542 tidak berkaitan dengan produksi biomassa, produksi biomassa dipengaruhi oleh nutrisi dalam medium untuk pembentukan materi sel selama fase

pertumbuhan (fase log), sedangkan produksi lovastatin berkaitan dengan metabolisme sekunder selama fase stasioner.

Hasil data diameter zona hambat rata-rata kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 dianalisis secara statistik (Lampiran 2--4). Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk ( $\alpha = 0,05$ ) terhadap data diameter zona hambat rata-rata menunjukkan bahwa data berdistribusi normal ( $P > 0,05$ ). Hasil uji homogenitas Levene ( $\alpha = 0,05$ ) terhadap data diameter zona hambat rata-rata menunjukkan bahwa data bervariasi homogen ( $P > 0,05$ ). Hasil uji perbandingan berganda *Least Significance Difference* (LSD) ( $\alpha = 0,05$ ) menyatakan bahwa terdapat pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) pemberian variasi konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  terhadap pembentukan diameter zona hambat rata-rata kemampuan anti-*C. albicans* oleh ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 dalam etil asetat. Ekstrak E3 ( $\text{NaNO}_3$  29 mM) pada Gambar 4.6.(1). menunjukkan anti-*C. albicans* yang terbesar dengan diameter zona hambat rata-rata sebesar  $8,70 \pm 0,53$  mm, meskipun tidak berbeda nyata dengan anti-*C. albicans* dari E2 ( $\text{NaNO}_3$  23 mM) dan E6 ( $\text{NaNO}_3$  47 mM). Kemampuan anti-*C. albicans* oleh nistatin sebagai kontrol positif tidak berbeda nyata dengan E4 ( $\text{NaNO}_3$  35 mM) dan E5 ( $\text{NaNO}_3$  41 mM). Secara keseluruhan, hasil analisis statistik menyatakan bahwa konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360.

Penelitian ini memberikan hasil bahwa terdapat pengaruh konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  dalam medium fermentasi terhadap kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360. Berdasarkan diameter zona hambat hasil pengujian kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 diketahui bahwa pada variasi konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  (0 mM; 23 mM; 29 mM; 35 mM; 41 mM; dan 47 mM), menunjukkan  $\text{NaNO}_3$  29 mM (E3) merupakan konsentrasi terbaik dalam meningkatkan kemampuan anti-*C. albicans*. Hal tersebut ditandai dengan diameter zona hambat terbesar, yaitu  $8,70 \pm 0,53$  mm (setara dengan kemampuan nistatin 1.581,8 ppm).

## BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

1. Penambahan  $\text{NaNO}_3$  pada konsentrasi 0 mM; 23 mM; 29 mM; dan 47 mM berpengaruh terhadap peningkatan, sedangkan pada konsentrasi 41 mM dan 47 mM) berpengaruh terhadap penurunan kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360.
2. Konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  yang terbaik dalam meningkatkan kemampuan anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 adalah 29 mM (E3), ditandai dengan diameter zona hambat rata-rata terbesar, yaitu  $8,70 \pm 0,53$  mm (setara dengan kemampuan nistatin 1.581,8 ppm).

### 5.2. Saran

1. Perlu dilakukan analisis kimia untuk mengetahui tipe senyawa antifungi yang dihasilkan oleh *Aspergillus flavus* UICC 360.
2. Perlu diteliti pengaruh variasi sumber nitrogen terhadap produksi senyawa antifungi dari *Aspergillus flavus* UICC 360.
3. Perlu dibuat kurva pertumbuhan dari *Aspergillus flavus* UICC 360.

## DAFTAR REFERENSI

- Akmal, H. Arifin, & Hendri. 1993. Penelitian pendahuluan penapisan mikroorganisme tanah yang dapat menghasilkan senyawa antibiotika dari sampel tanah di kawasan Hutan Raya Bung Hatta Padang. *Majalah Farmasi Indonesia* **4**(3): 107--112.
- Andriole, V.T. 1999. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **44**: 151--162.
- Atalla, M.M., E.R. Hamed, & A.R. El-Shami. 2008. Optimization of culture medium for increased mevinolin production by *Aspergillus terreus* strain. *Malaysian Journal of Microbiology* **4**(2): 6--10.
- Bago, B., H. Vierheilig, Y. Piché, & C. Azcón-Anguilar. 1996. Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New Phytologist* **133**: 273--280.
- Bao-Jun Xu, Qi-Jun Wang, Xiao-Qin Jia, & Chang-Keun Sung. 2005. Enhanced lovastatin production by solid state fermentation of *Monascus ruber*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **10**: 78--84.
- Barboráková, Z., R. Labuda, G. Häubl, & D. Tančinová. 2012. Effect of glucose concentration and growth conditions on the fungal biomass, pH of media and production of fumagillin by a non-pathogenic strain *Penicillium scabrosum*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* **1**(4): 466--477.
- Bernasconi, G., H. Gerster, H. Hauster, H. Stauble, & H. Schneiter. 1995. *Teknologi kimia: bagian 2*. Terj. dari *Chemische Technologie: teil 2*, oleh Handoyo, L. PT Pradnya Paramita, Jakarta: vii + 215 hlm.
- Bhandari, B.B., M.M. Yadav, & A. Roy. 2009. Antifungal drug resistance-concerns for veterinarians. *Veterinary World* **2**(5): 204--207.
- Bilgrami, K.S. & R.N. Verma. 1981. *Physiologi of fungi*. Vikas Publishing House, India: x + 507 hlm.

- Calvo, A.M., R.A. Wilson, J.W. Bok, & N.P. Keller. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**(3): 447--459.
- Campbell, N.A., J.B. Reece, & L.G. Mitchell. 2003. *Biologi*. Terj dari *Biology*, oleh Manalu, W. Erlangga, Jakarta: xxii + 472 hlm.
- Cappuccino, J. G. & N. Sherman. 1996. *Microbiology: A laboratory manual*. Addison-Wesley Publishing, Reading: xiii + 466 hlm.
- Carels, M., & D. Sherpherd. 1977. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged shaken culture. *Canadian Journal of Microbiology* **23**: 1360-1372.
- Casas López, J.L., J.A. Sánchez Pérez, J.M. Fernández. Sevilla, F.G. Ación Fernández, E. Molina Grima, & Y. Chisti. 2004. Fermentation optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: use of response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **79**: 1119--1126.
- Chakraborty, D. & R. Verma. 2010. Ameliorative effect of *Emblica officinalis* aqueous extract on ochratoxin-induced lipid peroxidation in the kidney and liver of mice. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* **23**(1):63--73.
- Chanakya, P., P. M. Latha, & M. Srikanth. 2011. Solid state fermentation for the production of lovastatin by *Aspergillus fischeri*. *Resource Journal Pharmaceutical Science Biotechnology* **1**(1): 9--13.
- Coleman, J.J., S. Ghosh, I. Okoli, & E. Mylonakis. 2011. Antifungal activity of microbial secondary metabolites. *Plos One* **6**(9): 1--9.
- Collins, C.H., & P.M. Lyne. 2004. *Microbiological methods*. 8th ed. Arnold, England: viii + 445 hlm.
- Deacon, J.W. 2006. *Fungal biology*. Blackwell Publishing, Ltd., England: vii + 366 hlm.
- Dehghan, P., F. Zaini, S. Rezaei, A. Jebali, P. Kordbacheh, & M. Mahmoudi. 2008. Detection of *Aflr* gene and toxigenicity of *Aspergillus flavus* group isolated from patients with fungal sinusitis. *Iranian Journal of Public*



