

AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ISOLAT FUNGI ENDOFIT DARI AKAR MANGROVE (*Rhizophora apiculata* Blume) SECARA KLT BIOAUTOGRAFI

Fitriana, Eka Nursithya

Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia, Makassar
Email : fitriana.fitriana@umi.ac.id

ABSTRACT

Endophytic fungi have the ability to produce bioactive compounds one of which is antibacterial. A search of bioactive compounds in this research are the first was isolated endophytic fungi on the roots of mangrove then be purified and macroscopic order to obtain pure 6 isolates endophytic fungi. Proceed with the screening test to test bacteria and endophytic fungal isolates obtained first by IJM 2 code which provides activity against 5 test bacteria with the formation of the largest inhibition zone diameter. Then proceed with the fermentation of isolates IJM 2 for 21 days at room temperature using Potato Dextrose Broth medium after the separation to obtain a supernatant and mycelia. Then proceed with the solvent extraction using ethyl acetate and the extract obtained extract supernatant and mycelia. The extract obtained is then followed by TLC-Bioautografi testing using the eluent n-butanol: acetic acid: water (8: 1: 2). Results chromatogram profile with KLT-Bioautografi method showed antibacterial activity against bacteria Shigella dysenteriae, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella thypii, Vibrio cholerae, Stahpylococcus aureus.

Keywords: Endophytic fungi, antibacterial, *Rhizophora apiculata* Blume.

PENDAHULUAN

Salah satu sumber senyawa bioaktif adalah jamur endofit. Jamur ini dapat hidup di dalam jaringan tanaman dan merupakan sumber alam yang melimpah dan dapat dijadikan sebagai sumber penemuan obat baru. Endofit mampu memproduksi senyawa yang mirip atau sama dengan senyawa yang diproduksi inangnya karena telah terjadi rekombinasi genetik antara endofit dengan inang.¹

Fungi endofit memiliki kemampuan untuk memproduksi senyawa bioaktif, baik yang sama maupun tidak sama dengan inangnya tetapi seringkali memiliki aktivitas biologis yang serupa dengan senyawa bioaktif yang diproduksi inangnya. Hal ini menunjukkan senyawa bioaktif tidak hanya didapatkan pada kandungan tanaman obat saja.² Strobel (2003), bahkan menyatakan bahwa senyawa yang dihasilkan oleh fungi endofit

Aktivitas antibakteri ekstrak isolat fungi endofit dari akar mangrove (Rhizophora apiculata Blume) secara KLT Bioautografi.

seringkali memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan aktivitas senyawa tumbuh inangnya.²

Tumbuhan mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume) sejak lama sudah diketahui mempunyai khasiat sebagai obat-obatan tradisional untuk mengobati beberapa penyakit. Penggunaan daun, buah, batang, dan akar dari mangrove telah diketahui mempunyai aktivitas antibakteri yang cukup luas. Beberapa ilmuwan menyebutkan bahwa senyawa bioaktif yang terdapat dalam akar mangrove tidak selalu berasal dari tanaman mangrove itu sendiri, tetapi dapat berasal dari makhluk lain yang mensintesis bioaktif didalam bagian mangrove tersebut, berdasarkan hal ini maka dapat diduga bahwa terdapat jamur endofit yang mendiami tumbuhan tersebut dan berperan sebagai penghasil senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antibakteri.³ Tumbuhan mangrove memiliki kandungan senyawa aktif diantaranya saponin, flavonoid, dan tanin. Senyawa aktif ini memiliki kemampuan sebagai anti bakteri.³

Berdasarkan penelitian sebelumnya mengenai pengujian fungsi endofit dari daun mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume) terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*

dengan menggunakan metode difusi agar diperoleh hasil yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri⁴, sehingga perlu dilakukan penelitian mengenai aktivitas antibakteri ekstrak isolat fungi endofit yang berasal dari akar tumbuhan mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume) dengan menggunakan metode KLT Bioautografi. Metode KLT Bioautografi digunakan karena mampu mendeteksi adanya senyawa antimikroba karena letak bercak dapat ditentukan walaupun berada dalam campuran yang kompleks sehingga memungkinkan untuk mengisolasi senyawa aktif tersebut.⁵

METODE PENELITIAN

Alat - alat yang di gunakan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu Alat-alat gelas, Otoklaf (SMIC Model YX-280 B), cawan Petri (Normax), gelas Erlenmeyer 250 dan 500 mL (Iwaki Pyrex), gelas kimia 250 dan 500 mL (Iwaki Pyrex), inkubator (Memmert), lampu spiritus, lampu UV 254 dan 366 nm (Philips), oven (Memmert), shaker, timbangan analitik (Chyo).

