

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK FERMENTAT ISOLAT FUNGI ENDOFIT BIJI BUAH KENARI (*Canarium indicum* L.) SECARA KLT-AUTOGRAFI

Nurul Khatimah Naim¹, Herwin^{1*}, Fitriana¹, Ayyub Harly Nurung¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Indonesia, Makassar

Email: herwin.herwin@umi.ac.id

Article Info:

Received: 2021-11-03

Review: 2021-11-04

Accepted: 2022-01-15

Keywords:

Antioxidants; autography-TLC;
Canarium indicum L.

Corresponding Author:

Herwin

Fakultas Farmasi, Universitas

Muslim Indonesia

Makassar

Indonesia

email: herwin.herwin@umi.ac.id

ABSTRACT

Walnut seeds (*Canarium indicum* L.) contain tannin, flavonoids, carotenoids which is potentially functioning as antioxidants. The research aimed to examine the antioxidant activity of fermentate extract of walnut seeds endophytic fungi by autography-TLC. The result of the endophytic fungi isolation in Walnut seeds (*Canarium indicum* L.) obtained 5 isolates with characteristics. The test result of screening free antiradical activity obtained that isolate 4th was active as an antioxidant indicated by the presence of brown spots with the addition of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 0.004%. Isolate 4th was fermented using Maltosa Yeast Broth (MYB) medium to obtain fermentate supernatant and mycelia. The Fermentate of supernatant of isolate 4th was extracted to obtain supernatant of ethyl acetate extract. Based on the result of free antiradical activity test of ethyl acetate fermentate extract isolate 4th by autography-TLC using ethyl acetate: methanol: water eluent (6:2:1), obtained Rf 0.78 value active as free antiradical by spraying 1,1diphenyl-2-picrylhydrazil 0.004%.



Copyright © 2020 Journal As-Syifaa Farmasi by Faculty of Pharmacy, Muslim University. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License.

PENDAHULUAN

Pemanfaatan obat tradisional yang sekarang ini semakin berkembang dari masa ke masa, maka diperlukannya adanya berbagai jenis tumbuhan/tanaman untuk digunakan sebagai pengobatan. Tanaman yang digunakan sebagai sumber obat dalam tanaman dalam hasil metabolisme tanaman tersebut yaitu berupa metabolit sekunder baik metabolit sekunder dari inangnya maupun yang berasal dari mikroba endofit (fungi dan bakteri endofit). Fungsi metabolit sekunder bagi mikroorganisme penghasil itu sendiri sebagian besar belum jelas metabolit sekunder dan disimpan secara ekstraseluler metabolit

sekunder banyak bermanfaat bagi manusia dan makhluk hidup lain karena banyak diantaranya bersifat sebagai obat.¹

Tanaman yang dapat digunakan sebagai obat adalah tanaman Kenari (*Canarium indicum* L.) banyak digunakan sebagai bahan pangan terutama bagian biji buah kenari. Biji buah kenari senyawa kimia yang dikandung oleh biji buah kenari ialah karetenoid, tokoferol, dan senyawa fenolik termasuk asam fenolik, tannin dan flavonoid. Adanya berbagai kandungan kimia dari tanaman tersebut, maka sangat memungkinkan dimanfaatkan sebagai obat dengan cara isolasi fungi endofit yang

berasosiasi dengan tanaman sehat tanpa memperlihatkan gejala sakit yang sifatnya saling menguntungkan (simbiosis mutualisme). Secara umum dikatakan bahwa hubungan fungi endofit dengan inangnya merupakan relasi mutualisme misalnya dengan meningkatkan ketahanan inang terhadap patogen, melindungi dari serangan hama, membantu ketersediaan nutrisi bagi inang, membantu inang dalam menghadapi kondisi lingkungan yang ekstrim seperti kekeringan atau suhu yang tinggi.²

Fungi endofit menghasilkan berbagai senyawa yang memiliki aktivitas biologi, diantaranya alkaloid, terpenoid, fenolik, dan sebagainya.³ Fungi endofit yang tumbuh pada jaringan tumbuhan obat, yang dapat menghasilkan senyawa yang memiliki khasiat sama dengan tumbuhan inangnya, walaupun jenis senyawa berbeda. Bahkan, senyawa yang dihasilkan fungi endofit seringkali memiliki aktivitas dari tumbuhan inangnya.⁴ Fungi endofit yang hidup di dalam jaringan tumbuhan tanpa menimbulkan gejala penyakit pada tumbuhan inangnya, mampu menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif seperti senyawa antibakteri, antifungi, antivirus, antikanker, antimalaria dan sebagainya.⁵