- Health* **37**(3): 134--141.
- Didomenico, B. 1999. Novel antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology* **2**: 509--515.
- El-Holi, M.A., & K.S. Al-Delaimy. 2003. Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology* **2**(10): 356--359.
- Evidente, A., G. Cristinzio, B. Punzo, A. Andolfi, A. Testa, & D. Melck. 2009. Flufuran, an antifungal 3,5-disubstituted furan produced by *Aspergillus flavus* Link. *Chemistry and Biodiversity* **6**: 328--334.
- Ferrón, M.A.V., J.L.C. Lopez, J.A.S. Perez, J.M.F. Sevilla, & Y. Chisti. 2005. Rapid screening of *Aspergillus terreus* mutants for overproduction of lovastatin. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **21**: 123--125.
- Gandjar, I., I.R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo, & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum mikrobiologi dasar*. Jurusan Biologi FMIPA UI, Depok: vii + 79 hlm.
- Gandjar, I., R.A. Samson, K.V.D. Tweel-Vermeulen, A. Oetari, & I. Santoso. 1999. *Pengenalan kapang tropik umum*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: xiii + 135 hlm.
- Gandjar, I., W. Sjamsuridzal, & A. Oetari. 2006. *Mikologi: dasar dan terapan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta: x + 273 hlm.
- Griffin, H.D. 1981. *Fungal physiology*. John Wiley & Sons Inc., New York: xii + 369 hlm.
- Gritter, R.J., J.M. Bobbitt & A.E. Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Terj. dari *Introduction to Chromatography* oleh Padmawinata. Penerbit ITB, Bandung: 10a + 266 hlm.
- Gyetvai, A., T. Emri, K. Takács, T. Dergez, A. Fekete, M. Pesti, I. Pócsi, & B. Lenkey. 2006. Lovastatin possesses a fungistatic effect against *Candida albicans*, but does not trigger apoptosis in this opportunistic human pathogen. *Federation of European Microbiological Societies* **6**: 1140--1148.
- Hajjaj, H., P. Niederberger, & P. Duboc. 2001. Lovastatin biosynthesis by

- Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(6): 2596--2602.
- Hanson, J.R. 2008. *The chemistry of fungi*. The Royal Society of Chemistry, England: xi + 209 hlm.
- Hawser, S. & K. Islam. 1999. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **43**: 411--413.
- 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.
- Herlina, L. 2009. Potensi *Trichoderma harzianum* sebagai biofungisida pada tanaman tomat. *Biosaintifika* **1**(1): 62--69.
- Hogg, S. 2005. *Essential microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd., England: xi + 454 hlm.
- Hosoe, T., N. Mori, K. Kamano, T. Itabashi, T. Yaguchi, & K. Kawai. 2011. A new antifungal yellow pigment from *Aspergillus nishimurae*. *The Journal of Antibiotics* **64**: 211--212.
- Hua, S.S.T., J.L. Baker, & M. Flores-Espiritu. 1999. Interactions of saprophytic yeasts with a *nor* mutant of *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(6): 2738--2740.
- Jackson, M., D.J. Frost, J.P. Karwowski, P.E. Humphrey, S.K. Dahod, W.S. Choi, K. Brandt, L.H. Malmberg, R.R. Rasmussen, M.H. Scherr, R.K. Flamm, S. Kadam, & J.B. McAlpine. 1995. Fusacandins A and B: novel antifungal antibiotics of the papulacandin class from *Fusarium sambucinum*. *The Journal of Antibiotics* **48**(7): 608--613.
- Jain, P. & R.K. Pundir. 2010. Effect of different carbon and nitrogen sources on *Aspergillus terreus* antimicrobial metabolite production. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **5**(3): 72--76.
- 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.

- Kasno, A. 2004. Pencegahan infeksi *Aspergillus flavus* dan kontaminasi aflatoksin pada kacang tanah. *Jurnal Litbang Pertanian* **23**(3): 75--81.
- Kavanagh, K. 2005. *Fungi: biology and application*. John Wiley & Sons, Ltd., England: xi + 263 hlm.
- Khopkar, S. M. 2002. *Konsep dasar kimia analitik*. Edisi pertama. UI-Press, Jakarta: xvi + 429 hlm.
- Klich, M.A. 2002. *Identification of Common Aspergillus Species*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands: v + 116 hlm.
- Kosalec, I., & S. Pepeljnjak. 2005. Mycotoxigenicity of clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* isolates. *Acta Pharmaceutica* **55**: 365--375.
- Kosalec, I., S. Pepeljnjak, & M. Jandrljic. 2005. Influence of media and temperature on gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* strains. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **56**: 269--273.
- Kumar, M.S., P.M. Kumar, H.M. Sarnaik, & A.K. Sadhukhan. 2000. A rapid technique for screening of lovastatin-producing strains of *Aspergillus terreus* by agar plug and *Neurospora crassa* bioassay. *Journal of Microbiological Methods* **40**: 99--104.
- Kurtzman, C. P. & J. W. Fell. 1998. *The yeast, a taxonomic study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam: xvii + 1055 hlm.
- Latha, P.M., P. Chanakya, M. Srikanth. 2012. Lovastatin production by *Aspergillus fischeri* under solid state fermentation from coconut oil cake. *Nepal Journal of Biotechnology* **1**: 26--36.
- Levinson, W. 2008. *Review of medical microbiology and immunology*. 10th ed. McGraw-Hill Company, Inc., California: 842 hlm.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, & J. Parker. 1997. *Brock: biology of microorganism*. 8th ed. Prentice-Hall Inc., New Jersey: xviii + 982 hlm.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, D.A. Stahl & J. Parker. 2012. *Brock: biology of microorganism*. 13th ed. Pearson Education, Inc., United States of America: xv + 1040 hlm.

