Senyawa Antibakteri *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dari Kapang Endofit Taman Nasional Gunung Halimun

Ruth Melliawati^{*)} dan Harni

Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Jl. Raya Bogor KM. 46 Cibinong

Diterima 13-03-2009

Disetujui 03-08-2009

ABSTRACT

Endophytic fungus is a microorganism which live in the interstitial spaces healthy tissues of the host plant, and has capability to produce secondary metabolite such as micotoxin, antibiotic and antiviral. This research was aimed to find out the isolates of endophytic fungus produce antibacterial compounds to inhibit *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, and to investigate the Retention time (Rt) of the antibacterial compounds produced by endophytic fungus with *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) methods. Diffusion Agar Plate Method was used to examine the antibacterial compounds on *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. While the antibacterial compounds were examined with *Thin Layer Chromatography* (TLC) and *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) methods, and the result were compared with Chloramphenicol and Ampicillin antibiotic standart. Two isolates of endophytic fungus namely HL.46F.211 and HL.57F.258 were inhibited the growth *Escherichia coli* ATCC 35218 and three isolates namely HL.48F.217, HL.53F.243 and HL.57F.258 showed antagonistic action against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The results of TLC and HPLC analysing method show that antibacterial compounds produced by endophytic fungus HL.46F.211 had Rt (*Retention Time*) rate similar with antibiotic Chloramphenicol at 2,796 (at water fraction) and Rt antibiotic Amphyccillin at 2,662 (at Chloroform fraction). While antibacterial compounds produced by endophytic fungus HL.57F.258 had Rt rate similar with antibiotic Amphyccillin at 2,650 (at Chloroform fraction).

Keywords: Endophytic fungus, Gunung Halimun National Park, selection, antibacterial, HPLC.

PENDAHULUAN

Alam tropis Indonesia menyimpan kekayaan alam yang begitu beraneka ragam, baik flora, maupun faunanya. Keanekaragaman mikrobiologisnya pun sangat melimpah (Handayani, 2004). Berbagai jenis mikroorganisme terutama mikroorganisme endofitnya berpotensi, tetapi belum banyak dimanfaatkan untuk kesejahteraan masyarakat (Kahono & Amir, 2002).

Sementara itu, dengan berkembangnya ilmu dan teknologi, maka semakin berkembang pula pengetahuan tentang penyakit dan pengendaliannya. Sampai saat ini penyakit infeksi pada manusia yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen, merupakan permasalahan kesehatan yang cukup serius dan pengobatan dilakukan dengan pemberian antibiotik. Hasil penelitian Neneng, (2000), melaporkan bahwa pemakaian antibiotik dapat menyebabkan mikroorganisme patogen menjadi resisten. Selain resisten juga mengalami mutasi (Brooks *et al.*, 2001). Bakteri yang meningkat kekebalannya terhadap

antibiotik antara lain *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumonia*. Tingkat kekebalan kedua bakteri ini meningkat 2-3 kali lipat sejak tahun 1997. Sedang *Escherichia coli* kekebalannya meningkat dari 19% menjadi 32% terhadap antibiotik pada tahun 1997. Di Indonesia diketahui ada sekitar 23 jenis bakteri *Escherichia coli* dan 33 *Klebsiella pneumonia* yang kebal terhadap antibiotik. Sementara itu menurut Tjay (2002) sejak akhir tahun 1980-an muncul berbagai kuman dari kelompok *Staphylococcus* yang resisten terhadap penisillin. Sanglard (2001) dan Bonjar *et al.*, (2004) menyampaikan bahwa jumlah dan jenis infeksi terhadap manusia semakin luas, zat antimikroba semakin berspektrum sempit sehingga hanya efektif untuk jenis patogen tertentu saja dan ada kecenderungan resistensi mikroba hanya terhadap zat antimikroba tertentu saja.

