

ISOLATION OF ENDOPHYTIC FUNGI FROM PATCHOULI LEAVES (*POGOSTEMON CABLIN BENTH*) AS ANTIBACTERIAL AGAINST PATHOGENIC BACTERIA BY BIOAUTOGRAPHY AND AGAR DIFFUSION

Sitti Nur Haerani Arif¹

¹ Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, 90231, Indonesia

| | |
|--|--|
| Article info Received: 09/11/2022 Review: 06/01/2023 Available online:04/05/2023 | ABSTRACT <i>Patchouli (Pogostemon cablin Benth) is a plant used as a substance in the pharmaceutical industry such as the manufacture of anti-inflammatory, antifungal, anti-insect and anti-inflammatory drugs. This study aimed to obtain endophytic fungi isolates having the potential as antibacterial by using TLC- Bioautography and agar diffusion methods. This research was conducted by isolating the endophytic fungi from Patchouli leaves and after that, purification and macroscopic tests were carried out and ten isolates were obtained pure. The results of the isolate screening test with codes IFDN 1, IFDN 3, IFDN 4, IFDN 6, IFDN 7, IFDN 8 and IFDN 9, showed the highest inhibition. Furthermore, the antibacterial activity was assayed by TLC-Bioautography. The results showed active spots (Rf 3 = 0.54; Rf 4 = 0.61; Rf 6 = 0.58; Rf 7 = 0.45; Rf 8 = 0.54; Rf 9 = 0.47) against Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidemics. The results of the antibacterial activity test by diffusion method obtained an inhibition zone for each bacterium, namely Staphylococcus aureus of 8.66 mm, Staphylococcus epidermidis of 8.38 mm, and Escherichia coli of 12.23 mm</i> |
| Corresponding Author: Sitti Nur Haerani Arif Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, Indonesia email: 15020180239@umi.ac.id | |
| Keyword: | Agar diffusion; Antibacterial; Endophytic fungi; skin infections; TLC Bioautograph |



Copyright ©2023 by Author

Journal Microbiology Science by Faculty of Pharmacy Universitas Muslim Indonesia is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

PENDAHULUAN

Tanaman yang banyak digunakan oleh masyarakat sebagai bahan obat tradisional salah satunya ialah tanaman nilam. Nilam merupakan tanaman perdu wangi, berdaun halus dan berbatang segi empat. Daun kering tanaman nilam disuling untuk mendapatkan minyak yang digunakan sebagai salah satu bahan industri farmasi seperti pembuatan obat antiradang, antifungi, antiserangga serta antiinflamasi¹. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa tanaman nilam menghasilkan minyak nilam

yang memiliki efek antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dan memiliki prospek terapeutik yang lebih luas dalam infeksi bakteri².

Bakteri endofit merupakan mikroorganisme yang tumbuh dalam jaringan tumbuhan dan dapat dijumpai pada bagian akar, daun serta batang tumbuhan. Kemampuan bakteri endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit

sekunder melalui bakteri endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya tersebut³.

Hampir semua jaringan tumbuhan mengandung fungi endofit. Salah satu cara untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari suatu tanaman adalah dengan mengisolasi fungi endofit dari tanaman tersebut. Fungi endofit adalah mikroorganisme yang hidup di dalam jaringan tanaman pada periode tertentu dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Fungi endofit yang terdapat di dalam jaringan tanaman tersebut mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder⁴.

Fungi endofit merupakan kelompok mikroorganisme yang tumbuh secara intra dan interselular pada jaringan tanaman tanpa menyebabkan gejala penyakit pada tanaman inang. Fungi endofit dapat memproduksi produk metabolit alam yang dapat berguna bagi kesehatan, pertanian, dan kegunaan industri seperti antibiotik, antikanker, agen kontrol biologis dan senyawa bioaktif lainnya⁵.

Antibakteri merupakan zat yang dapat menekan pertumbuhan ataupun reproduksi bahkan dapat membunuh bakteri⁶. Turunan dari zat-zat yang dibuat secara semi-sintesis termasuk kelompok ini juga, dan begitupun dengan semua senyawa sintesis yang berkhasiat sebagai antibakteri⁷.

Penggunaan antibakteri yang tidak tepat turut mendorong munculnya masalah resistensi. Diantara penyebabnya adalah pemakaian antibakteri dikalangan masyarakat tanpa pengawasan, peresepan antibakteri oleh dokter tanpa pedoman dan tanpa kontrol, serta dosis dan lama pemberian yang tidak tepat⁸.