- Magan, N. & D. Aldred. 2007. Why do fungi produce mycotoxins? *Dalam*: Dijksterhuis, J. & R.A. Samson. (ed). 2007. *Food mycology: a multifaceted approach to fungi and food*. Taylor & Francis Group, LLC., United States of America: xiv + 375 hlm.
- Mann, J. 1995. *Secondary metabolism*. 2nd ed. Oxford University Press Inc., New York: xv + 347 hlm.
- Manzoni, M. & M. Rollini. 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology Biotechnology* **58**: 555--564.
- Marzluf, G.A. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**(1): 17--32.
- Mellon, J.E., M.K. Dowd, & P.J. Cotty. 2002. Time course study of substrate utilization by *Aspergillus flavus* in medium simulating corn (*Zea mays*) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 648--652.
- Miskiyah & Widaningrum. 2008. Pengendalian aflatoksin pada pascapanen jagung melalui penerapan HACCP. *Jurnal Standardisasi* **10**(1): 1--10.
- Nauli, T., & L.Z. Udin. 2006. Model fermentasi lovastatin. *Akta Kimia Indonesia* **1**(2): 99--104.
- Ofodile, L.N., U. C. Kanife, & B. J. Arojojoye. 2010. Antifungal activity of a Nigerian herbal plant *Chrysanthellum americanum*. *Journal of Life and Physical Sciences* **3**(2): 60--63.
- Oshoma, C.E., & M.J. Ikenebomeh. 2005. Production of *Aspergillus niger* biomass from rice bran. *Pakistan Journal of Nutrition* **4**(1): 32--36.
- Oxoid. 2010. Dehydrated culture media. 8 Juni 2011: 1 hlm.  
[http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0097&org=74&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0097&org=74&c=UK&lang=EN), 8 Juni 2011, pk. 20.22.
- Poeloengan, M. 2009. Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun miana (*Coleus seutellarioides* (L.) Benth) terhadap bakteri *Salmonella enteritidis* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Biotika* **7**(2): 61--68.
- Rafliyanti, Y. 2010. Produksi lovastatin kapang *Aspergillus* spp. dan pengaruhnya

- terhadap kadar kolesterol dalam darah tikus (*Rattus norvegicus* L.) galur Sprague dawley. Tesis Sarjana S2 Departemen Biologi Universitas Indonesia.
- Razak, A.R., A.R. Patong, T. Harlim, M.N. Djide, Haslia & Mahdalia. 2009. Produksi senyawa bakteriosin secara fermentasi menggunakan isolat BAL *Enterococcus faecium* DU55 dari dangke. *Indonesia Chemical Acta* **2**(2): 1--9.
- Samiee, S.M., N. Moazami, S. Haghighi, 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.
- Sayyad, S.A., B.P. Panda, S. Javed, & M. Ali. 2007. Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology. *Applied Microbiology Biotechnology* **73**: 1054--1058.
- Shafee, N., S.N. Aris, R.N.Z. Abd Rahman, M. Basri, & A.B. Salleh. 2005. Optimization of environmental and nutritional conditions for the production of alkaline protease by a newly isolated bacterium *Bacillus cereus* strain 146. *Journal of Applied Sciences Research* **1**(1): 1--8.
- Skoog, D.A., D.M. West, F. J. Holler, & S.R. Crouch. 2004. *Fundamentals of analytical chemistry*. 8th ed. Thomson Learning, Inc., New York: xix + 1041 hlm.
- Stanbury, P.F., A. Whitaker, & S.J. Hall. 2003. *Principles of fermentation technology*. Elsevier Science, Ltd., England: xviii + 351 hlm.
- Staniszewska, M., M. Bondaryk, & W. Kurzatkowski. 2011. Morphotypes of *Candida albicans*. Phase-contrast microscopy. *Mikologia Lekarska* **18**(1): 5--10
- Strobel, G.A., R.V. Miller, C.M. Miller, M.M. Condrón, D.B. Teplow, & W. M.

- Hess. 1999. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Microbiology* **145**: 1919--1926.
- Suhirman, S., Hernani, & C. Syukur. 2006. Uji toksisitas ekstrak lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet*) terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach.). *Buletin Balitro* **17**(1): 30--38.
- Ul Haq, I., S. Ali, H. Ashraf, W.A. Butt, M.A. Qadeer, K. Shafiq, & J. Iqbal. 2001. Effect of mineral nutrients on the biosynthesis of citric acid by *Aspergillus niger* UV-6, using sucrose salt media. *Pakistan Journal of Botany* **33**: 535--540.
- Vidyalakshmi, R., R. Paranthaman, S. Muruges, & K. Singaravadivel. 2009. Stimulation of *Monascus* pigments by intervention of different nitrogen sources. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry* **4**(1): 25--28.
- Webster, J. & R. Weber. 2007. *Introduction to fungi*. 3th ed. Cambridge University Press, New York: xix + 817 hlm.
- Wu, Ge. 2010. *Assay development: fundamentals and practices*. John Wiley & Sons, Inc., United State of America: xvii + 423 hlm.
- Zhan Ying Zhang, Bo Jin Zhi Hui Bai, & Xiao Yi Wang. 2008. Production of fungal biomass protein using microfungi from winery wastewater treatment. *Bioresource Technology* **99**: 3871--3876.

## Lampiran 1.

Perhitungan Konsentrasi Natrium Nitrat ( $\text{NaNO}_3$ )

Konsentrasi natrium nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) yang digunakan berdasarkan penelitian Rafliyanti (2010), yaitu 3 g/l. Konsentrasi tersebut kemudian diturunkan dan dinaikkan sebesar 0,5g/l untuk mendapatkan konsentrasi yang optimal. Konsentrasi yang digunakan adalah 2 g/l; 2,5 g/l; 3 g/l; 3,5 g/l; 4 g/l dan konsentrasi 0 g/l sebagai control fermentasi.

Satuan konsentrasi kemudian diubah dalam bentuk molar (M). Molar merupakan sejumlah mol (n) zat yang terlarut dalam 1 liter larutan (V). Mol menyatakan sejumlah massa zat (g) dalam setiap partikel yang memiliki massa molekul relatif (Mr). Perhitungan konsentrasi molar dilakukan berdasarkan rumus sebagai berikut (Skoog *dkk.* 2004: 73--76):

$$M = \frac{n}{V} \quad \text{dan} \quad n = \frac{g}{Mr}$$

Misalnya massa natrium nitrat adalah 3 g, sedangkan massa molekul relatif dari natrium nitrat diketahui sebesar 85 g/mol dan volume larutan (akuades) sebanyak 1 liter, sehingga mol zat dari natrium nitrat adalah:

$$3 \text{ g} / (85 \text{ g/mol}) = 0,035 \text{ mol}$$

molar dari natrium nitrat adalah:

$$0,035 \text{ mol} / 1 \text{ liter} = 0,035 \text{ M}$$

$$= 35 \text{ mM}$$

Jadi, hasil perhitungan molar untuk semua konsentrasi adalah 0 mM, 23 mM, 29 mM, 35 mM, 41 mM, dan 47 mM.