Bahan – bahan yang di gunakan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu aquadest steril, etanol 70%, etil asetat, lempeng KLT, larutan NaCl 0,9%, medium

Aktivitas antibakteri ekstrak isolat fungi endofit dari akar mangrove (Rhizophora apiculata Blume) secara KLT Bioautografi.

Nutrien Agar (NA), medium Potato Dextrosa Agar (PDA), Potato Dekstrosa Broth (PDB), kloramfenikol, bakteri uji *Basillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella thyposa* NCTC 786, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *streptococcus mutans*, *Vibrio cholerae* dan sampel akar tumbuhan mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume).

Prosedur penelitian

Penyiapan sampel

Sampel penelitian yang digunakan berupa akar mangrove. Sampel yang dikumpulkan dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir, akar mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume) yang segar dicuci dengan air mengalir guna menghilangkan tanah dan kotoran yang menempel. Selanjutnya didesinfeksi permukaan akar mangrove menggunakan etanol 70% selama 2 menit, kemudian dibilas dengan aquadest steril sebanyak 3 kali masing-masing selama 1 menit.⁴

Isolasi fungi endofit

Akar mangrove dipotong kecil-kecil menjadi ± 2 cm. Potongan kecil akar mangrove tersebut diletakkan diatas medium Potato Dekstrosa Broth Chloramphenicol (PDAC) didalam

cawan petri steril yang kemudian diinkubasi pada suhu 25°C-30°C selama 3 hari. Setelah 3-5 hari fungi yang tumbuh, kemudian diisolasi dan dimurnikan pada medium Potato Dekstrosa Broth (PDA) yang baru. Selama pekerjaan dilakukan secara aseptis didalam Laminar Air Flow (LAF).⁶

Pemurnian dan Makroskopik

Permurnian dilakukan dengan cara pemindahan masing-masing isolat fungi ke media Potato Dekstrosa Broth (PDA) yang baru, kemudian diinkubasi selama 3-5 hari pada suhu kamar. Pemurnian dilakukan sampai diperoleh isolat fungi murni yang tunggal dan dilakukan analisis secara makroskopik untuk membedakan isolat fungi yang murni.⁷

Uji skrining aktivitas antibakteri

Semua isolat dari fungi endofit akar mangrove ditumbuhkan kedalam medium Potato Dekstrosa Broth (PDA), kemudian isolat fungi endofit dipotong kecil ± 1 cm, ditempatkan dipermukaan medium NA yang telah berisi bakteri uji. Selanjutnya diinkubasi 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Masing-masing isolat diamati kemampuannya dalam menghambat bakteri uji yang ditandai terbentuknya zona bening.⁶

Fermentasi isolate

Fungi endofit yang memberikan aktivitas terbesar sebagai isolat terpilih selanjutnya ditumbuhkan pada media PDA, kemudian jamur yang tumbuh dipotong 1,5 cm X 1,5 cm dengan ose bulat lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL yang berisi 100 mL media PDB untuk fermentasi. Fermentasi secara dinamis menggunakan shaker dengan kecepatan 200 rpm selama 3 minggu.⁷

Ekstrak isolate

Setelah 3 minggu hasil fermentasi disaring untuk memisahkan supernatan dan miselia. Supernatan di ekstraksi 2 kali dengan pelarut etil asetat sedangkan miselia di maserasi selama 24 jam dengan pelarut etil asetat. Pelarut diuapkan sampai diperoleh ekstrak kering.⁷

Identifikasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Lempeng KLT sebelum digunakan diaktifkan terlebih dahulu dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit sebelum digunakan. Fermentat dilarutkan dengan pelarut etil asetat kemudian ditotolkan pada lempeng KLT ukuran 7x1 cm menggunakan pipa kapiler.