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri endofit dari daun nilam. Hal itu dikarenakan fotosintesis banyak terjadi pada daun, yang merupakan pabrik dari glukosa yang akan menjadi dasar terbentuknya metabolit sekunder. Setelah isolat bakteri endofit dan metabolit sekundernya didapatkan lalu akan dilanjutkan uji aktivitas antibakterinya kepada bakteri patogen. Isolat yang mempunyai kemampuan antibakteri akan dilakukan skrining metabolit sekunder untuk membuktikan bahwa metabolit sekunder yang dihasilkan pada daun nilam berasal dari bakteri endofit.

METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf (SIMC Model YX-280 B), cawan petri (Normax), chamber, erlenmeyer (Iwaki Pyrex), gelas kimia (Iwaki Pyrex), gelas ukur (Iwaki Pyrex), inkubator (Mamert), Laminar Air Flow (LAF), lampu spiritus, lampu UV 254 nm dan UV 366 nm, lemari pendingin, ose

bulat, ose lurus, oven, pipa kapiler, pinset, shaker, timbangan analitik (Chyo), dan vial.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah aquadest steril, bakteri (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*), disk blank, etanol 70%, etil asetat, kloramfenikol, lempeng KLT, medium Nutrient Agar (NA), medium Potato Dextrosa Agar (PDA), medium Maltosa Yeast Broth (MYB), NaCl 0,9%, dan sampel daun nilam (*Pogostemon cablin*).

Pengambilan dan Penyiapan Sampel

a. Pengambilan sampel

Sampel penelitian yang digunakan berupa daun Nilam (*Pogostemon cablin*) diperoleh di Kabupaten Kolaka. Nilam (*Pogostemon cablin*) diambil dan dicuci hingga bersih dengan aquadest lalu disterilkan dengan etanol 70% dan dicuci dengan aquadest steril selama 2 menit untuk menghindari kontaminasi lalu ditiriskan sampai kering⁹.

b. Isolasi fungi endofit

Tumbuhan daun Bandotan dibersihkan menggunakan air mengalir. Diambil daunnya, dan didesinfeksi dengan etanol 70% dan dilanjutkan dengan pembilasan menggunakan air steril selama 1 menit. Kemudian sampel dikeringkan dengan menggunakan

tissue steril selama satu menit. Sampel kemudian dipotong 1 cm, dan dibelah menjadi dua bagian kemudian masing-masing sampel diletakkan dalam medium Potato Dextrosa Agar (PDA), kemudian diinkubasi dalam suhu kamar selama 3 hari⁷.

c. Pemurnian fungi endofit

Fungi yang telah tumbuh diambil menggunakan ose bulat dan dipindahkan ke medium Potato Dextrosa Agar (PDA). Kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 3 hari¹⁰.

d. Pemeriksaan Makroskopik

Pengamatan secara makroskopis meliputi permukaan koloni, bentuk koloni, tepi dan sudut elevasinya¹¹.

Penyiapan Bakteri Uji

a. Pembuatan stok dan peremajaan bakteri uji

Bakteri uji masing-masing diambil satu ose lalu diinokulasikan dengan cara digoreskan pada medium Nutrient Agar (NA) miring lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Setelah itu dapat digunakan sebagai mikroba uji¹².

b. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri uji hasil peremajaan disuspensikan menggunakan larutan NaCl fisiologis 0,9% kemudian diukur

kekeruhannya menggunakan spektrofotometer hingga diperoleh trasmitan kekeruhan 25%. Pada panjang gelombang 580 nm menggunakan bakteri uji ¹².

Uji Skrining Isolasi Fungi

Isolat murni fungi endofit diinokulasikan kedalam cawan petri yang berisi medium Nutrient Agar (NA) sebanyak 15 mL yang masing-masing telah diinokulasikan dengan bakteri uji *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Esherichia coli* dimana isolat tersebut diletakkan diatas permukaan medium. Kemudian diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C lalu diamati zona hambat yang terbentuk ¹³.

Fermentasi Isolat Fungi

Isolat yang memiliki zona hambat paling besar pada uji skrining selanjutnya akan difermentasi pada medium Maltosa Yeast Broth (MYB). Isolat aktif kemudian diambil dengan menggunakan ose bulat dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 200 mL medium cair Maltosa Yeast Broth (MYB), selanjutnya dilakukan fermentasi menggunakan rotary shaker dengan kecepatan 200 rpm pada suhu 25°C selama 14 hari. Fermentat yang diperoleh diekstraksi dengan menggunakan pelarut etil asetat hingga diperoleh ekstrak etil asetat ¹⁴.

