

PROFIL BIOAUTOGRAM EKSTRAK FERMENTAT ISOLAT FUNGI ENDOFIT DARI DAUN GALING-GALING (*Cayratia trifolia* L) SEBAGAI ANTIBAKTERI

Fitriana¹, As Adi Abdullah², Annisa Almagfirah Achmar¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Indonesia, Makassar

²FMIPA, Jurusan Biologi, Universitas Hasanuddin, Makassar

Email : fitriana.fitriana@umi.ac.id

ABSTRACT

The research bioautogram profile of fermentate extract endophytic fungi from galing-galing (*Cayratia trifolia* L) leaf as an antibacterial has been to find the activity of the extract fermentate endophytic fungi isolates against bacterial test using TLC Bioautography. This research begins with the isolation of leaves galing-galing using Potato Dextrose Agar Chloramfenicol (PDAC) media, isolates do purification and macroscopic test. Subsequently isolates were followed by screening endophytic fungi isolates against test bacteria. Isolates that give the most excellent activity followed by fermentation with Maltose Yeast Broth (MYB) media using a shaker speed of 200 rpm at room temperature for 21 days. After the fermented liquid is separated to obtain fermentate and mycelia. The fermented liquid was then extracted using a liquid-liquid extraction method using ethyl acetate solvents after which it was evaporated with a rotary evaporator until a thick extract was obtained. Extracts obtained followed by TLC Bioautography method using ethyl acetate : n-hexane (4: 1) eluent. Endophytic fungi were obtained as many as 6 isolates and the best activity was endophytic fungi with IDGG-03 code against test bacteria. The results from the TLC Bioautography profile 2 Bioautography provide active spot with Rf values of 0.09 and 0.54 against the bacteria *B. subtilis*, *V. cholerae* and *P. aeruginosa*.

Key words: *Cayratia trifolia* L, endophytic fungi, TLC Bioautography.

PENDAHULUAN

Pemanfaatan tumbuhan liar di sekitar kita perlu dilakukan untuk memperluas peluang tumbuhan liar dijadikan sebagai pengobatan tradisional. Tumbuhan yang digunakan untuk pengobatan tradisional mengandung berbagai macam zat yang bisa digunakan untuk mengobati penyakit kronis dan menular. Tanaman dengan prinsip bioaktif kuat dianggap sebagai komponen tumbuhan obat. Konstituen alami berbasis tanaman berasal dari bagian tanaman seperti daun, kulit kayu, akar, buah, biji, dan lain-lain.¹

Pada tumbuhan banyak terdapat fungi endofit, berbagai jenis tumbuhan terutama tanaman obat, sehingga dapat digunakan sebagai sumber isolat fungi endofit. Menurut Hasriani (2015)² fungi endofit adalah kelompok jamur yang sebagian atau seluruh hidupnya

berada dalam jaringan tumbuhan hidup dan biasanya tidak merugikan inangnya. Fungi endofit umumnya memproduksi metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologis yang bermanfaat seperti misalnya senyawa-senyawa antikanker, antivirus, atau antibakteri.

Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya tersebut.³ Salah satu tumbuhan yang dapat digunakan sebagai sumber isolat fungi endofit adalah daun galing-galing *Cayratia trifolia* L.

Berdasarkan kemampuan mikroba endofit memproduksi metabolit sekunder,

Profil bioautogram ekstrak fermentat isolat fungi endofit dari daun galing-galing (*Cayratia trifolia* L) sebagai antibakteri