Kemudian dielusi dengan menggunakan cairan pengelusi n-butanol : asam asetat : air dengan perbandingan 8:1:2 dan lempeng di masukkan kedalam chamber. Lempeng dikeluarkan dari chamber dan diangin-anginkan sehingga cairan pengelusnya menguap. Kemudian kromatogram yang dihasilkan diamati nodanya dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.⁶

Pengujian secara KLT-Bioautografi

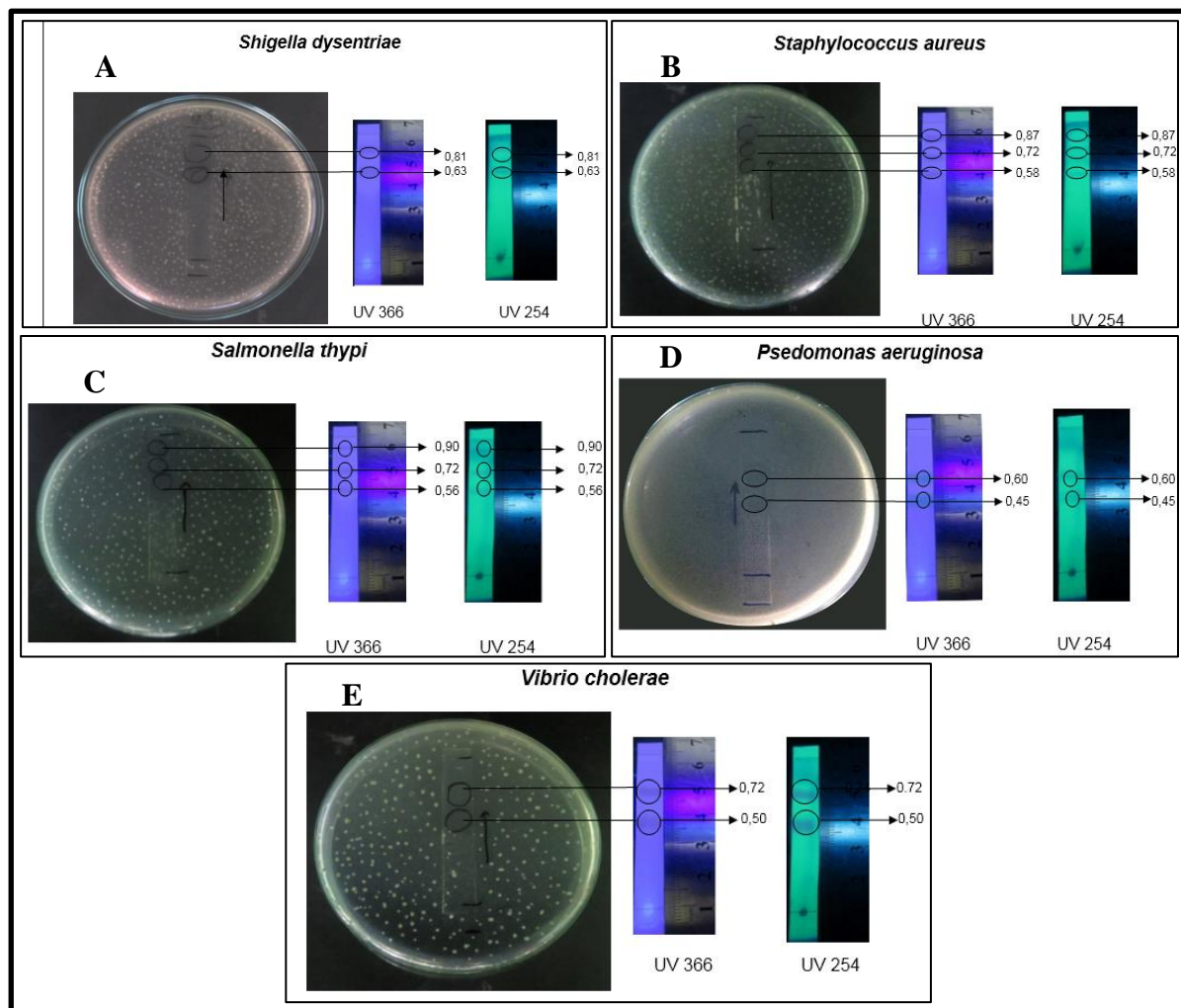
Hasil identifikasi KLT menggunakan eluen n-butanol : asam asetat : air (8:1:2) dilanjutkan dengan uji KLT-Bioautografi dengan cara kedalam cawan petri dituang NA sebanyak 10 mL dan ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 20 µL lalu dihomogenkan, lempeng KLT yang telah dielusi diletakkan diatas permukaan medium agar yang telah diinokulasikan dengan mikroba uji kemudian dibiarkan selama 60 menit. Setelah itu lempeng diangkat dan dikeluarkan, selanjutnya diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C kemudian diamati bercak yang memberikan aktivitas penghamabatan terhadap pertumbuhan bakteri uji.⁸