Dengan adanya kandungan kimia dan manfaat yang dimiliki oleh dari biji buah kenari tersebut, dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan adalah kandungan flavonoid, dimana senyawa tersebut mendonasikan satu atau lebih elektron kepada senyawa, kemudian mengubah senyawa oksidan menjadi senyawa yang lebih tinggi tinggi tidak menginduksi. Untuk mencegah kerusakan oleh radikal bebas adalah dengan menghentikan proses oksidasi secara berlebihan tersebut dengan zat antioksidasi mampu menghentikan proses oksidasi (sebagai reduktan) dengan

memberikan elektronnya kepada radikal sehingga radikal menjadi berpasangan dan stabil.⁶ Pencarian bahan baku sebagai antibakteri dan antiradikal bebas dapat berasal metabolit sekunder suatu tanaman fungi endofit yang dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya membuka peluang untuk menghasilkan metabolit sekunder. Fungi endofit yang di isolasi dari suatu tanaman obat dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder sama dengan tanaman aslinya.⁷

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah Autoklaf (SMIC model YX-280 B0, cawan petri (Normax), gelas Erlenmeyer (Iwaki Pyrex), gelas kimia 250 dan 500 ml (Iwaki Pyrex) incubator (Mamert), Laminar Air Flow (LAF), lampu UV 254nm dan 366 nm, oven (Memert), sheaker, timbangan analitik (Chyo).

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah air suling, medium Maltosa Yeast Broth (MYB), medium Nutrient Agar (NA) medium PDAC (PDA+Cloramphenicol), Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), dan etanol 96%.

Prosedur Penelitian

Sterilisasi alat

Alat yang digunakan dicuci hingga bersih dengan air suling. Alat gelas disterilkan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Alat yang berskala dan tidak tahan terhadap pemanasan dan yang terbuat dari plastik disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Ose disterilkan dengan cara dipijarkan pada lampu spritus.⁸

Pengambilan dan penyiapan sampel

Pengambilan sampel biji buah kenari (*Canarium indicum* L.)

Biji buah kenari (*Canarium indicum* L.) yang diambil kemudian dilakukan sterilisasi permukaan dengan merendam biji buah kenari (dalam larutan etanol 96% selama 5 menit). Setelah itu sampel dibilas dengan aquades steril beberapa kali.⁹

Isolasi fungi endofit biji buah kenari (*Canarium indicum* L.)

Biji buah kenari (*Canarium indicum* L.) yang segar dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan. Sampel dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer 250 mL, ditambahkan etanol 96% sampai terendam, lalu dikocok pelan dan disterilisasi selama 2 menit. Sterilisasi dilakukan dengan secara aseptis di dalam LAF. Sampel biji buah kenari di tanam didalam medium PDA dan diinkubasi selama 3x24 jam. Biakan murni fungi endofit ditumbuhkan pada media PDA dalam cawan petri.^{10,11}

Pemeriksaan makroskopik

Diambil satu ose isolat, diinokulasikan kedalam medium PDA, kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 25°C -30°C selama 3 hari. Hasil dipindahkan pada agar miring sebagai stok. Setiap isolat diambil satu ose diinokulasikan kedalam medium Nutrien Agar (NA) untuk bakteri dan Potato dextrosa Agar (PDA) untuk jamur. Inkubasi selama 1–5 hari pada suhu 37°C untuk bakteri dan pada suhu 25°C selama 1-8 hari untuk jamur. Pengamatan makroskopik isolat dilakukan dengan mengamati bentuk koloni, pinggiran/tepi koloni, elevasi, warna dan struktur dalam koloni.^{12,13}