Salah satu mikroorganisme penghasil antibiotik yang mulai banyak diteliti sekarang ini adalah kapang endofit yang terdapat di dalam sistem jaringan tumbuhan, seperti daun, batang, bunga, ranting atau pun akar tumbuhan (Clay, 1988). Kapang endofit ini menginfeksi tumbuhan sehat pada jaringan tertentu

*Telp: +6285691083634
Email: ruthmell2000@yahoo.com

tanpa menimbulkan gejala yang tampak sebagai penyakit (Bills, 1996; Tan & Zau, 2001; Faeth, 2002), dan mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti mikotoksin, enzim dan antibiotik (Carrol, 1988; Clay, 1988). Banyak kelompok kapang endofit mampu memproduksi senyawa antibiotik yang aktif melawan bakteri maupun fungi patogenik terhadap manusia, hewan dan tumbuhan, terutama dari genus *Coniothirum* dan *Microsphaeropsis* (Petrini *et al.*, 1992).

Untuk mengatasi permasalahan tersebut, maka perlu dicari senyawa aktif baru yang mampu membasmi bakteri patogen. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan seleksi terhadap 29 isolat kapang endofit yang berasal dari Taman Nasional Gunung Halimun, sebagai sumber pencarian senyawa aktif baru, dengan tujuan untuk mendapatkan senyawa aktif antibakteri *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (kedua bakteri ini sangat erat hubungannya dengan bagian dalam tubuh manusia).

BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme. Kapang endofit yang digunakan sebanyak 29 isolat yang berasal dari 9 sampel tumbuhan berkhasiat obat di Taman Nasional Gunung Halimun (TNGH) Jawa Barat. Isolat tersebut merupakan koleksi Puslit Bioteknologi LIPI Cibinong. Mikroorganisme uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Kedua bakteri ini merupakan kelompok bakteri enteropatogenik yang telah resisten terhadap antibiotik penisillin (Salle, 1961). diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Seleksi kapang potensial. Seleksi kapang endofit penghasil senyawa antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar padat (*Diffusion Agar Plate Method*). Bakteri uji sebanyak 1 mL diinokulasikan ke dalam cawan Petri dan tambahkan medium Nutrient agar cair yang tidak terlalu panas sebanyak 15 ml kemudian dihomogenkan dengan cara digoyang dan dibiarkan sampai dingin. Setelah medium padat, potongan kapang endofit (berdiameter 6 mm) yang akan diseleksi ditempelkan diatas permukaan medium, selanjutnya diinkubasikan selama 2-3 hari pada suhu kamar (28-30°C). Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat di sekitar kapang endofit (Desriani *et al.*, 2004; Strobel *et al.*, 2001). Luas zona hambat dihitung dengan rumus dalam Sukara *et al.*, (1992).

Fermentasi. Kapang endofit yang terseleksi positif menghasilkan zona hambat, dilarutkan dengan 5 ml aquades steril. Tiga persen cairan spora/misellium kapang endofit tersebut diinokulasikan ke dalam 300 ml *Potato Dextrose Broth* dan diinkubasi selama 5 hari dalam *inkubator shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar 28-30°C (Castillo *et al.*, 2002; Simanjutak *et al.*, 2002).

Analisis. Analisis dilakukan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (Stahl, 1969), spot yang terdeteksi ditentukan nilai Rf nya dgn rumus dalam Khopkar (1990). Analisis selanjutnya menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menurut Gritter *et al.*, (1990) dan sebagai eluen disiapkan Kloroform : Methanol (2 : 4) dan (4 : 2), larutan standar yang digunakan antibiotik Kloramfenikol dan Ampisillin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi kapang endofit terhadap mikroba patogen. Dua puluh sembilan (29) isolat kapang endofit yang berasal dari 9 jenis tumbuhan yang berhasiat obat diseleksi. Hasil seleksi diperoleh, 2 isolat kapang endofit positif menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 35218 dan 3 isolat terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. (Tabel 1).

Menurut Holler (1999) bila suatu senyawa dapat membentuk zona hambat $\geq 3,14 \text{ mm}^2$, maka senyawa tersebut positif menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji. Kapang endofit HL.46F.211 dan HL.57F.258 positif menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 35218. Sementara kapang endofit HL.48F.217, HL.53F.243 dan HL.57F.258 positif menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Daya hambat isolat kapang HL46F.211 terhadap *E. coli* ATCC 35218 diperlihatkan pada Gambar 1 A dan. HL.53F.243 terhadap *S. aureus* ATCC 25923 pada Gambar 1 B. Isolat kapang HL.57F.258 mampu menghambat kedua bakteri uji, sehingga kapang tersebut dikategorikan mempunyai spectrum luas karena dapat menghambat dua bakteri uji sekaligus, sementara itu isolat yang lain hanya dapat menghambat satu bakteri uji saja dan dikelompokkan ke dalam kelompok antibiotik berspektrum sempit (Tjay. 2002).