Uji Aktivitas Antibakteri Isolat Fungi Endofit Daun Secara KLT-Bioautografi

a. Identifikasi secara KLT-Bioautografi

Lempeng KLT sebelum digunakan diaktifkan terlebih dahulu dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit. 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 dimasukkan 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 ¹⁵.

b. Identifikasi penampak bercak

Kristal murni yang didapat kemudian ditotolkan pada lempeng KLT dan dielusi. Hasil pengelusan kemudian disemprotkan penampak bercak golongan komponen kimia ¹⁶.

Uji Aktivitas Antibakteri Isolat Fungi Endofit Daun Nilam (*Pogostemon Cablin*) Secara Difusi Agar

Pada uji aktivitas antibakteri digunakan disc blank yang berdiameter 6 mm. Sebanyak 20 µL larutan ekstrak uji diserapkan ke dalam disc blank. Kemudian ditunggu sampai kering. Hal ini bertujuan agar larutan uji terserap semua ke dalam disc blank. Disc blank yang telah kering kemudian diletakkan diatas media NA yang telah mengandung bakteri uji dan inkubasi selama 3x24 jam dengan suhu 37°C. Hasil positif dari uji aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram yang menandakan adanya penghambatan pertumbuhan oleh ekstrak uji. Kontrol positif yang digunakan adalah cakram antibiotik kloramfenikol. Antibiotik kloramfenikol memiliki spektrum luas yang dapat menghambat pertumbuhan bakterigram positif dan gram negatif yang berpenetrasi kedalam jaringan dengan baik¹⁷.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tanaman yang banyak digunakan oleh masyarakat sebagai bahan obat tradisional salah satunya ialah tanaman nilam. Nilam merupakan tanaman perdu wangi, berdaun halus dan berbatang segi empat. Daun kering tanaman nilam disuling untuk mendapatkan minyak yang digunakan sebagai salah satu bahan industri farmasi seperti pembuatan obat antiradang, antifungi, antiserangga serta antiinflamasi¹. Tanaman memiliki kandungan seperti

eugenol, geraniol, benzaldehid, keton dan azulen. Selain itu, minyak atsiri daun nilam juga mengandung senyawa golongan terpenoid yang lain seperti seychellen, norpatchoulenol, nortetrapatchoulenol, pogostol dan pogostone yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri dan antijamur¹.

Penelitian ini dilakukan dengan mengisolasi fungi endofit yang dapat memiliki aktivitas sebagai antibakteri dari daun nilam (*Pogostemon cablin*). Penelitian ini menggunakan sampel daun nilam sebagai sumber penghasil fungi endofit. Fungi endofit dapat menghasilkan metabolit sekunder sebagai senyawa bioaktif potensial untuk dikembangkan menjadi agen antibakteri¹⁸.

Penelitian ini diawali dengan mengisolasi fungi endofit yang sebelumnya dilakukan sterilisasi permukaan dengan menggunakan alkohol 70% dengan tujuan untuk menghilangkan mikroba yang ada pada permukaan daun nilam (*Pogostemon cablin*) sehingga yang tumbuh adalah fungi yang benar-benar berasal dari jaringan daun nilam (*Pogostemon cablin*), kemudian daun nilam (*Pogostemon cablin*) dipotong-potong kecil untuk memudahkan fungi endofit yang beradapada jaringan tanaman mampu tumbuh baik pada medium.

Isolasi fungi endofit dilakukan dengan cara menanam potongan daun nilam (*Pogostemon cablin*) ke dalam

medium Potato Dextrose Agar + Chloramphenicol (PDAC). PDA (Potato Dextrose Agar) adalah media yang umum untuk pertumbuhan fungi karena memiliki pH yang rendah yaitu pH 4,5- 5,6 sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang membutuhkan lingkungan yang netral dengan pH 7,0 dan suhu yang optimum untuk dapat tumbuh antara 25-30 °C.¹⁹ Medium PDA (Potato Dextrose Agar) juga diketahui memiliki sumber karbohidrat, dan dextrosa sebagai sumber karbon untuk menunjang pertumbuhan fungi endofit²⁰. Penambahan Chloramphenicol digunakan untuk mencegah pertumbuhan bakteri pada medium. Chloramphenicol merupakan

antibiotik berspektrum luas yang mampu membunuh bakteri gram positif dan bakteri gram negatif sehingga yang tumbuh pada permukaan medium adalah fungi endofit yang berasal dari daun nilam (*Pogostemon cablin* Benth.)²¹.