Pemurnian isolat fungi endofit

Medium yang digunakan untuk pemurnian fungi endofit yaitu medium PDAC miring. Fungi endofit yang tumbuh pada medium PDAC miring, dimurnikan dengan metode kuadran dalam cawan petri. Setiap koloni yang berbeda bentuk maupun warnanya

diinokulasikan kembali pada medium PDAC miring sampai diperoleh koloni murni.¹³

Fermentasi isolat fungi endofit

Koloni jamur endofit yang telah diinkubasi pada medium PDAC selama 24 jam pada suhu diam 25°C diambil satu ose dan ditumbuhkan pada medium MYB (*Maltosa Yeast Broth*), dalam tabung reaksi pada suhu 25°C selama 3 hari sampai tampak jamur yang tumbuh. Setelah itu, jamur yang tumbuh pada tabung reaksi tersebut dishaker dengan dengan kecepatan 200 rpm selama 14 hari. Selain itu, masing-masing medium disentrifuge dengan kecepatan 3800 rpm selama 20 menit. Supernatan diambil dan digunakan untuk pengujian aktivitas.¹⁴

Ekstrak fermentat isolat

Setelah proses fermentasi berakhir, fermentat dari supernatan dipisahkan dari misellia fungi dengan cara disentrifuge 6000 rpm selama 10 menit menggunakan kertas saring. Media fermentasi tersebut diekstrak dengan pelarut yang telah diskriming, kemudian dimasukkan kedalam corong pisah, dan dikocok perlahan selama 5 menit, setelah dikocok fermentat supernatant dan pelarut didiamkan beberapa saat untuk memisahkan bagian media dan pelarut yang telah tercampur selama proses pengocokan. Setelah dua bagian tersebut telah terpisah kembali, pelarut yang mengandung senyawa bioaktif terlarut dituang kedalam cawan porselin, selanjutnya pelarut diuapkan untuk menghasilkan ekstrak.

Pengujian skrining antiradikal bebas dari isolat fungi endofit

Stok murni isolat fungi diinokulasikan kedalam tabung reaksi yang berisi medium MYB, kemudian di shaker pada kecepatan 200 rpm selama 7 hari. Hasil fermentasi isolat fungi endofit dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL. Untuk menguji aktivitas

antiradikal bebas, hasil fermentasi dalam tabung reaksi ditambahkan DPPH 0,004% sebanyak 200 µL. Senyawa aktif sebagai penangkal radikal bebas akan memberikan perubahan warna menjadi warna kuning atau coklat.¹⁵

Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak fermentat isolat fungi biji buah kenari (*Canarium indicum* L.) dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan menggunakan campuran eluen yang sesuai. Kemudian ekstrak etil asetat fermentat isolatfungi endofit tersebut ditotolkan pada lempeng KLT dengan menggunakan pipa kapiler. Kromatogram yang dihasilkan diamati bercaknya di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

Pengujian aktivitas antiradikal bebas secara KLT – Autografi

Dalam uji aktivitas antiradikal bebas DPPH dengan metode KLT-autografi inisebanyak 1,0 mg ekstrak dilarutkan dalam 2,0 mL metanol, kemudian diidentifikasi pada kromatografi lapis tipis dengan eluen yang sesuai. Setelah dikeringkan, pelat KLTdisemprot dengan DPPH 0,004% dalam metanol. Senyawa aktif sebagai penangkal radikal bebas akan memberikan bercak kuning berlatar ungu setelah disimpan selama 30 menit.¹⁵

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi fungi endofit pada biji buah kenari (*Canarium indicum* L.) menggunakan medium Potato Dekstrosa Agar (PDA) diperoleh 5 koloni fungi endofit. Hasil isolasi dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil isolasi fungi endofit dari Biji Buah Kenari (*Canarium indicum* L.)

No	Kode jamur	Warna	Bentuk	Tepi	Elevasi
1	Koloni 1	Putih	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Clateriform</i>
2	Koloni 2	Putih	<i>Concentric</i>	<i>Undulate</i>	<i>Clateriform</i>
3	Koloni 3	Putih	<i>Irregular</i>	<i>Lobate</i>	<i>Clateriform</i>
4	Koloni 4	Putih	<i>Flamentous</i>	<i>Smooth</i>	<i>Raised</i>
5	Koloni 5	Putih	<i>Raised margin</i>	<i>Smooth</i>	<i>Clateriform</i>

Berdasarkan hasil isolasi diatas menunjukkan bahwa 5 koloni fungi endofit pada tanaman biji buah kenari (*Canarium indicum* L.) yang diduga berpotensi sebagai aktivitas antiradikal bebas adalah koloni 1, koloni 2, koloni 3, koloni 4 dan koloni 5. Koloni fungi