Menurut Brook *et al.*, (2001) bakteri *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sudah resisten terhadap antibiotik terutama kelompok antibiotik β -laktam. Resistensi kedua bakteri

Tabel 1. Hasil uji kapang endofit terhadap *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (dari 29 isolat)

No Isolat	Kode Isolat	Zona Hambat terhadap	
		<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
17.	HL.46F.211	+++	-
20.	HL.48F.217	-	+
25.	HL.53F.243	-	+
26.	HL.57F.258	++	+++

Keterangan :+ : Terbentuk zona jernih ($7 \leq d \leq 10$ mm)
 ++ : Terbentuk zona jernih ($11 \leq d \leq 14$ mm)
 +++ : Terbentuk zona jernih ($d \geq 15$ mm)

tsb disebabkan karena bakteri tsb memproduksi enzim β -laktamase, enzim ini dapat memotong cincin β -laktam sehingga aktivitas antibiotik tersebut menjadi hilang. Menurut Neneng (2000) bakteri *Escherichia coli* ATCC 35218 diketahui sebagai bakteri yang mampu menghasilkan enzim β -laktamase Tipe TEM-1, sehingga bakteri ini resisten terhadap antibiotik kelompok β -laktam. Jadi, senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh kapang endofit yang menghambat pertumbuhan kedua bakteri uji ini merupakan senyawa antibiotik yang tahan terhadap aktivitas enzim β -laktamase.

Pola Pertumbuhan Kapang Endofit Potensial.

Dalam penelitian ini 2 kapang endofit (HL.46F.211 dan HL.57F.258) terpilih untuk penelitian lebih lanjut, karena kedua kapang tersebut mempunyai kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji, dengan menunjukkan hasil zona hambat yang luas (Tabel 1), yaitu masing masing terhadap *E. Coli* dan *S. aureus*. Senyawa aktif akan diproduksi dari kedua kapang tersebut namun sebelumnya dicari lebih dulu pola pertumbuhan dari masing masing kapang tersebut untuk mendapatkan informasi waktu yang tepat pada

proses fermentasi dan pemanenan. Hal ini menjadi penting karena senyawa metabolit sekunder dihasilkan pada saat akhir fase logaritmik atau awal fase stasioner. Pada fase ini terjadi akumulasi senyawa metabolit sekunder pada medium fermentasi (Ingraham, 2000).

Langkah selanjutnya yang harus segera dilakukan adalah *recovery*, yaitu upaya memanen senyawa antibiotik (metabolit sekunder) sebelum terjadi autolisis misellium yang mengakibatkan penurunan pertumbuhan dan autolisis sel yang dapat mengakibatkan rusaknya antibiotik (El Sayed, 1994). Pola pertumbuhan kapang endofit HL.46F.211 dan HL.57F.258 diperlihatkan pada gambar 2 dan 3. Dari Gambar 2 dapat diketahui bahwa, fase adaptasi kapang endofit HL. 46F.211 dimulai pada hari ke-0 sampai hari ke-1. Pada fase ini terjadi penyesuaian diri kapang endofit pada lingkungan barunya. Pada fase ini belum terjadi pembelahan sel melainkan terjadi pertambahan ukuran atau besar sel. Selanjutnya masuk fase permulaan pembiakan (hari ke-1-2). Fase berikutnya adalah fase pembiakan cepat (fase Logaritmik/ fase eksponensial), yaitu terjadi pada hari ke-2 sampai hari ke 4 tetapi pada hari ke 4 terlihat populasi menurun, hal ini kemungkinan terjadi kesalahan dalam pengambilan sampel (hari ke 4) yang kurang homogen sehingga populasi menurun.

