

ISOLASI FUNGI ENDOFIT PENGHASIL ANTIBIOTIKA PADA ALGA MERAH JENIS *Gracilaria verrucosa* SECARA KLT-BIOAUTOGRAFI

Herwin

Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia, Makassar
Email : herwinfarmasi@gmail.com

ABSTRACT

This research aimed to determine the antibacterial fungi endofitic isolate of Gracilaria verrucosa type Rhodophyta that antibiotic as potential by Bioautography-TLC Method. The result of fungi endofitic isolate, obtained that 7 active isolates and purified by quadrant method on potato dextrose agar medium obtained 5 active isolates (isolate 1, 2, 3, 5, 6). The result of the screening of fungi endofitic isolate by cakram method possessed that the biggest inhibitory zone is isolate 2 and isolate 6 by 25 mm at Streptococcus mutans. The test results of fungi endofitic isolate activity by Bioautography-TLC obtained Rf 0.07 0.23, 0.56, 0.78, 0.81 and 0.94 value actif inhibited Bacillus subtilis, Shigella disentry, Streptococcus mutans and Eschericia coli. And the identification results of the chemical component shown that the actif compound at isolate 2 and isolate 6 given result positif alkaloid.

Key words : Ethanol extract of stem *Phytocrene macrophylla* Blume, agar diffusion, antibacterial.

PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotika di dunia lebih dari 40.000 ton/tahun dalam industri pangan, pakan, pertanian, kesehatan, biokimia, genetika, dan biologi molekuler serta ada kecenderungan untuk terus meningkat dan dapat menimbulkan resistensi terhadap mikroba target.¹ Oleh karena itu, langkah-langkah mendapatkan jenis antibiotika baru masih sangat diperlukan baik lewat sintesis kimia,

biokimia baru atau penemuan isolat mikrobia baru.²

Dalam dua dekade terakhir ini, fungi endofit merupakan salah satu sumber utama mikroba penghasil antibiotika baru.³ Mikroba endofit adalah organisme hidup yang berukuran mikroskopis (bakteri dan jamur) yang hidup di dalam jaringan tanaman (*xylem* dan *phloem*), daun, akar, buah, dan batang. Mikroba endofit yang terdiri atas bakteri dan

jamur merupakan mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman dan membentuk koloni tanpa membahayakan inangnya. Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya yang merupakan peluang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya.⁴

Salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber antibiotika adalah alga merah jenis *Gracilaria verrucosa*. Banyak jenis alga yang berpotensi untuk diteliti dan dikembangkan pemanfaatannya sebagai sumber obat. Alga memiliki kandungan metabolit primer dan sekunder. Kandungan metabolit sekunder dari alga berpotensi sebagai penghasil metabolit bioaktif yang beragam dengan aktivitas yang sangat luas sebagai antibakteri, antivirus, anti jamur dan sitotastik.⁵

Alga merupakan salah satu bahan alami yang tidak menimbulkan resistensi untuk mengatasi penyakit pada makhluk hidup karena memiliki metabolit sekunder yang dapat menghambat/membunuh pertumbuhan bakteri, sehingga dilakukan penelitian isolasi fungi

endofit penghasil antibiotika pada Alga Merah jenis *Gracilaria verrucosa* asal Belopa secara KLT-bioautografi.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf, cawan petri, chamber, enkas, inkubator (Memmert®), LAF (*Laminar Air Flow*), lampu UV 254 nm dan 366 nm, oven (Fisher®). Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri uji (*Escherichia coli*, *Basillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, dan *Shigella disentry*), etil asetat, isolat fungi endofit Alga Merah jenis *Gracilaria verrucosa*, lempeng KLT, medium Nutrient Agar (NA), medium Potato Dextrosa Agar (PDA), medium Potato Dextrosa Agar chloramphenicol (PDAC), medium Maltosa Yeast Broth (MYB), n-heksan dan pereaksi golongan (Dragendrof-HCl, bauchardat, Sitroboraks dan FeCl₃).