Aktivitas antibakteri ekstrak isolat fungi endofit dari akar mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume) secara KLT Bioautografi.

HASIL PENELITIAN

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antibakteri fermentat supernatan isolat jamur endofit akar mangrove IJAM 2.

No	Nilai Rf	Warna pada penampak bercak	Kode bakteri Uji aktif
		UV 366 nm	
1	0,89 0,72 0,90	Biru Berpendar	<i>S. dysenteriae</i>
2	0,72 0,60 0,91	Biru Berpendar	<i>S. aureus</i>
3	0,70 0,61	Biru Berpendar	<i>S. typhi</i>
4	0,70 0,58	Biru Berpendar	<i>P. aeruginosa</i>
5	0,74 0,61	Biru Berpendar	<i>V. cholerae</i>

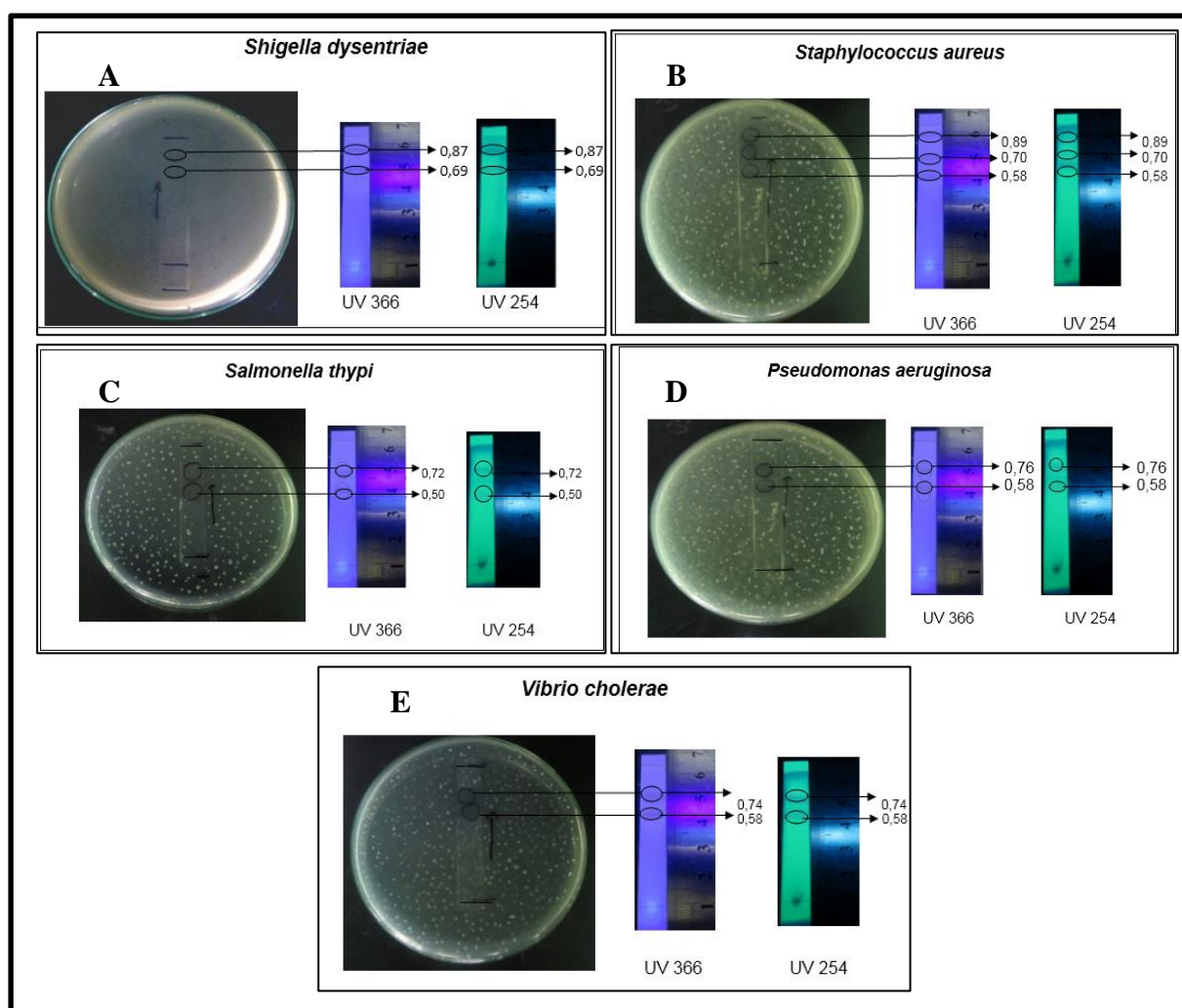


Gambar 1. Foto hasil uji KLT-Bioautografi ekstrak fermentat supernatan Isolat IJAM 2 jamur endofit pada akar mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume). Gambar 1A. *Shigella dysenteriae*. Gambar 1B. *Staphylococcus aureus*. Gambar 1C. *Salmonella typhi*. Gambar 1D. *Pseudomonas aeruginosa*. Gambar 1E. *Vibrio cholerae*.

Aktivitas antibakteri ekstrak isolat fungi endofit dari akar mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume) secara KLT Bioautografi.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antibakteri fermentat miselia isolat jamur endofit akar mangrove IJAM 2.

No	Nilai Rf	Warna pada penampak bercak		Kode bakteri Uji aktif