Pertambahan jumlah sel mengikuti kurva logaritmik. Berakhirnya fase ini, kemudian diikuti fase pembiakan diperlambat (hari ke 4-5). Pada fase ini pembelahan sel mulai melambat, sehingga jumlah sel yang hidup hampir sama dengan sel yang mati, karena dipengaruhi jumlah nutrisi yang mulai habis. Akhir fase logaritmik atau memasuki fase stasioner merupakan saat metabolit sekunder mulai dihasilkan dengan titik

Gambar 2. Grafik pola pertumbuhan kapang endofit HL.46F.211

pertumbuhan kultur sel tertinggi, seperti ditunjukkan pada gambar 2. Pada hari ke-5 sel mencapai jumlah tertinggi yaitu $3,61 \times 10^8$ CFU/mL, sehingga hari ke-5 adalah waktu yang tepat untuk memanen senyawa antibiotik, karena diduga pada saat sel mencapai jumlah yang tertinggi diperkirakan senyawa metabolit sekunder yang terakumulasi juga mencapai maksimal (Simanjutak *et al.*, 2002). Pada Gambar 3, pola pertumbuhan kapang endofit HL.57F.258 tidak jauh berbeda dan diketahui pada hari ke-5 merupakan waktu yang tepat untuk memanen senyawa antibakteri pada proses fermentasi karena jumlah sel mencapai nilai tertinggi yaitu $2,40 \times 10^8$ CFU/mL.

Pengukuran pH juga dilakukan, pada awal dan akhir fermentasi. Derajat keasaman (pH) awal medium kultur kapang endofit HL.46F.211 adalah 5,63 kemudian terjadi kenaikan pH yaitu menjadi 7,19. Pada kultur kapang endofit HL.57F.258 juga terjadi kenaikan dari 5,67 menjadi 7,23. Peningkatan nilai pH terjadi karena senyawa asam yang terakumulasi dalam medium dimanfaatkan oleh sel sebagai sumber energi selama sporulasi (Benoit *et al.*, 1990 dalam Simanjutak *et al.*, 2002). Selain itu, kenaikan pH mungkin juga disebabkan karena terakumulasinya bahan-bahan alkali dalam medium (Simanjutak *et al.*, 2002). Menurut El-Sayed (1994) kisaran pH yang diperlukan untuk produksi penisillin (antibiotik) berkisar antara 5 sampai 7,5. Sementara pH medium hasil fermentasi oleh kedua kapang masuk dalam kisaran tersebut sehingga kemungkinan cocok untuk pertumbuhan kapang endofit dan untuk produksi senyawa antibiotik.

Fermentasi dan ekstraksi kapang endofit.

Fermentasi dilakukan pada kedua kapang endofit terseleksi (HL.46F.211 dan HL.57F.258). Senyawa bioaktif (metabolit sekunder) diharapkan dapat dikeluarkan secara ekstraseluler ke dalam medium fermentasi. Senyawa aktif dapat dihasilkan secara

Gambar 3. Grafik pola pertumbuhan kapang endofit HL.57F.258

optimal apabila faktor aerasi, suhu, pH medium dan ketersediaan nutrisi cukup untuk pertumbuhan kapang endofit selama proses fermentasi, demikian juga bahan-bahan organik seperti karbon, nitrogen, dan mineral yang dibutuhkan oleh kapang endofit untuk biosintesis. Seperti yang dilaporkan oleh Madigan *et al.*, (2000) bahwa akumulasi pembentukan antibiotik penisillin terjadi secara optimum apabila medium mengandung sumber karbon, nitrogen, mineral dan prekursor. Dalam penelitian ini digunakan *Corn-steep liquor* untuk memenuhi kebutuhan tersebut.

Isolasi senyawa antibakteri dilakukan dengan cara ekstraksi menggunakan kloroform. Ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali agar senyawa aktif yang diinginkan terekstrak sempurna di dalam pelarut kloroform (Houghton & Raman, 1998 dalam Simanjutak *et al.*, 2002). Setiap kali ekstraksi, dilakukan inkubasi dengan tujuan untuk penenuhan. Penenuhan dilakukan untuk menyediakan semacam jembatan agar terjadi pemindahan senyawa metabolit sekunder (antibakteri) ke dalam fase kloroform (El Sohly *et al.*, 1990 dalam Simanjutak *et al.*, 2002). Sehingga akan terbentuk dua lapisan yang berbeda. Hasil ekstraksi berupa ekstrak fase kloroform dan ekstrak fase air (medium). Ke dua ekstrak di evaporasi untuk mendapatkan ekstrak kering.