## Lampiran 2.

Uji Normalitas Shapiro-Wilk Terhadap Data Diameter Zona Hambat Rata-rata  
Anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360

---

## Tujuan:

Untuk mengetahui normalitas distribusi data diameter zona hambat rata-rata anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360.

## Hipotesis:

$H_0$  : Data diameter zona hambat rata-rata anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 berdistribusi normal.

$H_a$  : Data diameter zona hambat rata-rata anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 tidak berdistribusi normal.

## Taraf nyata:

Nilai  $\alpha$  yang digunakan pada  $\alpha = 0,05$

## Kriteria pengujian:

Jika  $P < 0,05$ ; maka  $H_0$  ditolak

Jika  $P > 0,05$ ; maka  $H_0$  diterima

## Hasil perhitungan:

Perlakuan	Shapiro-Wilk		
	Statistik	Df	P
Diameter zona hambat	0,916	21	0,710

## Kesimpulan:

Data diameter zona hambat rata-rata anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 berdistribusi normal.



## Lampiran 3.

Uji Homogenitas Levene Terhadap Data Diameter Zona Hambat Rata-rata Anti-  
*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360

---

## Tujuan:

Untuk mengetahui homogenitas variansi data diameter zona hambat rata-rata anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360.

## Hipotesis:

$H_0$  : Data diameter zona hambat rata-rata anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 bervariasi homogen.

$H_a$  : Data diameter zona hambat rata-rata anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 tidak bervariasi homogen.

## Taraf nyata:

Nilai  $\alpha$  yang digunakan pada  $\alpha = 0,05$

## Kriteria pengujian:

Jika  $P < 0,05$ ; maka  $H_0$  ditolak

Jika  $P > 0,05$ ; maka  $H_0$  diterima

## Hasil perhitungan:

Uji Levene	df1	df2	P
1,382	6	14	0,288

## Kesimpulan:

Data diameter zona hambat rata-rata anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC 360 bervariasi homogen.

## Lampiran 4.

Uji perbandingan berganda *Least Significance Difference* (LSD) Terhadap Data Diameter Zona Hambat Rata-rata Anti-*C. albicans* dari *Aspergillus flavus* UICC

360

Tujuan: Mengetahui perbedaan nyata data diameter zona hambat rata-rata antar perlakuan konsentrasi  $\text{NaNO}_3$

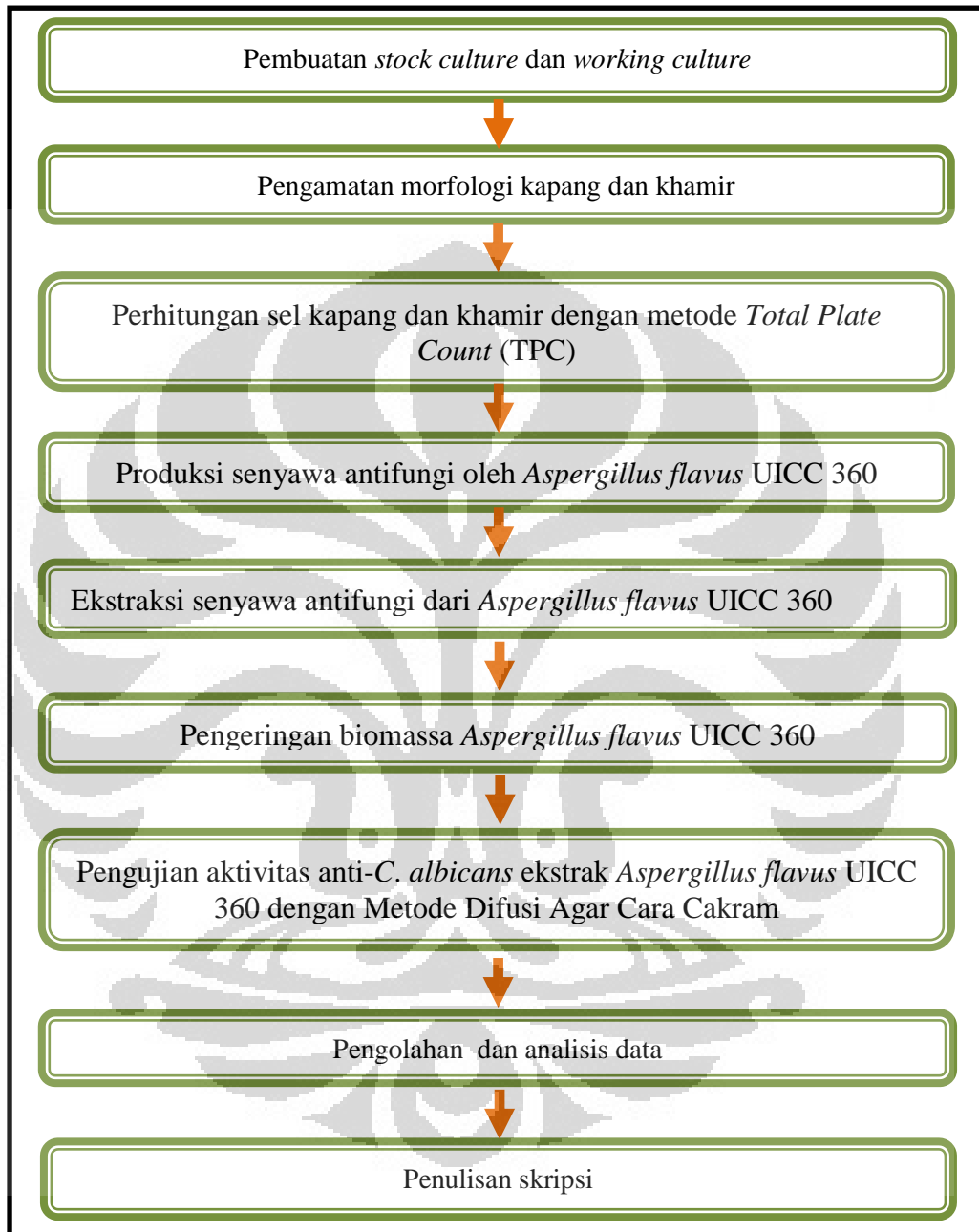
Hasil perhitungan uji LSD dengan ( $\alpha=0,05$ )