Setelah dilakukan isolasi fungi endofit dari sampel daun nilam (*Pogostemon cablin*) yang diperoleh kemudian dilanjutkan ke uji pemurnian yang bertujuan untuk memperoleh isolat fungi endofit yang tunggal²². Dari uji pemurnian diperoleh sepuluh isolat. Hasil uji pemurnian isolat fungi endofit daun nilam dapat dilihat pada Tabel 1.

Table 1. Hasil pemurnian isolat fungi endofit pada daun nilam (*Pogostemon cablin*)

| No | Kode fungi | Biakan fungi |
|----|------------|--------------------|
| 1 | IFDN 1 | Biakan fungi ke-1 |
| 2 | IFDN 2 | Biakan fungi ke-2 |
| 3 | IFDN 3 | Biakan fungi ke-3 |
| 4 | IFDN 4 | Biakan fungi ke-4 |
| 5 | IFDN 5 | Biakan fungi ke-5 |
| 6 | IFDN 6 | Biakan fungi ke-6 |
| 7 | IFDN 7 | Biakan fungi ke-7 |
| 8 | IFDN 8 | Biakan fungi ke-8 |
| 9 | IFDN 9 | Biakan fungi ke-9 |
| 10 | IFDN 10 | Biakan fungi ke-10 |

Selanjutnya karakterisasi morfologi fungi dilakukan dengan mengamati beberapa karakter secara makroskopik meliputi bentuk koloni, bentuk tepi, bentuk

elevasi, dan warna. Hasil dari makroskopik dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pemeriksaan makroskopik isolat fungi endofit pada daun nilam (*Pogostemon cablin*)

| Kode fungi | Warna | Bentuk | Tepi | Elevasi |
|------------|---------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------|
| IFDN 1 | Coklat | <i>Filiform</i> | <i>Branching</i> | <i>Drop-Like</i> |
| IFDN 2 | Hitam | <i>Filiform</i> | <i>Branching</i> | <i>Umbonate</i> |
| IFDN 3 | Hitam | <i>Filiform</i> | <i>Branching</i> | <i>Drop-Like</i> |
| IFDN 4 | Putih kekuningan | <i>Irregular And Spreading</i> | <i>Ciliate</i> | <i>Raised</i> |
| IFDN 5 | Hitam | <i>Filiform</i> | <i>Woodly</i> | <i>Drop-Like</i> |
| IFDN 6 | Putih | <i>Irregular And Spreading</i> | <i>Thread-Like</i> | <i>Hiry</i> |
| IFDN 7 | Putih | <i>Winkled</i> | <i>Ciliate</i> | <i>Flat</i> |
| IFDN 8 | Putih | <i>Round</i> | <i>Smooth</i> | <i>Flat</i> |
| IFDN 9 | Putih | <i>Round</i> | <i>Smooth</i> | <i>Flat</i> |
| IFDN 10 | Kuning | <i>Round With Raised Margin</i> | <i>Wavy</i> | <i>Flat</i> |

Setelah melakukan pemeriksaan makroskopik selanjutnya dilakukan pemeriksaan mikroskopik yang bertujuan untuk mengetahui karakterisasi isolat fungi

endofit daun nilam (*Pogostemon cablin*). Hasil dari uji mikroskopik dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pemeriksaan mikroskopik isolat fungi pada daun nilam (*Pogostemon cablin*)

| kode sampel | Hifa | Spora | Filum | Genus |
|-------------|----------|-------|-------------------|---------------------|
| IFDN 1 | Bersekat | Ada | <i>Ascomycota</i> | <i>Daldinia sp.</i> |
| IFDN 3 | Bersekat | Ada | <i>Ascomycota</i> | <i>Daldinia sp.</i> |
| IFDN 4 | Bersekat | Ada | <i>Ascomycota</i> | <i>Daldinia sp.</i> |
| IFDN 6 | Bersekat | Ada | <i>Ascomycota</i> | <i>Daldinia sp.</i> |
| IFDN 7 | Bersekat | Ada | <i>Ascomycota</i> | <i>Daldinia sp.</i> |
| IFDN 8 | Bersekat | Ada | <i>Ascomycota</i> | <i>Daldinia sp.</i> |
| IFDN 9 | Bersekat | Ada | <i>Ascomycota</i> | <i>Daldinia sp.</i> |