Analisis senyawa antibakteri melalui Kromatografi Lapis Tipis. Kromatografi merupakan metode pemisahan senyawa, dalam suatu campuran berdasarkan berat molekulnya. Hasil perbandingan yang tepat antara eluen kloroform : methanol adalah 4 : 2 dan 2 : 4. Sebagai antibiotik standar menggunakan Kloramfenikol dan Ampisillin.

Hasil uji KLT terhadap ekstrak kapang endofit HL.46F.211 pada fase kloroform (a) dan fase air (b) menunjukkan indikasi positif (Gambar 4). Ekstrak fase kloroform mempunyai nilai R_f yang mendekati nilai R_f Kloramfenikol (0,84) dan Ampisillin (0,76), sedangkan

Gambar 4. Hasil KLT ekstrak kapang endofit HL.46F.211 pada silika gel F254.

- Spot ekstrak fase kloroform
- Spot ekstrak fase air
- Spot Kloramfenikol
- Spot Ampisilin

ekstrak fase air belum dapat terangkat sempurna karena diduga ekstrak fase air tercampur dengan senyawa metabolit lain yang terdapat dalam kultur fermentasi. Hasil identifikasi menunjukkan positif pada ekstrak fase kloroform hanya memiliki atau menunjukkan noda tipis.

Noda pada masing-masing ekstrak dan antibiotik standar hanya terdeteksi dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm. Senyawa tersebut tampak sebagai bercak/ noda gelap pada latar belakang yang berfluoresensi kuning-hijau. Setelah disemprot dengan penapak bercak CeSO_4 (*Cerium Sulfat*) warna noda yang terbentuk ungu.

Analisis KLT terhadap ekstrak fase kloroform dan fase air kapang endofit HL.57F.258 juga menunjukkan hasil positif (Gambar 5), yaitu contoh uji mempunyai kisaran nilai R_f mendekati R_f antibiotik standar Kloramfenikol (0,84) dan Ampisillin (0,76). Sementara itu hasil positif pada ekstrak fase air hanya memiliki noda tipis. Noda tipis tersebut mengindikasikan bahwa senyawa metabolit sekunder pada ekstrak kapang endofit HL.57F.258 terlarut dalam kloroform, atau senyawa metabolit sekunder tersebut bersifat non polar.

Analisis senyawa antibakteri dengan metode KCKT. Hasil analisis menggunakan KCKT diperlihatkan pada Tabel 2 dan 3. Pada kromatogram hasil analisis fraksi kloroform (HL46F211), diketahui bahwa nilai R_t senyawa tersebut terdeteksi pada menit 2,679, mendekati kisaran R_t Ampisillin pada menit 2,650. Pada kromatogram HL.46F.211(1) nilai R_t senyawa, terdeteksi

Gambar 5. Hasil uji KLT ekstrak kapang endofit HL.57F.258 pada silika gel F254

- Spot ekstrak fase kloroform
- Spot ekstrak fase air
- Spot Kloramfenikol
- Spot Ampisillin

pada menit 2,708 mendekati kisaran R_t Kloramfenikol (pada menit 2,796). Dari hasil kromatogram tersebut diketahui pula bahwa senyawa pada fraksi HL.46F.211(1) hasilnya benar-benar murni, karena *Peak* yang terbentuk hanya satu dengan luas area 100 %. Pada kromatogram HL.46F.211(2) dan HL.46F.211(3) pada fase air, nilai R_t senyawa yang terdeteksi masing masing pada menit 2,725 dan 2,792, waktu R_t nya mendekati R_t Kloramfenikol. Sehingga dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa ekstrak fungi endofit HL.46F.211 menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang mendekati Kloramfenikol dan Ampisillin atau senyawa turunannya. Bila dilihat dari hasil seleksi awal, isolat HL.46F.211 dapat menghambat pertumbuhan *E. Coli* (+++) dan tidak menghambat pertumbuhan *S. aureus* (Tabel 1) sementara hasil KCKT dari ekstrak isolat ini menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa yang mendekati Kloramfenikol dan Ampisillin. Kloramfenikol dan Ampisillin merupakan 2 macam antibiotik yang sama sama dapat membinasakan bakteri gram negatif dan positif. Jadi dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa senyawa aktif anti bakteri dari isolat HL.46F.211 baru terlihat setelah melalui fermentasi dan ekstraksi.