maka metabolit sekunder dari daun galing-galing yang berfungsi sebagai antibakteri tersebut dapat dihasilkan. Dari hasil uraian diatas maka perlu dilakukan penelitian untuk melihat aktivitas isolat fungi endofit terhadap bakteri uji dengan menggunakan metode KLT-Bioautografi.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang dipakai yaitu autoklaf (SMIC Model YX-280 B), cawan petri (Normax), gelas Erlenmeyer (Iwaki Pyrex), gelas kimia 250 dan 500 ml (Iwaki Pyrex), inkubator (Memert), Laminar Air Flow (LAF), lampu UV 254 nm dan 366 nm, lempeng KLT G60 F254 (E.Merck), oven (Memert), pipa kapiler, shaker, timbangan analitik (Chyo), vial dan jarum ose. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini daun galing-galing (*Cayratia trifolia* L.), aquadest, bakteri uji (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus mutans*, *Vibrio cholerae*), kloramfenikol, medium *Nutrient Agar* (NA), medium *Potato Dextrose Agar* (PDA), medium *Maltosa Yeast Broth* (MYB).

Prosedur Penelitian

Pengambilan dan Penyiapan Sampel

Sampel penelitian yang digunakan berupa Daun Galing-galing (*Cayratia trifolia* L.) diperoleh di daerah Makassar, Sulawesi Selatan. Daun Galing-galing (*Cayratia trifolia* L.) diambil dan dicuci hingga bersih. Daun Galing-galing (*Cayratia trifolia* L.) yang telah dicuci terlebih dahulu dengan air mengalir kemudian direndam kurang lebih 1 menit dengan menggunakan etanol 70%, dibilas

dengan menggunakan aquadest steril, kemudian sampel dipotong-potong.

Isolasi, Pemurnian dan Makroskopik Fungi Endofit

Disiapkan medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang telah ditambahkan dengan kloramfenikol lalu dituangkan sebanyak 10 mL ke dalam cawan petri, dan dibiarkan hingga medium memadat. Setelah memadat sampel daun yang telah dipotong-potong diletakkan di atas permukaan medium lalu diinkubasi selama 3 x 24 jam pada suhu ruang.⁴ Isolat fungi endofit yang tumbuh pada media PDA lalu dipindahkan ke media baru dengan cara diambil satu ose, diinokulasikan ke dalam medium *Potato Dextrose Agar* (PDA). Diinkubasi pada suhu ruangan selama 3 x 24 jam. Kemudian diamati secara makroskopis.⁵

Uji skrining isolat fungi

Isolat fungi endofit diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi medium *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 10 mL yang masing-masing telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri uji yaitu *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Vibrio cholerae*, sebanyak 0,2 mL (20 µL) dimana isolat tersebut diletakkan di atas permukaan medium. Kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C lalu diamati zona hambat yang terbentuk.⁶

Fermentasi dan Ekstraksi isolat aktif

Isolat aktif kemudian diinokulasi dengan menggunakan ose dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 250 mL medium cair *Maltosa Yeast Broth* (MYB), selanjutnya dilakukan fermentasi menggunakan *Rotary shaker* dengan kecepatan 200 rpm pada suhu ruang selama 21 hari.⁷ Hasil dari fermentasi diperoleh supernatan dan miselia yang disaring

Profil bioautogram ekstrak fermentat isolat fungi endofit dari daun galing-galing (Cayratia trifolia L) sebagai antibakteri

menggunakan kertas saring kemudian diambil supernatannya dan diekstraksi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat kemudian diuapkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak kental.⁵

Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak kental fermentat isolat fungi diidentifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan menggunakan eluen n-heksan : etil asetat perbandingan 1 : 4. Ekstrak ditotolkan pada lempeng KLT dengan menggunakan pipa kapiler. Kromatogram yang dihasilkan diamati di bawah Lampu UV

pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm diberi tanda dan dihitung nilai Rf-nya.⁹

Pengujian secara KLT-Bioautografi

Cawan petri yang berisi medium *Nutrient Agar* (NA) yang telah diinokulasi dengan suspensi bakteri dibiarkan memadat,. Lempeng KLT yang telah dielusui diletakkan diatas permukaan media agar dan dibiarkan selama 30 menit kemudian lempeng tersebut diangkat dan dipindahkan. Medium yang telah ditemplei lempeng KLT diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam, diamati zona hambatan yang terbentuk .¹⁰