Setelah dilakukan pengamatan mikroskopik dilakukan uji skrining yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat fungi endofit dalam memperlihatkan aktivitas antibakterinya terhadap bakteri uji. Adapun bakteri uji yang digunakan yaitu *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Eschericia coli*. *Staphylococcus aureus* ditandai beberapa penyakit, yaitu penyakit kulit

seperti impetigo, selulitis, abses atau bisul²³. *Staphylococcus epidermidis* umumnya dapat menimbulkan penyakit infeksi kulit seperti jerawat dan pembengkakan²⁴. Sedangkan *Eschericia coli* merupakan bakteri yang mengontaminasi pangan dan menyebabkan diare²⁵. Bakteri diperoleh dari koleksi laboratorium mikrobiologi farmasi Fakultas Farmasi UMI. Hasil uji skrining dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji skrining aktivitas antibakteri isolat fungi endofit daun nilam (*Pogostemon cablin*)

| Fungi Endofit | Diameter zona hambatan(mm) | | |
|---------------|----------------------------|-------|-------|
| | EC | SA | SE |
| IFDN 1 | 24,94 | 20,27 | 21,06 |
| IFDN 3 | 21,31 | 18,86 | 17,02 |
| IFDN 4 | 20,19 | 20,65 | 17,03 |
| IFDN 6 | 13,53 | 17,79 | 18,56 |
| IFDN 7 | 15,02 | 26,24 | 23,26 |
| IFDN 8 | 15,8 | 18,87 | 23,14 |
| IFDN 9 | 19,18 | 24,85 | 23,75 |

Berdasarkan hasil pengamatan uji skrining diperoleh hasil isolat fungi endofit kode IFD 1, IFD 3, IFD 4, IFD 6, IFD 7, IFD 8 dan IFD 9, menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Eschericia coli* dengan diameter zona hambatan yang terbentuk berturut-turut (24,94 mm, 21,31 mm, 20,19 mm, 13,54 mm, 15,02 mm, 18,80 mm, 19,18 mm.) *Eschericia coli*

(20,27 mm, 18,86 mm, 20,65 mm, 17,79 mm, 26,24 mm, 18,87 mm, 24,85 mm.) untuk bakteri *Staphylococcus aureus* (21,06 mm, 17,02 mm, 17,03 mm, 18,56 mm, 23,26 mm, 23,14 mm, 23,75 mm.) untuk bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Inilah yang menjadi dasar pemilihan isolat fungi endofit dengan kode IFDN 1, IFDN 3, IFDN 4, IFDN 6, IFDN 7, IFDN 8, IFDN 9, dilanjutkan pada tahap proses fermentasi,

yang bertujuan untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder pada isolat.

Isolat kemudian difermentasi menggunakan medium Maltosa Yeast Broth (MYB) selama 14 hari, sambil dishaker dengan kecepatan 200 rpm, kecepatan ini diharapkan pada proses fermentasi fungsinya dapat mencapai fase stasioner dan menghasilkan metabolit sekunder¹⁵. Fase stasioner ditandai dengan penambahan fungi dari jumlah sel yang tumbuh sebanding dengan jumlah sel yang mati. Ini terjadi, karena sumber nutrisi dalam medium mulai menurun sehingga fungi endofit daun nilam akan menghasilkan metabolit sekunder sebagai pertahanan terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim²⁶. Adapun alasan medium fermentasi yang digunakan yaitu Maltosa Yeast Broth (MYB), karena medium ini merupakan medium cair yang mengandung ekstrak yeast sebagai sumber protein, maltosa dan dektrosa sebagai sumber karbon dan pepton sebagai sumber asam amino, yang dibutuhkan dalam pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme mikroorganisme²⁷.

Hasil fermentasi yang didapatkan kemudian disaring untuk memisahkan supernatan dan miselia, supernatan yang didapatkan kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat. Alasan

penggunaan etil asetat karena etil asetat merupakan salah satu pelarut semi polar yang diharapkan dapat menarik senyawa polar maupun senyawa nonpolar¹². Hasil ekstraksi kemudian dilanjutkan untuk pengujian aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri uji yang bertujuan untuk melihat isolat yang memiliki potensi sebagai antibakteri.

Identifikasi dengan metode KLT menggunakan eluen n-heksan : etil asetat (1 : 4). Menurut Alen *et al*, pemilihan perbandingan eluen untuk melihat pelarut yang mampu memberikan pemisahan yang baik serta menghasilkan noda zat warna yang bagus. Lempeng KLT hasil dari elusi selanjutnya diamati dibawah lampu UV 254 nm dan UV 366 nm dan diperoleh beberapa bercak²⁸.