Kromatogram hasil analisis KCKT fraksi kloroform pada ekstrak HL57F.258(1) dan HL57F.258(2) serta HL.57F.258 fase air menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder tersebut mempunyai waktu retensi yang kisarannya mendekati nilai R_t Kloramfenikol standar (3,267), R_t masing masing adalah 3,258 dan

Tabel 2. Hasil analisis ekstrak kapang HL.46F.211 menggunakan KCKT pada eluen Kloroform : Metanol = 2 : 4

No	Kode sampel	RT	Luas Area (%)	Senyawa pembanding	RT Senyawa pembanding
1	HL.46F.211 (1) (fase air)	2,708	100	Kloramfenikol	2,796
2	HL.46F.211 (1) (fase Kloroform)	2,679	3,16	Ampisillin	2,650
3	HL.46F.211 (2) (fase air)	2,725	82,55	Kloramfenikol	2,797
4	HL.46F.211 (3) (fase air)	2,792	39,79	Kloramfenikol	2,797

Tabel 3. Hasil analisis ekstrak kapang HL.57F.258 menggunakan KCKT pada eluen Chloroform : Metanol = 4 : 2

No.	Kode sampel	RT	Luas area (%)	Senyawa pembanding	RT senyawa pembanding
1	HL.57F.258 (1) (fase Kloroform)	3,258	25,13	Kloramfenikol	3,267
2	HL.57F.258 (2) (fase Kloroform)	3,204	60,45	Kloramfenikol	3,267
		2,829	23,99	Ampisillin	2,883
3	HL.57F.258 (3) (fase Kloroform)	2,812	91,04	Ampisillin	2,883
4	HL.57F.258 (fase air)	3,254	14,26	Kloramfenikol	3,267
		2,887	36,09	Ampisillin	2,883

3,204 serta 3,254. Selain itu ekstrak HL57F.258(2) dan HL57F.258(3) dari fraksi kloroform serta HL57F.258 fase air mengandung senyawa metabolit sekunder yang mendekati Rt.Ampisillin standar (2,883), yaitu masing masing 2,829, 2,812 dan 2,887 (Tabel 3). Khususnya untuk ekstrak HL.57F.258 (3) pada fase kloroform diperoleh luas area 91,04 %. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang HL57F.258 mendekati Kloramfenikol dan Ampisillin atau menghasilkan senyawa aktif yang dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

KESIMPULAN DAN SARAN

Diperoleh 2 isolat kapang endofit yaitu HL.46F.211 dan HL.57F.258 positif menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 35218 dan 3 isolat yaitu HL.48F.217, HL.53F.243 dan HL.57F.258 positif menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Hasil analisis senyawa antibakteri dengan KCKT menunjukkan bahwa senyawa aktif dari ekstrak kapang HL.46F.211 dan HL.57F.258 mempunyai nilai waktu retensi (Rt) mendekati antibiotik standar kloramfenikol dan Ampisillin. Khususnya HL.46F.211(1) pada fase air menghasilkan luas area 100% terhadap antibiotik standar Kloramfenikol dan HL.57F.258 (3) fase Kloroform menghasilkan luas area 91,04% terhadap antibiotik standar Ampisillin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Pimpinan Proyek Penelitian Bioteknologi yang telah memberikan dana dan kesempatan dalam melakukan penelitian. Disampaikan pula ucapan terima kasih kepada Saudara Bustan dan Saudari Nuryati serta