Prosedur Penelitian

Isolasi Fungi Endofit Dari Alga Merah Jenis *Gracilaria verrucosa*

Alga Merah jenis *Gracilaria verrucosa* yang telah disortasi basah disterilisasi permukaan menggunakan etanol 70% selama 2-5 menit, selanjutnya dibilas dengan aquadest steril ± 1 menit diulang 2-3 kali lalu dikeringkan. Pengerjaan dilakukan

Isolasi fungi endofit penghasil antibiotika pada alga merah jenis Gracilaria verrucosa secara KLT-Bioautografi

secara aseptis di dalam Laminar Air Flow (LAF). Potongan kecil *Gracilaria verrucosa* diletakkan diatas medium PDAC (PDA+Cloramphenicol) di dalam cawan petri steril yang kemudian diinkubasi di dalam inkubator pada suhu kamar (25°C - 30°C) selama 3 hari. Diisolasi dan dimurnikan pada media PDAC baru untuk mendapatkan biakan murni.⁴

Pemurnian Isolat Fungi Endofit

Setiap isolat yang berbeda dimurnikan dengan metode *quadrant streak*, kemudian diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 25°C - 30°C selama 3 hari untuk memperoleh isolat tunggal. Isolat murni yang diperoleh diinokulasi pada agar miring sebagai stok.⁶

Pemeriksaan Makroskopik Isolat Fungi Endofit

Setiap isolat diambil 1 ose diinokulasi kedalam medium PDAC, kemudian diinkubasi selama 3 hari pada suhu 25°C, lalu dilakukan pengamatan terhadap bentuk, tepi, elevasi dan warna koloni pada medium PDAC.

Uji Skrining Aktivitas Antibakteri Fungi Endofit

Pengujian isolat fungi endofit dilakukan secara dilusi padat. Semua isolat fungi alga ditumbuhkan kedalam medium PDAC, kemudian cakram

fungi alga yang berumur 3 hari inkubasi pada medium PDAC ditempatkan di dalam cawan petri pada permukaan medium Nutrien Agar yang telah bercampur dengan mikroba uji. Selanjutnya di inkubasi selama 1 hari pada suhu 37°C.⁴

Fermentasi isolat

Diambil isolat aktif menggunakan ose dimasukkan ke dalam gelas erlenmeyer yang berisi 250 mL medium MYB, selanjutnya dilakukan fermentasi menggunakan *rotary shaker* dengan kecepatan 200 rpm pada suhu kamar selama 14 x 24 jam hingga diperoleh fermentat berupa supernatan dan miselia. Fermentat supernatan yang diperoleh diekstraksi dengan menggunakan pelarut etil asetat hingga diperoleh ekstrak etil asetat isolat supernatan.

Uji Aktivitas Antibiotika Secara KLT – Bioautografi

Lempeng kromatografi lapis tipis diaktifkan terlebih dahulu dengan pemanasan menggunakan oven pada suhu 100°C selama 30 menit. Ekstrak etil asetat isolat supernatan Alga Merah jenis *Gracilaria verrucosa* ditotolkan pada lempeng KLT berukuran 7 x 1 cm menggunakan pipa kapiler. Kemudian dielusi chamber menggunakan fase gerak n-heksan : etil asetat (1 : 5) kemudian

Isolasi fungi endofit penghasil antibiotika pada alga merah jenis Gracilaria verrucosa secara KLT-Bioautografi

kromatogram yang diperoleh dilakukan pengamatan bercak pada sinar UV 254 nm dan 366 nm. Kromatogram yang diperoleh dilakukan pengujian aktivitas antibiotika secara KLT-Bioautografi dengan cara sebanyak 10 mL medium NA dimasukkan kedalam cawan petri dan ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 20 μ L lalu dihomogenkan, lempeng kromatogram 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 1 x 24 jam pada suhu 37°C kemudian diamati bercak yang memberikan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri uji.⁷

Identifikasi komponen kimia

Golongan Alkaloid : Pereaksi Dragendrof-HCl dengan cara lempeng kromatogram disemprot. Tampak bercak berwarna jingga sampai coklat dan pereaksi Bauchardat dengan cara lempeng kromatogram disemprot dan

menghasilkan tampak bercak berwarna coklat.

Golongan Fenol : Besi (III) klorida dengan cara lempeng kromatogram disemprot dengan $FeCl_3$ sampai tampak bercak berwarna biru, biru kehitaman, hijau atau biru tua.

Golongan Flavanoid : Pereaksi Sitroborat dengan cara lempeng kromatogram disemprot dimana positif flavonoid jika terjadi perubahan warna flourosensi hijau kuning pada lempeng KLT yang divisualisasi pada lampu UV 366 nm.

Pengumpulan Data Dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dilakukan pengumpulan data berdasarkan hasil isolasi fungi endofit, skrining aktivitas antibiotika, pengujian aktivitas antibiotika secara KLT-Bioautografi dan identifikasi golongan komponen kimia aktif dianalisis berdasarkan aktifitas antibiotika isolat fungi endofit Alga Merah Jenis *Gracilaria verrucosa* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji.