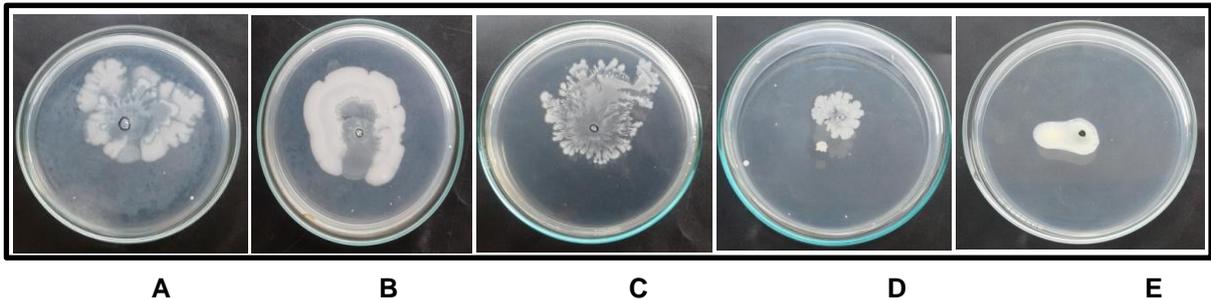
endofit yang diperoleh dilakukan pemeriksaan makroskopik, yaitu dengan melihat bentuk morfologi fungi endofit dari tanaman biji buah kenari (*Canarium Indicum* L.). Hasil dapat dilihat pada tabel 2, Gambar 1.

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Makroskopik Isolat Fungi Endofit Pada Tanaman Biji Buah Kenari (*Canarium Indicum* L.)

No	Kode jamur	Warna	Bentuk	Tepi	Elevasi
1	Isolat 1	Putih	<i>Irregulsr</i>	<i>Undulate</i>	<i>Raised</i>
2	Isolat 2	Putih	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Raised</i>
3	Isolat 3	Putih	<i>flamentous</i>	<i>Entire</i>	<i>Umbonate</i>
4	Isolat 4	Putih	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Raised</i>
5	Isolat 5	Putih	<i>Flamentous</i>	<i>Entire</i>	<i>Umbonate</i>

Berdasarkan hasil pemeriksaan secara makroskopik yang telah dilakukan isolat 1, 2, 3, 4 dan 5 memiliki warna, bentuk, tepi, dan elevasi yang hampir sama. Isolat 1, isolat 2, isolat 3, isolat 4, isolat 5 kesamaan warna yaitu warna putih, kemudian bentuk koloni, dimana isolat 1 memiliki bentuk irregular, isolat 2 dan isolat 4 memiliki bentuk yang sama yaitu circular, isolat 3 dan 5 memiliki bentuk yang sama yaitu filamentous, berdasarkan tepi koloni pada isolat 1 memiliki tepi undulate

sedangkan isolat 2, isolat 3, isolat 4, isolat 5 memiliki tepi yang sama yaitu entire. Dan berdasarkan bentuk elevasi koloni pada isolat 1, isolat 2, dan isolat 4 memiliki elevasi yang sama yaitu raised sedangkan isolat 3, dan isolat 5 memiliki elevasi yang sama yaitu umbonate. Koloni yang memiliki pencirian yang berbeda diamati secara makroskopik dengan melihat warna koloni, bentuk koloni, dan elevasi koloni.



Gambar 1. Foto hasil pemeriksaan makroskopik dari Biji buah kenari (*Canarium indicum*). (A): Pemeriksaan makroskopik Isolat 1; (B): Pemeriksaan makroskopik Isolat 2; (C): Pemeriksaan makroskopik Isolat 3; (D): Pemeriksaan makroskopik Isolat 4; (E): Pemeriksaan makroskopik Isolat 5.

Isolat yang diperoleh kemudian dimurnikan dengan menggunakan metode kuadran pada medium PDA (Potato Dextrosa Agar), lalu diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu kamar. Metode ini bertujuan untuk memperoleh koloni fungi tunggal. Jika telah ditemukan kultur murni maka perlakuan pemurnian dihentikan. Kultur murni adalah kultur yang terdiri dari sel yang sama bentuk dan ukurannya. Dari hasil pemurnian diperoleh isolat 1 untuk biakan fungi ke-1, isolat 2 untuk biakan fungi ke-2, isolat 3 untuk biakan fungi ke-3, isolat 4 untuk biakan fungi ke-4, isolat 5 untuk biakan fungi ke-5 kemudian diinokulasikan ke medium PDAC (Potato Dextrosa Agar+Chloramphenicol) miring sebagai stok.