		UV 254 nm		
1	0,90 0,74 0,85	Biru		<i>S. dysenteriae</i>
2	0,72 0,61	Biru		<i>S. aureus</i>
3	0,72 0,54	Biru		<i>S. typhi</i>
4	0,70 0,60	Biru		<i>P. aeruginosa</i>
5	0,72 0,61	Biru		<i>V. Cholerae</i>



Gambar 2. Foto hasil uji KLT-Bioautografi ekstrak fermentat miselia Isolat IJAM 2 jamur endofit pada akar mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume). Gambar **2A.** *Shigella dysenteriae*. Gambar **2B.** *Staphylococcus aureus*. Gambar **2C.** *Salmonella typhi*. Gambar **2D.** *Pseudomonas aeruginosa*. Gambar **2E.** *Vibrio cholerae*.

PEMBAHASAN

Penelitian ini sampel yang digunakan adalah jamur endofit dari akar tumbuhan mangrove yang telah di determinasi di Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia, Fakultas Farmasi UMI Makassar dengan hasil determinasi tumbuhan akar mangrove berjenis *Rhizophora apicuata* Blume.

Sampel akar mangrove (*Rhizophora apicuata* Blume) didesinfeksi menggunakan etanol 70%. Alasan di gunakan etanol 70% karena etanol lebih efektif pada konsentrasi 70% daripada konsentrasi yang lebih tinggi, molekul air harus ada agar etanol dapat bekerja karena cara kerjanya dengan mengkoagulasi protein, itulah pentingnya air untuk koagulasi. Oleh sebab itu campuran etanol 70% dapat menembus lebih dalam untuk desinfeksi karena memiliki 30% kandungan air.⁹