HASIL PENELITIAN

Tabel 1. Hasil pemurnian isolat fungi endofit alga merah jenis *Gracilaria verrucosa* dengan metode kuadran

No.	Kode fungi endofit	Biakan fungi
1.	IFM 1	Biakan fungi ke-1
2.	IFM 2	Biakan fungi ke-2
3.	IFM 3	Biakan fungi ke-3
4.	IFM 4	Biakan fungi ke-4
5.	IFM 5	Biakan fungi ke-5
6.	IFM 6	Biakan fungi ke-6
7.	IFM 7	Biakan fungi ke-7

Keterangan :

IFM 1 : Isolat fungi endofit ke-1

IFM 2 : Isolat fungi endofit ke-2

IFM 3 : Isolat fungi endofit ke-3

IFM 4 : Isolat fungi endofit ke-4

IFM 5 : Isolat fungi endofit ke-5

IFM 6 : Isolat fungi endofit ke-6

IFM 7 : Isolat fungi endofit ke-7

Tabel 2. Hasil makroskopik isolat fungi endofit pada alga merah jenis *Gracilaria verrucosa*

Kode Bakteri	Warna	Bentuk	Tepi	Elevasi
IFM 1	Putih	Bulat	Utuh	Timbul Datar
IFM 2	Putih	Tidak Teratur	Utuh	Cembung
IFM 3	Putih	Tidak Teratur	Utuh	Timbul Datar
IFM 4	Putih	Bulat	Berbenang	Membukit
IFM 5	Putih	Tidak Teratur	Utuh	Serupa Kawah
IFM 6	Putih	Tidak Teratur	Utuh	Membukit
IFM 7	Putih	Tidak Teratur	Utuh	Cembung

Keterangan :

IFM 1 : Isolat fungi endofit ke-1

IFM 2 : Isolat fungi endofit ke-2

IFM 3 : Isolat fungi endofit ke-3

IFM 4 : Isolat fungi endofit ke-4

IFM 5 : Isolat fungi endofit ke-5

IFM 6 : Isolat fungi endofit ke-6

IFM 7 : Isolat fungi endofit ke-7

Tabel 3. Hasil uji skrining aktivitas isolat fungi endofit dari alga merah jenis *Gracilaria verrucosa* terhadap beberapa bakteri uji.

NO	Isolat Fungi Endofit	Replikasi	Diameter Zona Hambatan (mm)			
			SD	SM	BS	EC
1	IFM 1	1	22	25	22	17
		2	23	24	23	21
		3	22	24	23	18
		Rata-rata	22	24	22	18
2	IFM 2	1	24	27	28	18
		2	25	25	26	18
		3	24	25	23	20
		Rata-rata	24	25	25	18
3	IFM 3	1	22	25	24	22
		2	24	22	24	21
		3	26	23	23	21
		Rata-rata	24	23	23	21

Isolasi fungi endofit penghasil antibiotika pada alga merah jenis *Gracilaria verrucosa* secara KLT-Bioautografi

4	IFM 4	1	7	12	0	0
		2	7	12	0	0
		3	7	11	0	0
		Rata-rata	7	11	0	0
5	IFM 5	1	23	24	23	24
		2	23	24	23	23
		3	23	24	23	24
		Rata-rata	23	24	23	23
6	IFM 6	1	24	25	22	22
		2	24	26	23	22
		3	24	25	22	21
		Rata-rata	24	25	22	21
7	IFM 7	1	10	13	10	10
		2	10	14	11	10
		3	10	14	10	10
		Rata-rata	10	13	10	10

Keterangan :

IFM 1 : Isolat Fungi Endofit ke-1	IFM 2 : Isolat Fungi Endofit ke-2
IFM 3 : Isolat Fungi Endofit ke-3	IFM 4 : Isolat Fungi Endofit ke-4
IFM 5 : Isolat Fungi Endofit ke-5	IFM 6 : Isolat Fungi Endofit ke-6
IFM 7 : Isolat Fungi Endofit ke-7	SD : <i>Shigella dysenteriae</i>
SM : <i>Streptococcus mutans</i>	BS : <i>Bacillus subtilis</i>
EC : <i>Eschericia coli</i>	

Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Antibotika Fertmentat Isolat Fungi Endofit IFM 2 dan IFM 5 dari Alga Merah jenis *Gracilaria Verrucosa* terhadap beberapa mikroba uji.