(I) Perlakuan Konsentrasi aNO3	(J) Perlakuan Konsentrasi NaNO3	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-1.23333*	.47859	.022	-2.2598	-.2069
	3	-2.76667*	.47859	.000	-3.7931	-1.7402
	4	-3.20000*	.47859	.000	-4.2265	-2.1735
	5	-.90000	.47859	.081	-1.9265	.1265
	6	-.11667	.47859	.811	-1.1431	.9098
	7	-3.15000*	.47859	.000	-4.1765	-2.1235
	2	1	1.23333*	.47859	.022	.2069
3		-1.53333*	.47859	.006	-2.5598	-.5069
4		-1.96667*	.47859	.001	-2.9931	-.9402
5		.33333	.47859	.498	-.6931	1.3598
6		1.11667*	.47859	.035	.0902	2.1431
7		-1.91667*	.47859	.001	-2.9431	-.8902
3		1	2.76667*	.47859	.000	1.7402
	2	1.53333*	.47859	.006	.5069	2.5598
	4	-.43333	.47859	.381	-1.4598	.5931
	5	1.86667*	.47859	.002	.8402	2.8931
	6	2.65000*	.47859	.000	1.6235	3.6765
	7	-.38333	.47859	.437	-1.4098	.6431

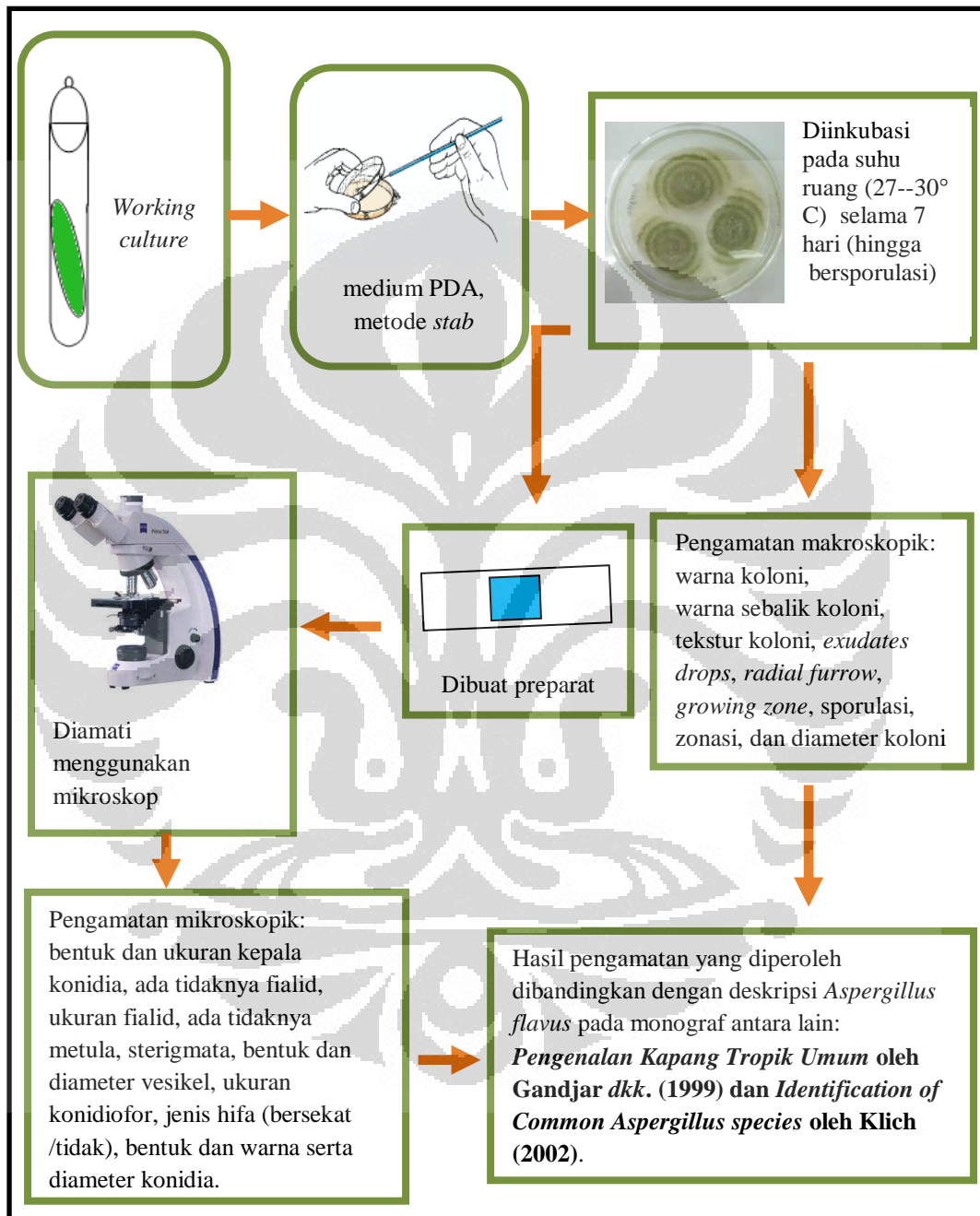
4	1	3.20000*	.47859	.000	2.1735	4.2265
	2	1.96667*	.47859	.001	.9402	2.9931
	3	.43333	.47859	.381	-.5931	1.4598
	5	2.30000*	.47859	.000	1.2735	3.3265
	6	3.08333*	.47859	.000	2.0569	4.1098
	7	.05000	.47859	.918	-.9765	1.0765
	5	1	.90000	.47859	.081	-.1265
2		-.33333	.47859	.498	-1.3598	.6931
3		-1.86667*	.47859	.002	-2.8931	-.8402
4		-2.30000*	.47859	.000	-3.3265	-1.2735
6		.78333	.47859	.124	-.2431	1.8098
7		-2.25000*	.47859	.000	-3.2765	-1.2235
6		1	.11667	.47859	.811	-.9098
	2	-1.11667*	.47859	.035	-2.1431	-.0902
	3	-2.65000*	.47859	.000	-3.6765	-1.6235
	4	-3.08333*	.47859	.000	-4.1098	-2.0569
	5	-.78333	.47859	.124	-1.8098	.2431
	7	-3.03333*	.47859	.000	-4.0598	-2.0069
	7	1	3.15000*	.47859	.000	2.1235
2		1.91667*	.47859	.001	.8902	2.9431
3		.38333	.47859	.437	-.6431	1.4098
4		-.05000	.47859	.918	-1.0765	.9765
5		2.25000*	.47859	.000	1.2235	3.2765
6		3.03333*	.47859	.000	2.0069	4.0598