Isolasi fungi endofit pada akar mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume) dengan menggunakan medium *Potato Dextrosa Agar Chloramfenikol* (PDAC), dimana PDA (*Potato Dextrosa Agar*) memiliki sumber karbohidrat, dan dextrosa sebagai sumber karbon untuk menunjang pertumbuhan jamur endofit. Adapun tujuan ditambahkan *Chloramfenikol* ini agar mencegah pertumbuhan dari

bakteri pada medium sehingga hanya didapatkan jamur yang akan tumbuh.¹⁰

Isolat yang diperoleh selanjutnya dilakukan pemurnian yang bertujuan untuk mendapatkan kultur murni dari masing masing isolat, pemurnian ini menggunakan metode tusuk dengan cara ujung ose yang di ujungnya terdapat isolat, sampai ditemukan kultur murni. Kultur murni adalah kultur yang terdiri dari sel yang sama bentuk dan ukurannya.¹¹

Pengujian makroskopik adalah pengujian yang dilakukan dengan tujuan untuk melihat bentuk morfologi dari masing-masing isolat jamur endofit mulai dari warna, permukaan koloni, bentuk, tepi dan elevasinya. Dari hasil pengamatan yang dilakukan setiap isolat ada yang memiliki karakteristik yang berbeda dan ada yang memiliki karakteristik yang sama. Setelah pengujian makroskopik dari 11 isolat diperoleh 6 isolat yang akan di lanjutkan ke penelitian selanjutnya karena memiliki karakteristik jamur yang sama.

Isolat yang diperoleh dilakukan pengujian skrining terhadap *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella*

Aktivitas antibakteri ekstrak isolat fungi endofit dari akar mangrove (Rhizophora apiculata Blume) secara KLT Bioautografi.

dysenteriae, Streptococcus mutans, Salmonella typhi, Vibrio cholerae.

Berdasarkan hasil pengujian skrining isolat fungi endofit dari akar tumbuhan mangrove terhadap bakteri uji diperoleh isolat fungi endofit dengan kode IJAM 2 memberikan aktivitas tertinggi terhadap 5 bakteri uji yaitu *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* yang dibandingkan dengan klasifikasi respon hambat pertumbuhan bakteri jika diameter zona bening > 20 mm = kuat, 16-20 mm = sedang, 10-15 mm = lemah, dan < 10 mm = tidak ada.¹²

Isolat murni dengan kode IJAM 2 kemudian dilanjutkan dengan proses fermentasi dalam medium *Potato Dekstrose Broth (PDB)*, selama 21 minggu, sambil dishaker dengan kecepatan 200 rpm, dimana pada kecepatan ini diharapkan proses fermentasi jampurnya dapat mencapai fase stationer dan menghasilkan metabolit sekunder.¹³

Hasil fermentasi kemudian di ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat dengan metode ekstraksi cair-cair pada supernatan dan diperoleh ekstrak supernatan, tujuan pemilihan metode tersebut karena supernatan

bersifat cair dan senyawa kimia yang akan ditarik pada supernatan berada pada larutannya. Sedangkan miselia di ekstraksi menggunakan metode maserasi dan diperoleh ekstrak miselia. Hasil fermentasi kemudian di lanjutkan untuk pengujian aktivitas antibakteri terhadap beberapa mikroba uji yang bertujuan untuk melihat isolat IJAM 2 yang memiliki potensi sebagai antibakteri. Isolat IJAM2 dilarutkan menggunakan pelarut etanol dikarena etanol merupakan salah satu pelarut semi polar yang dapat menarik senyawa nonpolar hingga polar.⁸

Hasil identifikasi dengan profil KLT dengan menggunakan fase gerak n-butanol : asam asetat : air (8 : 1 : 2) hal ini dikarenakan masing-masing pelarut memiliki kepolaran yang berbeda dapat terpisahkan dengan eluen tersebut dan diperoleh bercak dan zona hambat dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Hasil pengujian secara KLT-Bioautografi untuk fermentat supernatan diperoleh nilai Rf 0,89 dan 0,72 aktif terhadap bakteri *Shigella dysentriae*, nilai Rf 0,90 : 0,72 dan 0,60 aktif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, nilai Rf 0,91 : 0,70 dan 0,61 aktif terhadap bakteri *Salmonella typhi*, nilai Rf 0,70 dan 0,58 aktif terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, nilai Rf

Aktivitas antibakteri ekstrak isolat fungi endofit dari akar mangrove (Rhizophora apiculata Blume) secara KLT Bioautografi.