Kemudian dilanjutkan dengan pengujian KLT-Biautografi kontak dengan cara menempelkan lempeng KLT pada medium yang telah dicampur dengan bakteri uji sebelumnya. Alasan pemilihan metode kontak karena hasil yang diperoleh jelas yang ditandai dengan adanya zona hambat atau zona bening yang tidak ditumbuhi mikroba serta pengerjaannya yang mudah²⁹. Hasil dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil pengujian KLT-Bioautografi dari kromatogram ekstrak etil asetat fermentat isolat fungi endofit daun nilam (*Pogostemon cablin*)

| No | Kode | Nilai Rf | Warna pada Penampak Bercak | | Bakteri Uji |
|----|--------|----------|----------------------------|-----------|---|
| | | | UV 254 nm | UV 366 nm | |
| 1 | IFDN 3 | 0,54 | Hijau | Ungu | <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> |
| 2 | IFDN 4 | 0,61 | Hijau | Ungu | <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> |
| 3 | IFDN 6 | 0,58 | Hijau | Ungu | <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> |
| 4 | IFDN 7 | 0,45 | Hijau | Ungu | <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> |
| 5 | IFDN 8 | 0,45 | Hijau | Ungu | <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> |
| 6 | IFDN 9 | 0,47 | Hijau | Ungu | <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. coli</i> |

Berdasarkan hasil pengujian KLT-Bioautografi, isolat dengan kode IFDN 3 dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* dan *E. Coli* dengan Rf 0,54; isolat dengan kode IFDN 4 menghambat bakteri uji dengan Rf 0,61; isolat dengan kode IFDN 6 menghambat bakteri uji dengan Rf 0,58; isolat dengan kode IFDN 7 menghambat bakteri uji dengan Rf 0,45; isolat dengan kode IFDN 8 menghambat bakteri uji dengan Rf 0,48; isolat dengan kode IFDN 9 menghambat bakteri uji dengan Rf 0,47.

Selanjutnya hasil fermentat yang diperoleh terlebih dahulu telah dipisahkan antara supernatan dan misellia, dilanjutkan

ke uji aktivitas antibakterinya dengan metode difusi agar. Penggunaan metode difusi agar yaitu bertujuan untuk melihat zona hambat terbesar yang dihasilkan oleh fermentat isolat fungi endofit daun nilam (*Pogestemon cablin*).

Hasil pengujian aktivitas antibakteri fermentat isolat fungi endofit daun nilam (*pogestemon cablin*) dengan metode difusi agar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Eschericia coli* memiliki zona hambatan yang berbeda-beda. Hasil uji aktivitas dengan metode difusi agar dapat dilihat pada Tabel 6

Tabel 6. Hasil uji aktivitas antibakteri fermentat isolat fungi endofit daun nilam (*Pogestemon cablin*) isolat fungi ke-3 (IFDN 3) dengan metode difusi agar

| Kode isolate | Diameter Zona Hambat (mm) | | |
|-----------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | <i>Eschericia coli</i> |
| IFDN 1 | 0 | 0 | 0 |
| IFDN 3 | 8,38 | 8,66 | 12,23 |
| IFDN 4 | 0 | 0 | 0 |
| IFDN 6 | 0 | 0 | 0 |
| IFDN 7 | 0 | 0 | 0 |
| IFDN 8 | 0 | 0 | 0 |
| IFDN 9 | 0 | 0 | 0 |

Dari hasil di atas dapat dilihat bahwa isolat dengan kode IFDN 3 dapat memberikan aktivitas antibakteri pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk 8,38 mm; *Staphylococcus epidermidis* rata-rata zona hambat yang terbentuk 8,66 mm; *Eschericia coli* rata-rata zona hambat yang terbentuk 12,23 mm.

Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri yang dilihat berdasarkan diameter zona bening yang terdiri dari empat kelompok yaitu respon lemah (diameter < 5 mm), sedang (diameter 6-10 mm), kuat (diameter 11-20 mm), dan sangat kuat (diameter \geq 20 mm)³⁰.

Dari penelitian yang dilakukan diperoleh bahwa fermentat isolat fungi endofit daun nilam (*Pogestemon cablin* Benth.) dengan kode isolat IFDN 3 memiliki aktivitas terhadap bakteri uji dan memiliki potensi sedang dengan diameter

zona hambat bekisar 5-10 mm untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*, dan memiliki potensi kuat untuk bakteri *Eschericia coli* dengan diameter zona hambat sekitar 11-20 mm.

Pebedaan kemampuan suatu fermentat dalam menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri dapat dipengaruhi oleh sifat dari dinding sel bakteri karena bakteri gram negatif dan gram positif mempunyai dinding sel yang berbeda sensitivitasnya terhadap perlakuan fisik, enzim, dan antibiotik³¹.