(\*): menyatakan berbeda nyata

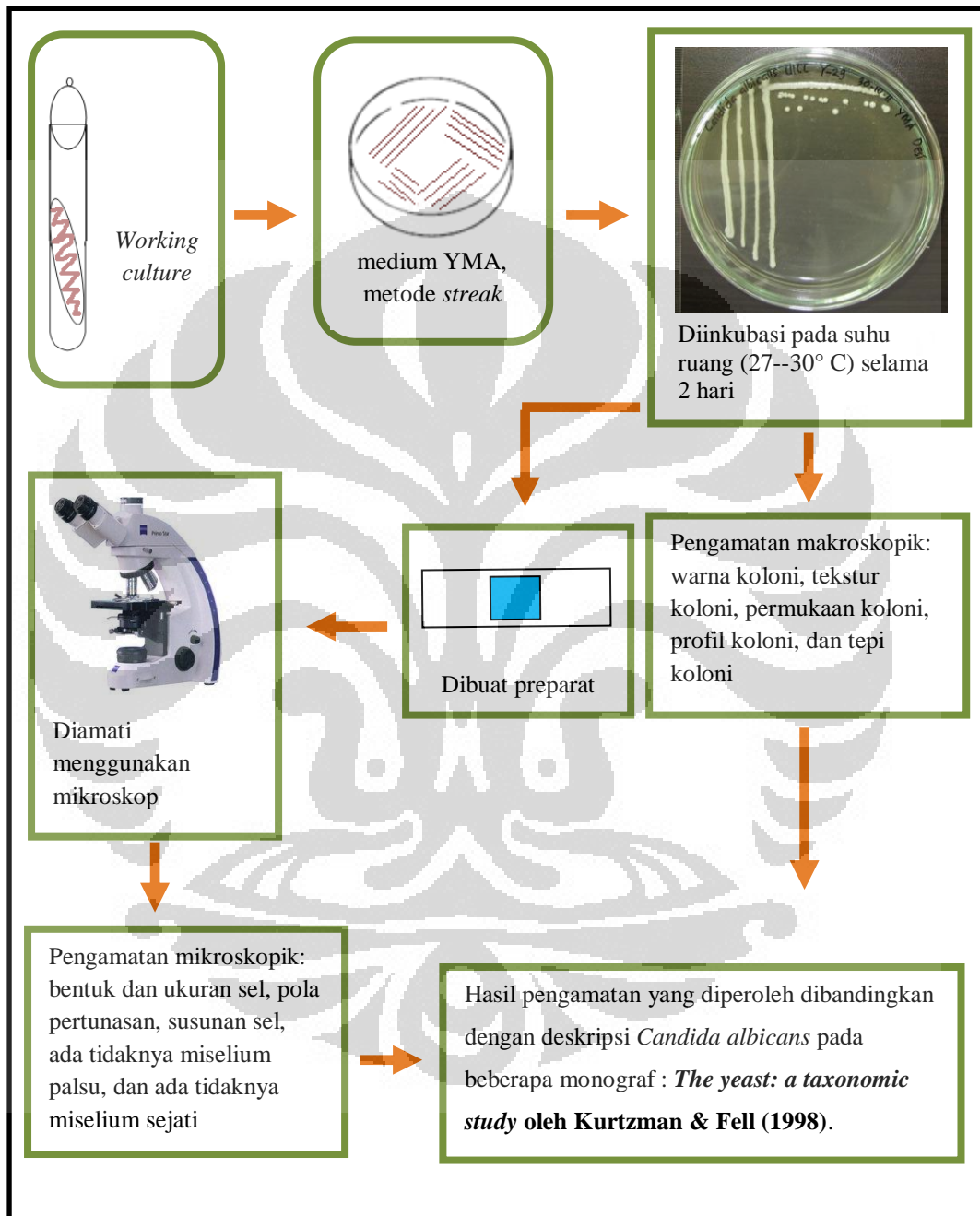
Lampiran 5.  
Skema Kerja Penelitian



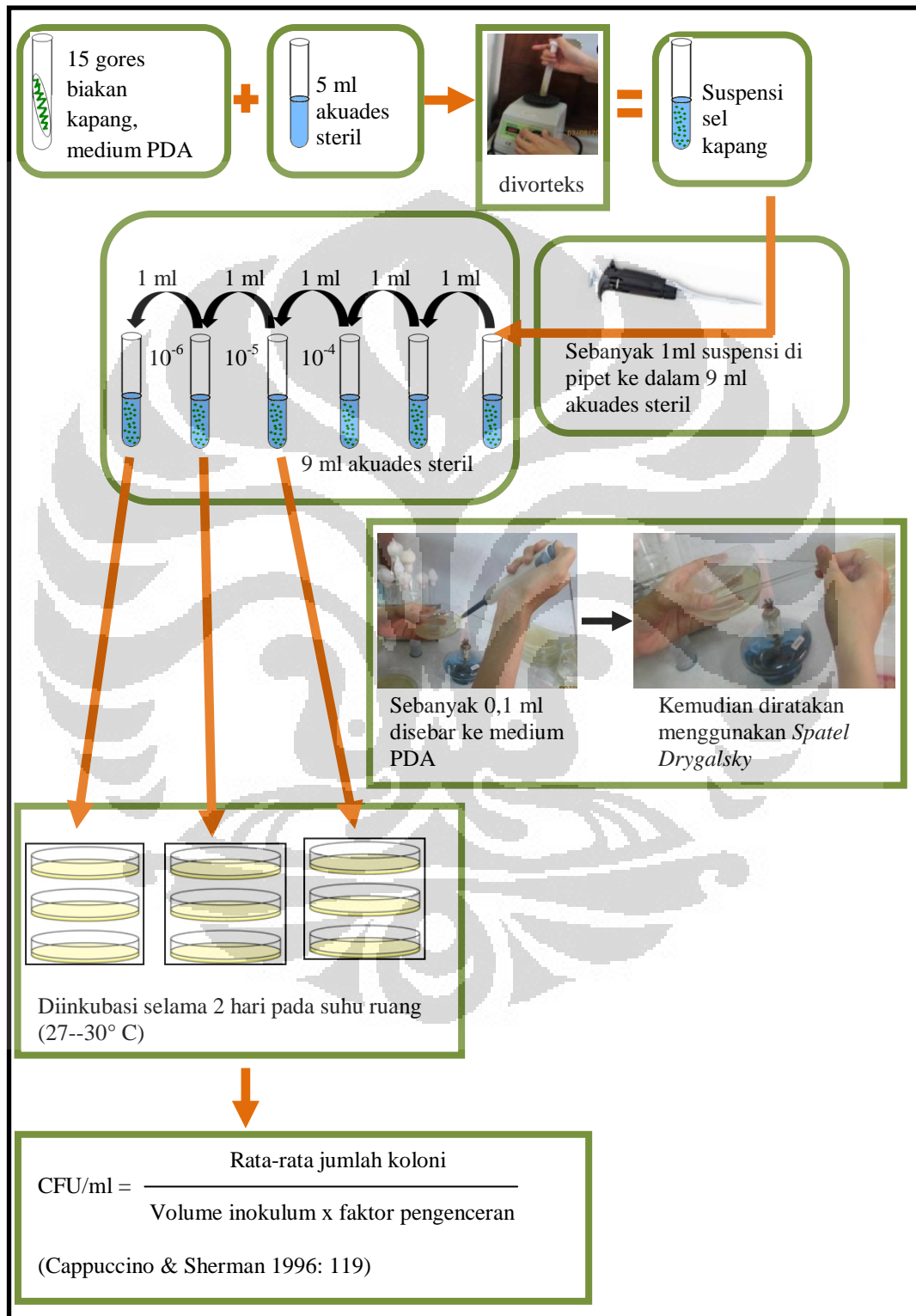
Lampiran 6.  
 Skema Cara Kerja Pengamatan Morfologi Kapang  
 (*Aspergillus Flavus* UICC 360)