HASIL DAN PEMBAHASAN

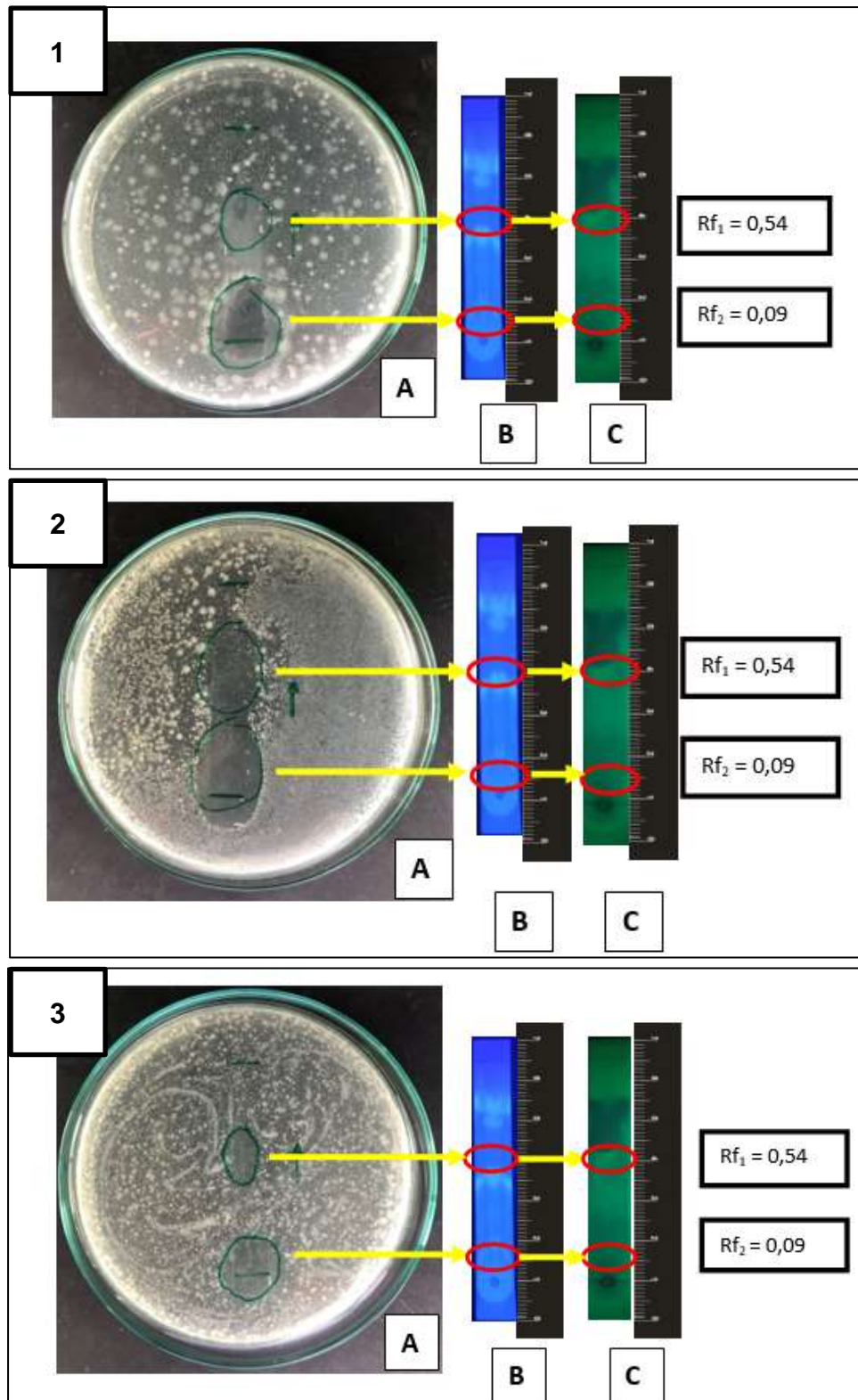
Tabel 1. Hasil Isolasi, Pemurnian Dan Makroskopik Isolat Fungi Endofit Pada Daun Galing-Galing (*Cayratia trifolia L.*)