Hasil pengujian skrining aktivitas antiradikal bebas pengujian ini dilakukan pada beberapa isolat fungi endofit yaitu isolat 1,

isolat 2, isolat 3, isolat 4, isolat 5. Isolat yang digunakan merupakan hasil isolasi dari fungi endofit tanaman biji buah kenari (*Canarium Indicum* L.) hasil uji skrining dapat dilihat pada pada tabel 3.

Hasil pengujian skrining tersebut menunjukkan bahwa isolat 4 yang memiliki aktivitas sebagai antiradikal bebas setelah ditambahkan dengan (2,2 diphenyl -1-picrylhydrazyl) DPPH 0,004% dan yang paling baik dari semua isolat yang digunakan. Pengujian skrining isolat murni isolatke-4 difermentasi dalam medium Maltose Yeast Broth (MYB) untuk memperoleh zat aktif dari fungi endofit, kemudian diinkubasi dan dishaker selama 7x24 jam dengan kecepatan 200 rpm agar selama proses fermentasi fungi endofit ini akan mencapai fase stasioner dan menghasilkan metabolit sekunder dan disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm

selama 10 menit untuk memisahkan cairan fermentasi supernatan dan miselia. Fermentasi ini dilakukan dengan prinsip metabolisme mikroba untuk mengubah bahan baku menjadi produk yang bernilai lebih tinggi seperti asam-asam organik, protein sel tunggal, antibiotika dan biopolimer (Muhidin, 2001). Fermentat yang diperoleh yang diperoleh diekstraksi dengan pelarut etil asetat (1: 1)/V/V) dalam

corong pisah selama 20 menit hingga diperoleh ekstrak etil asetat.

Hasil identifikasi senyawa ekstrak etil asetat fermentat isolat ke-4 fungi endofit dari tanaman biji buah kenari (*Canarium Indicum L.*) secara KLT-Autografi menggunakan eluen etil: metanol: air (6:2:1), sebagaimana terlihat pada tabel 4.

Tabel 3. Hasil uji skrining aktivitas antiradikal bebas dari tanaman Biji buah kenari (*Canarium Indicum L.*)

No	Kode isolat fungi	Warna
1	Isolat 1	Ungu kecoklatan
2	Isolat 2	Ungu kecoklatan
3	Isolat 3	Ungu kecoklatan
4	Isolat 4	Coklat
5	Isolat 5	Ungu kecoklatan

Tabel 4. Hasil identifikasi senyawa ekstrak etil asetat fermentat isolat fungi endofit pada Buah Biji kenari (*Canarium indicum L.*) menggunakan eluen etil : methanol : air (6 : 2 : 1)

Bercak Rf	Warna pada penampak bercak	
	UV 254 nm	UV 366 nm
0,78	Hijau	Ungu

Hasil fermentasi kemudian dilakukan pengujian aktivitas antiradikal bebas terhadap isolasi fungi endofit, bertujuan untuk melihat isolat 4 yang memiliki potensi sebagai antiradikal bebas. Metode yang digunakan dalam pengujian ini adalah metode KLT-Autografi dengan menggunakan lempeng kromatografi lapis tipis (KLT). Apapun prinsip kerja dari metode ini didasarkan atas difusi dari senyawa yang telah dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan eluen etil : metanol : air (6 : 2: 1). Hasil identifikasi senyawa ekstrak etil asetat fermentat

isolat fungi endofit dari tanaman Biji buah kenari (*Canarium Indicum L.*) menggunakan campuran eluen etil asetat : metanol : air (6: 2: 1) dengan warna penampak bercak lampu UV 254 nm dengan warna hijau dan UV 366 warna ungu dengan bercak Rf = 0,78.

Hasil identifikasi senyawa ekstrak etil asetat isolasi fungi endofit dari tanaman Biji buah kenari (*Canarium Indicum L.*) selanjutnya dilakukan pengujian KLT-Autografi dengan menggunakan metode penyemprotan dengan DPPH 0,004 %.