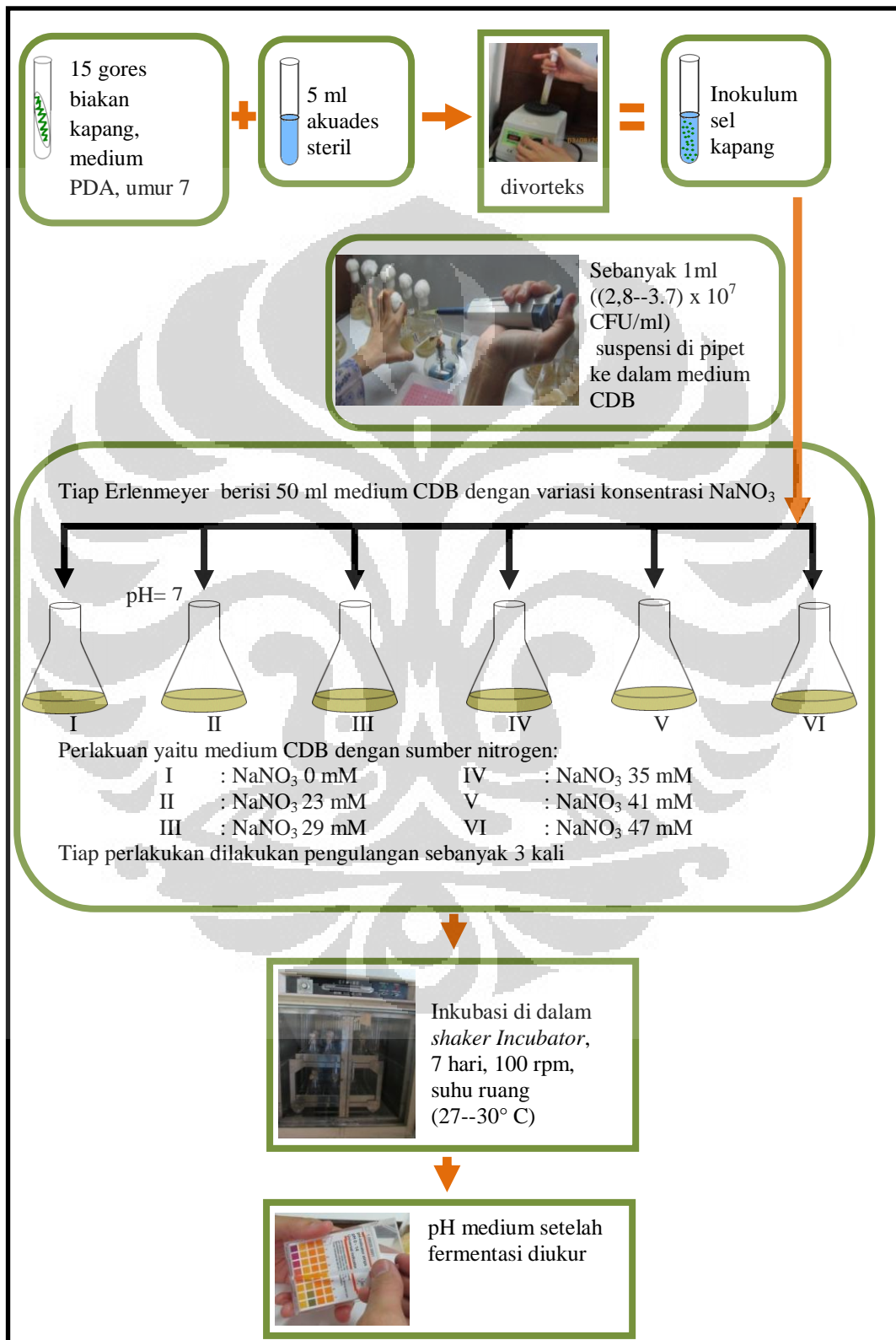
Lampiran 7.  
 Skema Cara Kerja Pengamatan Morfologi Khamir  
 (*Candida albicans* UICC Y-29)



Lampiran 8.  
 Skema Cara Kerja Perhitungan Sel Kapang  
 (*Aspergillus flavus* UICC 360)



Lampiran 9.  
 Skema Cara Kerja Produksi Senyawa Antifungi Oleh  
*Aspergillus flavus* UICC 360