No	Bentuk Koloni	Bentuk Tepi	Bentuk Elevasi	Warna	Permu kaan	Titik pusat	Lapisan Bening	Ukuran Koloni	Titik Embun	Latar Belakang
1.	Concentric (Konsentris)	Ciliate (Bersilia)	Umbonate (Seperti tombol)	Cokelat	Kapas	-	-	45,75 mm	-	Berlapis
2.	Round with scalloped margin (Bulat dengan tepian bergigi)	Undulate (Berombak)	Raised (Timbul)	Putih	Kapas	Ada	-	80,5 mm	-	1 lapis
3.	Round with scalloped margin (Bulat dengan tepian bergigi)	Thread-like (Berbentuk benang)	Raised (Timbul)	Putih	Kapas	Ada	-	80,50 mm	Ada	Berlapis
4.	Round (Bulat)	Ciliate (Bersilia)	Flat (Datar)	Jingga	Kapas	-	-	90 mm	-	1 lapis
5.	Round with radiating margin (Bulat dengan tepian menyebar)	Branching (Bercabang)	Umbonate (Seperti tombol)	Hitam	Kapas	-	-	67,25 mm	-	1 lapis
6.	L-Form (Bentuk L)	Ciliate (Bersilia)	Umbonate (Seperti tombol)	Hitam	Kapas	Ada	-	56,25 mm	Ada	Berlapis

Tabel 2. Hasil uji skrining isolat fungi endofit daun galing-galing (*Cayratia trifolia L.*) terhadap bakteri uji

Bakteri uji	Diameter Hambatan Isolat Fungi Endofit (mm)					
	IDGG-01	IDGG-02	IDGG-03	IDGG-04	IDGG-05	IDGG-06
<i>V.cholerae</i>	0,00	15,68	19, 13	0,00	0,00	14,27
<i>P.aeruginosa</i>	0,00	18,74	18,74	0,00	0,00	12,73
<i>B.subtilis</i>	0,00	17,26	20, 16	0,00	0,00	13,31

Profil bioautogram ekstrak fermentat isolat fungi endofit dari daun galing-galing (*Cayratia trifolia* L) sebagai antibakteri



Gambar 1. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat fermentat isolat fungi endofit kode IDGG-03 terhadap bakteri (1) *Vibrio cholerae*; (2) *Pseudomonas aeruginosa*; (3) *Bacillus subtilis*

Profil bioautogram ekstrak fermentat isolat fungi endofit dari daun galing-galing (*Cayratia trifolia* L) sebagai antibakteri

Daun galing-galing (*Cayratia trifolia* L.) merupakan tumbuhan yang liar yang menjadi gulma di pekarangan rumah tetapi memiliki banyak manfaat. Penelitian ini bertujuan untuk melihat aktivitas ekstrak fermentat isolat fungi endofit dari daun galing-galing (*Cayratia trifolia* L.) sebagai antibakteri dengan menggunakan KLT-Bioautografi.

Pada tahap pertama penelitian, dilakukan isolasi fungi endofit pada daun galing-galing (*Cayratia trifolia* L.). Hal ini bertujuan untuk menghilangkan mikroba yang berada pada permukaan sampel daun galing-galing (*Cayratia trifolia* L.) sehingga yang tumbuh adalah isolat fungi endofit yang berasal dari jaringan daun galing-galing (*Cayratia trifolia* L.). Medium yang digunakan adalah medium *Potato Dextrose Agar Cloramphenicol* (PDAC), dimana *Potato Dextrose Agar* memiliki sumber karbohidrat dan dextrosa sebagai sumber karbon untuk menunjang pertumbuhan fungi endofit. Adapun tujuan ditambahkan kloramfenikol untuk mencegah pertumbuhan bakteri dalam medium.