Bakteri gram positif memiliki dinding sel tunggal dengan kandungan lipida 1-4% sedangkan pada bakteri gram negatif dinding sel berlapis tiga yang terdiri dari lipoprotein, membran luar fosfolipid, lipopolisakarida, dan kandungan lipid pada dinding sel sekitar 11-22%. Membran luar fosfolipid tersebut yang menyebabkan komponen kimia yang terkandung dalam

fermentat yang bersifat sebagai antibakteri sulit menembus dinding sel bakteri gram negatif³².

Stabilitas senyawa aktif yang terkandung di dalam fermentat juga dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri. Faktor-faktor yang mempengaruhi stabilitas senyawa aktif antara lain suhu, cahaya, udara (terutama O₂, CO₂, dan uap air) serta kelembaban. Terdapat juga faktor lain yang dapat mempengaruhi stabilitas senyawa aktif, yaitu sifat air dan kondisi biotik serta adanya bahan kimia lain yang merupakan kontaminan atau dari pencampuran produk yang berbeda secara aktif dapat mempengaruhi stabilitas senyawa aktif³¹.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian aktivitas antibakteri isolat fungi endofit daun nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) terhadap bakteri patogen yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa :

Daun nilam diisolasi dengan menanam potongan daun nilam pada medium, setelah itu dilakukan pemurnian isolat, lalu dilanjutkan dengan pengujian yang lainnya seperti pemeriksaan makroskopik, mikroskopik, uji aktivitas dengan metode KLT-Bioautografi dan uji aktivitas dengan metode difusi agar.

Pengujian aktivitas antibakteri secara KLT-Bioautografi. Hasil menunjukkan bercak aktif (Rf 3 = 0,54; Rf 4 = 0,61; Rf

6= 0,58; Rf 7= 0,45; Rf 8= 0,54; Rf 9= 0,47) terhadap bakteri *Eschericia coli*, *Staphilococcus aureus* dan *Staphylococcus epidemidis*. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar didapatkan zona hambat pada masing-masing bakteri yaitu *Staphylococcus aureus* 8,66 mm, *Staphylococcus epidermidis* 8,38 mm, dan *Eschericia col* 12,23 mm.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mangun, H. M. S., Herdy, W., dan Agus, P.S. 2012. Nilam. Penebar Swadaya, Jakarta.
2. Yang, Xian., X. Zhang, S. Yang, and W. Liu. 2013. *Evaluation of the Antibacterial Activity of Patchouli Oil. Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 12(3): 307-316
3. Desriani, Safira U.M., Bintang M., Rivai A., Lisdiyanti P. 2014. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit dari Tanaman Binahong dan Ketapang China. Jurnal Universitas Mulawarman. Samarinda: Universitas Mulawarman.*
4. Higginbotham, S, J, Arnold, A, E, Ibanez, A, Spadafora, C, Coley, P, D & Kursar, T, A, 2013, 'Bioactivity of Fungal Endophytes as a Function of Endophyte Taxonomy and the Taxonomy and Distribution of Their Host Plants', PLoS ONE, 8(9).
5. Kumar, S., R. P. Aharwal, H. Shukla and R. C. Rajak. 2014. *Endophytic Fungi: As a Source of Antimicrobials Bioactive Compounds. World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences* (3): 1179- 1197.
6. Roliando, 2019, 'Senyawa Antibakteri Dari Fungi Endofit Edisi Pertama', CV Seribu Bintang, Malang.