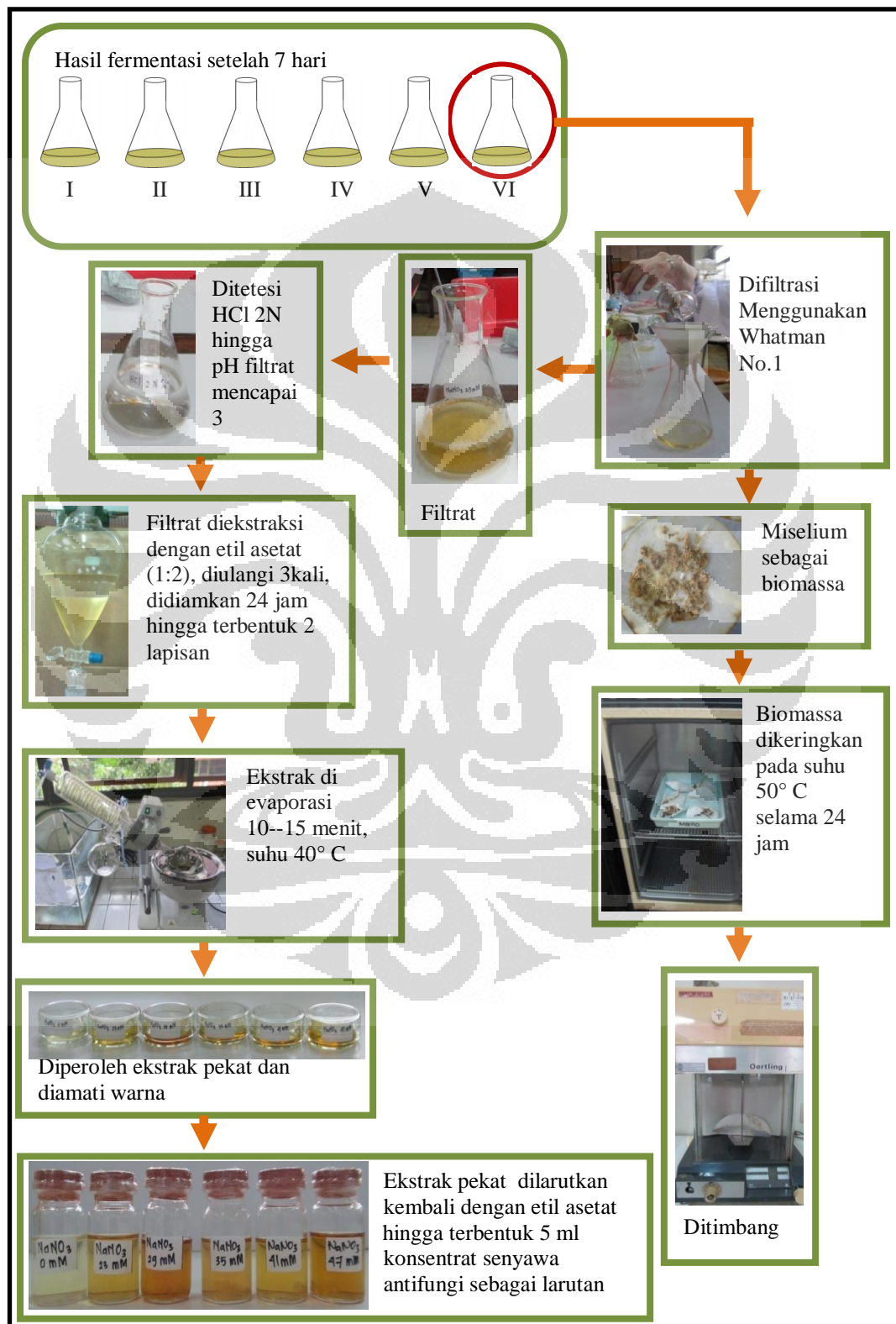


Universitas Indonesia



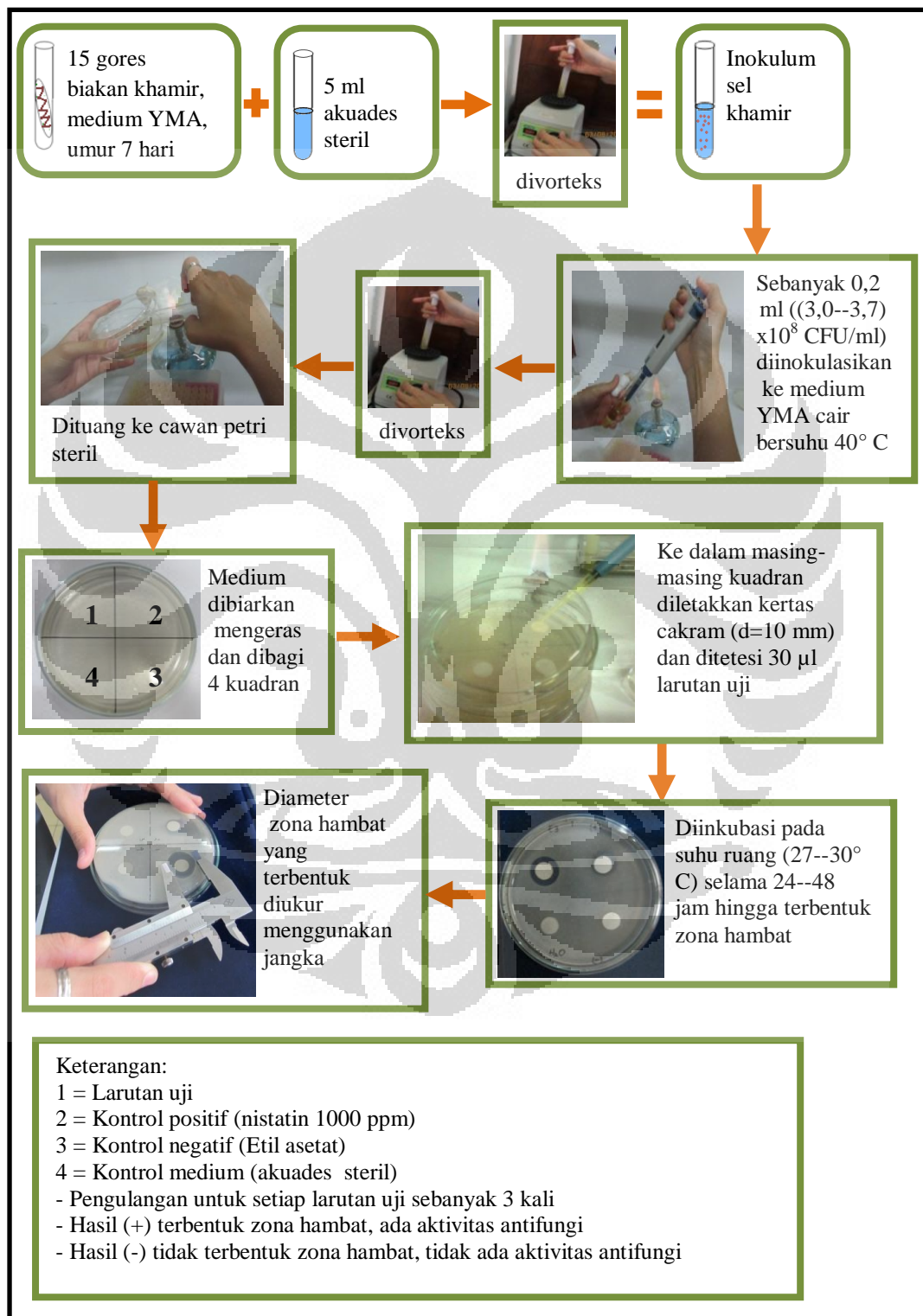
## Lampiran 10.

## Skema Cara Kerja Ekstraksi Senyawa Antifungi dan Pengerinan Biomassa

*Aspergillus flavus* UICC 360

## Lampiran 11.

Skema Cara Kerja Pengujian Aktivitas Anti-*C. albicans* Ekstrak *Aspergillus flavus* UICC 360 Dengan Metode Difusi Agar Cara Cakram



Lampiran 12.  
Panduan Warna *Castell-Polychromos* No. 9216

	101 Putih		136 Ungu loh		171 Hijau muda
	104 Kuning		137 Ungu terung		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