Hasil isolasi fungi endofit dan pemurnian dari daun galing-galing diperoleh 6 isolat fungi endofit yang memberikan daya hambat dan bentuk koloni yang berbeda. Isolat fungi endofit yang telah murni kemudian ditentukan karakteristiknya secara makroskopik dengan melihat bentuk morfologi isolat fungi endofit sehingga dapat diketahui perbedaan dan persamaan isolat yang diperoleh berupa bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni, warna dan struktur koloni dapat dilihat pada tabel 1.

Selanjutnya dilakukan uji skrining untuk melihat aktivitas antibakteri isolat fungi endofit terhadap bakteri uji (*Bacillus subtilis*,

Pseudomonas aeruginosa, dan *Vibrio cholerae*). Alasan penggunaan sembilan bakteri uji karena sudah mewakili bakteri gram positif dan negatif serta berdasarkan patogenezisnya. Hasil dari uji skrining dapat dilihat pada tabel 2, yang dibandingkan dengan literatur bahwa menurut Mulyani, 2013. Respon hambatan pertumbuhan bakteri dapat diklasifikasikan sebagai berikut diameter hambatan >20 mm dikategorikan sangat kuat, diameter hambatan 16-20 mm dikategorikan kuat, diameter hambatan 10-15 mm dikategorikan sedang dan diameter hambatan <10 mm dikategorikan lemah.¹¹

Untuk isolat fungi endofit kode IDGG-03 memberikan aktivitas yang paling baik terhadap bakteri *V. cholerae* dengan diameter hambatan 19,13 mm dan *P. aeruginosa* diameter hambatan 18,74 mm masuk dalam kategori kuat. Sedangkan untuk bakteri *B. subtilis* dengan diameter hambatan 20,16 mm masuk kategori sangat kuat. Hal inilah yang mendasari pemilihan isolat fungi endofit dengan kode IDGG-03 yang diteliti lebih lanjut potensinya sebagai antibakteri secara KLT-Bioautografi. Isolat fungi endofit dengan IDGG-03 dilanjutkan dengan proses fermentasi dengan menggunakan media cair Maltosa Yeast Broth (MYB) steril dalam labu Erlenmeyer. Fermentasi dilakukan secara dinamis menggunakan *shaker* selama tiga minggu pada suhu kamar dengan kecepatan 200 rpm, agar pada saat fermentasi dihasilkan pelet berukuran kecil dan padat.¹² Fermentasi dilakukan selama tiga minggu karena telah memasuki fase stationer dan telah menghasilkan metabolit sekunder. Fermentasi dilakukan pada suhu kamar karena produksi metabolit antimikroba akan meningkat pada peningkatan temperatur dari 20-25 °C.¹³

Profil bioautogram ekstrak fermentat isolat fungi endofit dari daun galing-galing (Cayratia trifolia L) sebagai antibakteri

Setelah fermentasi, kultur cair dan miselia dipisahkan, dilanjutkan dengan proses ekstraksi senyawa metabolit dengan tujuan untuk memecah sel sehingga senyawa metabolit berdifusi ke pelarut. Kultur cair diekstraksi dengan etil asetat menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Pelarut etil asetat digunakan karena memiliki sifat yang semi polar sehingga diharapkan metabolit yang diekstraksi bersifat semi polar. Metabolit yang dihasilkan oleh jamur dapat dikeluarkan ke media kultur cair. Ekstraksi cair-cair dilakukan terhadap media kultur cair untuk memperoleh metabolit ekstraseluler jamur.¹⁴ Ekstrak yang diperoleh kemudian dilanjutkan dengan pengujian KLT-Bioautografi.

Pengujian dilanjutkan identifikasi secara kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menggunakan eluen etil asetat : n-heksan (4:1). Profil kromatogram diperoleh 2 bercak yang aktif dengan nilai Rf 0,09 dan nilai Rf 0,54 terhadap bakteri *B. subtilis*, *V. cholerae* dan *P. aeuriginosa*.