0,74 dan 0,61 aktif terhadap bakteri *Vibrio cholerae* dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 1.

Sedangkan hasil pengujian secara KLT-Bioautografi untuk fermentat miselia diperoleh nilai Rf 0,90 dan 0,74 aktif terhadap bakteri uji *Shigella dysenteriae*, nilai Rf 0,85 : 0,72 dan 0,61 aktif terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus*, nilai Rf 0,72 dan 0,54 aktif terhadap bakteri uji *Salmonella typhi*, nilai Rf 0,70 dan 0,60 aktif terhadap bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa*, nilai Rf 0,72 dan 0,61 aktif terhadap bakteri *Vibrio cholerae* s(dapat dilihat pada gambar 13, 14, 15, 16, 17, dan 18) dapat dilihat pada tabel 2 dan gambar 2. Ini membuktikan bahwa isolat fungi endofit dari akar mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume) berpotensi sebagai antibakteri.

KESIMPULAN

Bakteri uji yang dihambat dari fermentat isolat fungi endofit pada akar mangrove (*Rhizophora apiculata* Blume) IJAM 2 adalah *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Vibrio cholera*. Profil kromatogram aktivitas antibakteri ekstrak fermentat isolat fungi endofit akar mangrove secara KLT-Bioautografi di peroleh bioautografi dengan bercak aktif ekstrak fermentat

supernatan dan ekstrak fermentat miselia aktif memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

1. Strobel GA, Daisy B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2003;67:491-502.
2. Prihatiningtias WM dan Sri W. Aktivitas Antibakteri Fungi Endofit dari *Thievalia polygonoperda*, Isolat dari Tumbuhan Akar Kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers). *Majalah Obat Tradisional* 2011;16.
3. Ananda K and Sridhar KR. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on west coast of India. *Can J Of Microb* 2002;48: 871-878.
4. Dwilestari. Uji Antibakteri Jamur Endofit Pada Daun Mangrove (*Sonneratia alba*) Terhadap Bakteri Uji *Staphylococcus aureus* Dan *Escherichia coli* (Skripsi). Manado : Jurusan Kedokteran Universitas Sam Ratulangi, 2015.
5. Pratiwi ST. *Mikrobiologi Farmasi*. Yogyakarta: Penerbit Erlangga, 2008.
6. Rante H, Taebe B, dan Intan S. Isolasi Fungi Endofit Penghasil Senyawa Antimikroba Dari Daun Cabai Katokkon (*Capsicum Annuum* L Var. *Chinensis*) Dan Profil KLT Bioautografi. *Majalah Farmasi dan Farmakologi* 2013; 17(2):39-45.
7. Kjer JA, Debbab HA, Aly, and Proksch., *Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi*

- and their bioactive secondary products. Nature Publishing Group 2010.
8. Mustary M, Djide MN, Mahmud I, Hasyim N. Uji Daya Hambat dan Analisis KLT-Bioautografi Perasan Buah Sawo Manila (*Achras Zapota* Linn) Terhadap Bakteri Uji *Salmonella Thyposa*. Jurnal MKMI 2011;17(1): 25-27.
 9. Mozer H. Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak etanol 96% Kulit Batang Kayu Jawa (*Lanea coromandelica*) Terhadap *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, dan *Trichophyton rubrum*. Jakarta: Fakultas kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Fakultas Farmasi, 2015.
 10. Pelczar MJ, dan Chan. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Jakarta: UI Press., 2010.
 11. Winarni D. Diktat Teknik Fermentasi. Surabaya: Program Studi D3 Teknik Kimia FTI-ITS, 1997.
 12. Greenwood. Antibiotics Susceptibility (sensitivity) Test, Antimicrobial And Chemotherapy. USA : Mc Graw Hill Company, 1995.
 13. Salle AJ. Fundamental Principle of Bacteriologi 5th Edition. New York: MC Graw Hill Book Company Inc., 1961.