Tabel 5. Hasil pengujian KLT-Autografi senyawa ekstrak fermentat isolat fungi endofit pada tanaman Biji buah kenari (*Canarium Indicum L.*)

No	Nilai Bercak Aktif	Keterangan
1	0,78	Kuning berlatar ungu

Hasil pengujian secara KLT – Autografi untuk ekstrak fermentat isolat fungi endofit. Senyawa yang aktif sebagai penangkal radikal bebas akan memberikan bercak kuning berlatar ungu dengan menyempotkan DPPH 0,004% dalam etil asetat dengan nilai Rf bercak aktif = 0,78. Pengujian daya antioksidan dengan metode DPPH secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan reaksi warna. Semakin besar konsentrasi larutan uji maka semakin besar daya antioksidannya. Daya antioksidan ditunjukkan dengan kemampuannya memudarkan warna ungu dari senyawa radikal bebas DPPH. Daya antioksidan ini disebabkan karena DPPH memiliki satu atom N yang elektronnya tidak berpasangan yang apabila bereaksi dengan senyawa yang dapat meredam radikal bebas (senyawa antioksidan) maka akan terjadi pengikatan satu elektron dengan atom yang dapat mendonorkan elektronnya (atom H) membentuk *diphenilpicrylhydrazin* yang stabil. Pada pengujian KLT–Autografi setelah disemprot dengan DPPH 0,004% dalam etil asetat. Senyawa aktif sebagai penangkal radikal bebas akan memberikan bercak kuning berlatar ungu setelah disimpan selama 30 menit.

KESIMPULAN

Biji buah kenari (*Canarium indicum* L.) mengandung fungi endofit sebanyak 5 isolat yaitu isolat 1, isolat 2, isolat 3, isolat 4, isolat 5 yang mempunyai potensi sebagai antiradikal bebas dengan isolat yang paling aktif adalah isolat ke-4. Komponen kimia pada fermentat isolat fungi endofit yang aktif sebagai antiradikal bebas adalah isolat ke-4 dengan nilai Rf = 0,78.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pratiwi ST. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Penerbit Erlangga., 2008.
2. Yuan Z, Zhang C, Lin F. Role of diverse non-systemic fungal endophytes in plant performance and response to stress: progress and approaches. *J Plant Growth Regul.* 2010;29:116-126.
3. Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional Metabolites. *Nat Prod. Rep.* 2001;18:448- 459.
4. Prihatianingtias W. *Senyawa Bioaktif Fungi Endofit Akar Kuning (*Fibrarea chloroleuca* Amires) Sebagai Agenia Antimikroba* (Tesis). Yogyakarta: Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, 2005.
5. Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J. Natural Products From Endophytic Microorganism. *J Nat Prod.* 2004;67(2):257-68.
6. Winarsi H. *Antioksidan Alami Dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius., 2007.
7. Radji M. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit Dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2005, Vol. 2(3). pp. 113-126.
8. James and Agalloco. *Validation of Pharmaceutical Processes (electronic version)*. USA: Informa Healthcare Inc, 2008
9. Asnita, Herwin, Kosman R. Isolasi dan identifikasi fungi endofit batang sesuru (*Euphorbia antiquorum* L.) sebagai penghasil antibakteri dengan metode KLT-Bioautografi. *As-Syifaa: Jurnal Ilmiah.* 2020;2(12):144-149.
10. Tomita F. Endophytes in Southeast Asia and Japan: Their Taxonomic Diversity And Potential Applications. *Fungal Diversity.* 2003;14:187-204.
11. Herwin. Isolasi fungi endofit penghasil antibiotika pada Alga Merah Jenis *Gracilaria verrucosa* Secara KLT-Bioautografi. *As-Syifaa: Jurnal Ilmiah.* 2018;10(1):83-91.
12. Harmita, Radji M. *Buku ajar analisis hayati, edisi 3*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 2008.
13. Wahyuni S, Herwin, Kosman R. Isolation and activity antibacterial of isolates endophyte fungi of *Jatropha multifida* L.

- Stem. Journal Microbiology Science. 2021;1(1):1-9.
14. Fitriana, Abdullah AS, Achmar A. Profil bioautogram ekstrak fermentat isolat fungi endofit dari daun galing-galing (*Cayratia tiffolia*) sebagai antibakteri. As-Syifaa Jurnal Farmasi. 2019;11(1):17-21.
 15. Herwin, Baits M, Ririn. Aktivitas Antibakteri Dan Antioksidan Fraksi Daun *Colocacia Esculenta* L. Dengan Metode KLT-Bioautografi Dan Difenilpikril Hidrazil. Jurnal Ilmiah As-Syifaa. 2015;7(2):174-181.