Ekstrak fermentat dari isolat fungi endofit dari daun galing-galing (*Cayratia trifolia* L.) memiliki aktivitas antibakteri dengan menunjukkan diameter hambatan dari bercak aktif yang terhadap bakteri yang telah diujikan.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa diperoleh isolat fungi endofit sebanyak 6 isolat dan yang memberikan aktivitas yang paling baik adalah isolat dengan kode IDGG-03 terhadap bakteri uji. Untuk profil kromatogramnya diperoleh 2 bercak aktif dengan nilai Rf 0,09 dan 0,54 terhadap bakteri *B. subtilis*, *P. aureoginosa* dan *V. Cholerae*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sowmya S, Perumal PC, Anusooriya P, Vidya B, Pratibha P, Malarvizhi D,

Gopalakrishnan VK. Comparative preliminary phytochemical analysis various different parts (Stem, Leaf and Fruit) of *Cayratia trifolia* (L.). Indo American Journal of Pharmaceutical Research 2015;5(1):218-223.

2. Hasiani VV, Ahmad I, Rijai L. Isolasi jamur endofit dan produksi metabolit sekunder antioksidan dari daun pacar (*Lawsonia inermis* L.). Jurnal Sains dan Kesehatan 2015; 1(4):146-153.
3. Radji M. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. Majalah Ilmu Kefarmasian 2005; 2(3):113-126.
4. Sardiani N, Litaay M, Budjil RG, Priosambodo D, Syahribulan, Dwyana Z. Potensi Tunikata *Rhopalaea* sp sebagai Sumber Inokulum Bakteri Endosimbion Penghasil Antibakteri. Jurnal Alam Dan Lingkungan 2015;6(11).
5. Kjer J, Debbab A, Aly AH, Proksch P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. Nat Protoc. 2010; 5(3):479-90.
6. Pratiwi RE. Uji Aktivitas Antibakteri Fermentat Isolat Fungi pada Ampas Sagu asal Kota Palopo secara KLT-Bioautografi (Skripsi) . Makassar : Universitas Muslim Indonesia, 2016.
7. Istiqamah AN. Aktivitas antibakteri fermentat isolat fungi endofit pada daun kedondong (*Spondias dulcis*) terhadap bakteri *Burkholderia pseudomallei* secara KLT-Bioautografi (Skripsi). Makassar: Universitas Muslim Indonesia, 2015.
8. Sumathy H, Sangeetha J, Vijayalakshmi K. Chromatographic fingerprint analysis of *Ixoracoccinea* methalonic flower extract. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research 2011;43.
9. Mustary M, Natsir DM, Ilham M, Hasyim N. Uji daya hambat dan analisis klt-bioautografi perasan buah sawo manila (*Achras zapota* Linn.) terhadap bakteri uji *Salmonella thyposa* (Skripsi). Makassar: Universitas Hasanuddin, 2011.
10. Mulyani Y, Bachtiar E, Agung MUK. Peranan senyawa metabolit sekunder tumbuhan mangrove terhadap infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan

Profil bioautogram ekstrak fermentat isolat fungi endofit dari daun galing-galing (Cayratia trifolia L) sebagai antibakteri

- Mas (*Cyprinus carpio* L.). Jurnal Akuatik 2013;4(1):1-9.
11. Purwanto LA, Ibrahim D, Sudrajat H. Effect of agitation speed on morphological changes in *Aspergillus niger* hyphae during production of tannase. World Journal of Chemistry 2009;4(1): 34-38.
12. Jain P, Pundir RK. Effect of fermentation medium, pH and temperature variations on antibacterial soil fungal metabolite production. J Agr Sci Tech 2011; 7(2): 247-269.
13. Mawaddah R. Kajian Hasil Riset Potensi Antimikroba Alami dan Aplikasinya dalam Bahan Pangan. Bogor: Fakultas Teknologi, Institut Pertanian Bogor, 2008.
14. Oktaviary R. Isolasi dan skrining uji aktivitas antibakteri jamur dari lingkungan laut (Skripsi). Bandung: Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, 2014.