No	NilaiRf	Warna pada penampak bercak		Kode bakteri Uji aktif
		UV 254 nm	UV 366 nm	
1	0,23	Biru	Biru Berpendar	SM
	0,78			
	0,94			
2	0,07	Biru	Biru Berpendar	BS
	0,81			
3	0,05	Biru	Biru Berpendar	EC
	0,81			
4	0,56	Biru	Biru Berpendar	SD
	0,81			

Keterangan :

SM : *Streptococcus mutans*, BS : *Bacillus subtilis*, EC : *Eschericia coli*, SD : *Shigella dysenteriae*

Tabel 5. Hasil Identifikasi komponen kimia Isolat Fungi Endofit IFM 2 dan IFM 5 dari Alga Merah jenis *Gracilaria Verrucosa*

No.	Warna	Pereaksi
1.	Kuning	Dragendrof (-)
2.	Coklat	Bauchardard (+)
3.	Coklat	FeCl ₃ (-)
4.	Coklat	Sitroborat (+)

Keterangan : (+) : Mengandung Senyawa Kimia Aktif Alkaloid
 (-) : Tidak mengandung senyawa kimia aktif

PEMBAHASAN

Alga merupakan Salah satu tumbuhan laut yang sering digunakan untuk bahan pangan, bahan kosmetik dan pengobatan tradisional oleh masyarakat Indonesia, yang telah diteliti sebagai sumber antibiotika, dari hasil penelitian sebelumnya ekstrak dari alga mampu membunuh beberapa bakteri. Dalam upaya untuk memperoleh senyawa antibiotika baru maka pada penelitian ini, dilakukan penelusuran komponen kimia aktif antibiotika dari fungi endofit pada Alga Merah jenis *Gracilaria verrucosa* asal Belopa secara KLT-Bioautografi.

Penelitian ini mengisolasi fungi endofit yang memiliki aktivitas sebagai antibiotika dari Alga merah jenis *Gracilaria verrucosa* sebagai sumber penghasil antibiotika. Alga ini telah diketahui dari berbagai macam penelitian memiliki beberapa macam aktivitas, selain sebagai antioksidan Alga Merah jenis *Gracilaria verrucosa* juga memiliki potensi sebagai antiinflamasi. Fungi endofit merupakan fungi yang tumbuh dan bersimbiosis dalam jaringan tumbuhan. Fungi endofit ini diduga bersimbiosis dan bermutasi dalam jaringan tumbuhan dalam hal ini Alga Merah jenis *Gracilaria verrucosa*. Hasil isolasi fungi endofit diperoleh 7 isolat yang diduga

berpotensi sebagai antibiotika. Isolat yang diperoleh dilakukan pemurnian dengan metode kuadran yang diberi kode IFM 1 untuk biakan fungi ke-1, IFM 2 untuk biakan fungi ke-2, IFM 3 untuk biakan fungi ke-3, IFM 4 untuk biakan fungi ke-4, IFM 5 untuk biakan fungi ke-5, IFM 6 untuk biakan fungi ke-6, dan IFM 7 untuk biakan fungi ke-7, isolat yang diperoleh diinokulasikan ke medium PDAC miring sebagai stok.

Hasil skrining aktivitas antibiotika menunjukkan bahwa isolat fungi endofit IFM 1, IFM 2, IFM 3, IFM 5, IFM 6, dan IFM 7 memberikan aktivitas terhadap *Shyggella dysenteriae*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, dan *Escherichia coli*. Sedangkan isolat fungi endofit IFM 4 tidak memberikan aktivitas terhadap *Bacillus subtilis*, dan *Escherichia coli*. Dari hasil skrining tersebut menunjukkan isolat fungi endofit IFM 2 dan IF 6 memberikan aktivitas yang paling baik terhadap beberapa bakteri uji Gram positif yaitu *Streptococcus mutans* dengan diameter zona hambatan sebesar 25 mm.