semua pihak yang membantu kelancaran dalam kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bills, G.F.** 1996. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. *World Mycologia Journal*: 31-65.
- Bonjar, J.G., Fooladi, M.H., Mahdavi, M.J., & Shahghasi, A.** 2004. Broad-spectrum, A novel antibacterial from *Streptomyces* sp. *Biotechnol* **3**: 126-130.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., & Morse, S.F.** 2001. *Medical Microbiology*. 2th edition. New York: Mc. Graw Hill.
- Carroll, G.C.** 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* **62**: 2-9.
- Carroll, G.C.** 1991. Bey and pest deterrence alternative strategies and hidden cost of endophytic microorganism in vascular plants. Di dalam: Andrew, J.H. & Manamo, S.S. (eds.). *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag.
- Castillo, U.F., Strobel, G.A., Frod, E.J., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Albert, H., Robison, R., Condrón, M.A., Teplow, D.B., Stevens, D., & Yaver, D.** 2002. Mumubicins wide-spectrum antibiotic produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytes on *kennedia nigricans*. *Microbiology* **148**: 2675-2685.
- Clay, K.** 1988. Fungal endophytes of grasses: A devense mutualism between plants and fungi. *Ecology* **69**(1): 10-16.
- Desriani A.M. & Lestari, Y.** 2004. Screening of *Streptomyces* spp. producing -laktamase inhibitory protein. *Hayati* **11**: 88-92.
- El-Sayed, A.H.M.** 1994. Production of penicillins and chepalosporins by fungi. Di dalam: *The Mycota*. Tokyo: Springer. Halaman 517.
- Faeth, S. H.** 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualism?. *Journal Oikos* **98**: 25-36.
- Gritter, R.J., Bobbitt, J.M., & Schwarting, A.E.** 1991. *Pengantar Kromatografi*. Bandung: Penerbit ITB.
- Handayani, D.L.** 2004. *Mikrofungi Endofit Penghasil Antibakteri Penghambat Escherichia coli*. Skripsi. Fakultas Biologi UGM. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Holler, U.** 1999. Isolation, biological activity and secondary metabolite investigations of marine derived fungi and selected host sponges. Wihelmina. Carolo University. www.opus.tu-bs.de/opus/volltexte/1999/40
- Ingraham, J.L. & Ingraham, C.A.** 2000. *Introductionary of Microbiology*. Second edition. Washington: Brooks Cole.
- Kahono, S. & Arief, A.J.** 2002. Kegiatan Penelitian Keanekaragaman Hayati di TNGH: Kerjasama LIPI-PHKA-JICA. Workshop Riew BCP-JICA. Jakarta. Halaman 10.
- Khopkar S.M.** 1990. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: Penerbit UI
- Madigan, M.T. Martinko, J. M., & Parker, J.** 2000. *Brock Biology of Microorganism*. New Jersey: Prentice Hall Inc.

- Neneng, L.** 2000. Karakterisasi Senyawa Antibiotik Yang Resisten Terhadap Beta-laktamase Tipe TEM-1 dari Isolat ICBB 1171 Asal Ekosistem Air Hitam Kalimantan Tengah. [Http://www.icbb.org/indonesia/penelitian/penelitian01.htm](http://www.icbb.org/indonesia/penelitian/penelitian01.htm)
- Petrini, D., Sieber, T.N., Toti, T., & Viret, D.** 1992. Ecology metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxin* **1**: 185-196.
- Sanglard, D.** 2001. Integrated Antifungal Drug Discovery in *Candida albicans*. *Nature Biotechnology* **19**: 212-213.
- Salle, B. S.** 1961. *Fundamentals Principles of Bacteriology*. 5th edition. Philadelphia: Mc. Graw Hill Book Co. Halaman 265.
- Simanjutak, P., Melliawati, R., Soeksmanto, A., Parwati, T., & Bustanussalam.** 2002. Pengembangan bahan baku zat bioaktif antimalaria dari mikroba endofit tumbuhan obat Indonesia. Laporan Teknik Penelitian Puslit Bioteknologi-LIPI. Cibinong-Bogor.
- Stahl, E.** 1969. *Thin Layer Chromatography: A Laboratory Hand Book*. Translated by M.R.F. Ashworth. New York: Springer-Verlag. Halaman 101, 148.
- Strobel, G.A., Dirkse, E., Sears, J., & Markworth, C.** 2001. Volatile antimicrobials from *Muscudor albus* a novel endophytic fungus. *Journal Microbiology* **147**: 2943-2950.
- Sukara E, Melliawati, R., & Saono, S.** 1992. Amylases production from Cassava by an indigenous yeast. *J. Sci. Tech. Develop* **9**: 157-168.
- Tan, R.X. & Zou, W.X.** 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Journal Natural Product The Royal Society of Chemistry* **18**: 448-459.
- Tjay, T.H. & Raharja, K.** 2002. *Obat-obat Penting, Khasiat, Penggunaan, dan Efek Sampingnya*. Jakarta: PT. Exel Media Komputindo.