Isolat murni dengan kode IFM 2 dan IFM 6 difermentasi dalam medium Maltosa Yeast Broth (MYB) selama 14 x 24 jam, sambil dishaker dengan kecepatan 200 rpm agar selama proses fermentasi fungi endofit ini akan

Isolasi fungi endofit penghasil antibiotika pada alga merah jenis Gracilaria verrucosa secara KLT-Bioautografi

mencapai fase stationer dan menghasilkan metabolit sekunder diperoleh fermentat supernatan dan miselia. Fermentat supernatan IFM 2 dan IFM 6 diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat hingga diperoleh ekstrak etil asetat isolat supernatan IFM 2 dan IFM 6 alga merah jenis *Gracilaria verrucosa*. Ekstrak isolat supernatan IFM 2 dan IFM 6 dilakukan pengujian aktivitas antibiotika secara KLT-Bioautografi menggunakan fase gerak n-heksan : Etil Asetat (1:5). Hasil pengujian secara KLT-Bioautografi diperoleh nilai Rf 0,07 ; dan 0,81 aktif terhadap *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*, nilai Rf 0,56 ; dan 0,81 aktif terhadap *Shigella dysenteriae*, dan nilai Rf 0,23 ; 0,78 ; dan 0,94 aktif terhadap *Streptococcus mutans*, ini membuktikan bahwa isolat fungi endofit pada Alga Merah jenis *Gracilaria verrucosa* berpotensi sebagai penghasil antibiotika.

Hasil identifikasi komponen kimia aktif isolat fungi endofit IFM 2 dan IFM 6 dilakukan penyemprotan menggunakan pereaksi spesifik yaitu untuk mengidentifikasi adanya senyawa Alkaloid menggunakan pereaksi golongan dragendrof dan bauchardard, identifikasi senyawa fenol menggunakan pereaksi golongan FeCl₃, dan identifikasi senyawa

flavonoid menggunakan pereaksi golongan sitroborat. Hasil penyemprotan pereaksi golongan pada isolat IFM 2 diperoleh bercak warna biru pada penyemprotan dragendrof, bercak berwarna coklat pada penyemprotan bauchardard, tidak memiliki perubahan warna pada penyemprotan FeCl₃, dan flavonoid tidak terjadi perubahan warna fluoresensi pada penyemprotan sitroborat yang divisualisasi pada lampu UV 366 nm, dan isolat IFM 6 diperoleh bercak warna biru pada penyemprotan dragendrof, bercak berwarna coklat pada penyemprotan bauchardard, tidak memiliki perubahan warna pada penyemprotan FeCl₃, dan untuk flavonoid tidak terjadi perubahan warna fluoresensi pada penyemprotan sitroborat yang divisualisasi pada lampu UV 366 nm. Dari hasil penyemprotan maka diketahui isolat IFM 2 dan isolat IFM 6 positif memiliki senyawa alkaloid ditandai dengan adanya bercak berwarna coklat pada penyemprotan pereaksi bauchardard.

KESIMPULAN

Isolat fungi endofit IFM 2 dan IFM 6 merupakan isolat dengan diameter terbesar menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* sebesar 25 mm dan secara KLT-Bioautografi dengan nilai Rf 0,07 dan 0,81 aktif

terhadap *Bacillus subtilis* dan *Eschericia coli*, nilai Rf 0,56 ; dan 0,81 aktif terhadap *Shigella dysentriae*, dan nilai Rf 0,23 ; 0,78 ; dan 0,94 aktif terhadap *Streptococcus mutans*. Isolat IFM 2 dan IFM 6 positif memiliki golongan senyawa alkaloid ditandai dengan adanya bercak berwarna coklat pada penyemprotan pereaksi bauchardard.

DAFTAR PUSTAKA

1. Neu CH. The crisis in antibiotic resistance. *Science*.1992;257:1064-1073.
2. Tschertter H, Dreyfuss. New Metabolites, Processes for Their Production and Uses. International Application Published Under The Patent Cooperation Treaty (PCT). International Publication.1992;38:28-45.
3. Kauffman CA, Carver PL. Antifungal agents in the 1990s. Current status and future developments (Review). *Drugs*. 1997;53:539-549.
4. Rante, et al. Isolasi fungi endofit penghasil senyawa antimikroba dari daun katakokkon (*Capsicum annuum L var.chinensis*) dan profil KLT-Biauotografi. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*.2013;17(2):39-46.
5. Rante, et al. Isolasi fungi endofit penghasil antibiotika dari *Kappaphycus alvarezzi* Doty asal Kabupaten Takalar. Makassar : Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, 2010.
6. Alwiyah T. Isolasi fungi endofit sebagai penghasil antibiotika dari rimpang tanaman kunyit kuning (*Curcuma Domestica* Linn.) dan kunyit putih (*Kaempferia rotunda* Linn.) (Skripsi). Makassar: Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Indonesia, 2012.
7. Djide MN. Analisis Mikrobiologi Farmasi. Makassar : Fakultas MIPA. Universitas Hasanuddin, 2005.