7. Tjay, TH, & Rahardja, K, 2010, '*Obat-Obat Penting*', PT Elex Media Komputindo, Jakarta.
8. Maulidiyah, Z., Dali, S., Rusli, R., & Naid, T. (2020). *Isolasi Bakteri Rhizosfer Tanaman Nilam (Pogostemon cablin Benth.) yang Berpotensi sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri terhadap Bakteri Penyebab Infeksi Saluran Pencernaan. Window of Health: Jurnal Kesehatan*, 132-139.
9. Kasi, Y, A, Posangi, J, Wowor, P, M, Bara, R, 2015, '*Uji Efek Antibakteri Jamur Endofit Daun Mangrove Avicennia Marina Terhadap Bakteri Uji Staphylococcus aureus dan Shigella dysenteriae*', *Jurnal e-Biomedik (eBm)*, vol. 3, no.1, hh. 112-117.
10. Elviasari J, Rolan R, Adam M, Ramadhan 2015, '*Isolasi Jamur Endofit Daun Beluntas (Pluchea indica L. Less)*', *Jurnal Sains dan Kesehatan*, vol. 1, no. 3, hh.126-130.
11. Widowati, dkk, 2016, '*Isolasi dan Identifikasi Kapang Endofit Dari Tanaman Kunyit (Curcuma longa L.) Sebagai Penghasil Antioksidan*', *Biopropalindustri*, vol. 7, no. 1, hh. 9-16.
12. Deponda, RA, Fitriana, Nuryanti, S, Herwin, 2019, '*Isolasi Fungi Endofit Kulit Buah Merah (Pandanus conoideus Lam) yang Berpotensi Sebagai Antibakteri Secara Metode KLT-Bioautografi*', *As- Syifaa Jurnal Farmasi*, vol. 11, no. 2, hh. 149-150.
13. Pratiwi, R, E, 2016, '*Uji Aktivitas Antibakteri Fermentat Isolat Fungi Pada Ampas Sagu Asal Kota Palopo Secara KLT- Bioautografi*', Universitas Muslim Indonesia, Makassar.
14. Istiqamah, AN 2015, '*Aktivitas Antibakteri Fermentat Isolat Fungi Endofit Pada Daun Kedondong (Spondias dulcis) Terhadap Bakteri Burkholderia pseudomallei Secara KLT- Bioautografi*', Universitas Muslim Indonesia, Makassar.
15. Fitirana, Nursithya E, 2017, '*Aktivitas Antibakteri Ekstrak Isolat Fungi Endofit Dari Akar Mangrove (Rhizophora apiculata Blume) secara KLT-Bioautografi*', *Jurnal As-Syifaa*, vol. 9, no. 1, hh. 27-36.
16. Rusli, R., & Prayitno, D. 2017. *Isolasi Dan Identifikasi Golongan Komponen Kimia Aktif Antibakteri Ekstrak N-Butanol Sawo Manila (Achras Zapota Linn.) Asal Kota Palopo. Jurnal Ilmiah As-Syifaa*, 9(2), 201-210.
17. Fayyaz, M, Irfan A, M, Zaheer A, Shahid A, A, Amir H, and Shamshad A, 2013, '*In Vitro Susceptibility of Chloramphenicol Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*', *Journal of The Collage of Physicians and Surgeons Pakistan*, vol. 23, no. 9, hh. 637-640.
18. Gouda, S, G, Das, S, K, Sen, H, S, Shin & J,K, Patra, 2016, '*Endophytes: a Treasure House Of Bioactive Compounds Of Medicinal Importance*, *Frontiers in Microbiology*', 7: 1538.
19. Cappucino, J, G, & Sherman, N, 2014 *Manual Laboratorium Biologi*, Jakarta, Indonesia: EGC.
20. Radji, M, 2005, '*Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit Dalam Pengembangan Obat Herbal, Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi*', *Jurnal Ilmu Kefarmasian*, vol. 2, no.3, hh. 113-126.
21. Kemenkes 2011, '*Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik*'. Jakarta: Kementrian Kesehatan RI.
22. Franciska, A, Darwis, W, 2013, '*Pembuatan Isolat Jamur Obat Picnoporus sanguineus*', Bengkulu: Universitas Bengkulu.
23. Tuntun Maria, 2016, '*Uji Efektivitas Ekstrak Daun Pepaya Terhadap Pertumbuhan (Carica papaya L.)*

- Terhadap Pertumbuhan Bakteri Escherichia coli dan Staphylococcus aureus', Politeknik Kesehatan Tangkarang.
24. Radji, M, 2011, 'Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran', EGC, Jakarta.
25. Winianti, P. Rahayu. Dkk. 2018. Escherichia coli: Patogenitas Analisis dan Kajian Resiko. IPB Press: Bogor.
26. Muhsinin, S, Rizal, M, B, & Laida, N, M, 2016, 'Isolation Of endophytic Bacteria From Plant Basil (Ocimum Sanctum L.) as Antibacterials Against Staphylococcus Aureus', Journal Of Innovations In Pharmaceutical And Biological Sciences (JIPBS), vol. 3, no.4, hh. 92-96.
27. Rusli, & Rahmianar, D, 2013, 'Penelusuran Potensi Mikroba Endofit Dan Rimpang Paku Kepala Tupai (Drynaria quercifolia J.Smith) Sebagai Penghasil Senyawa Antibiotik', Jurnal As-Syifa, vol. 05, no.2, hh.128-139.
28. Alen, Y, Agresa, F, L, & Yuliandra, Y, 2017, 'Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Aktivitas Anti Hiper Urisemia Ekstrak Rebung Schizostachyum brachycladum Kurz Pada Mencit Putih Jantan'. Jurnal Sains Farmasi dan Klinis, vol. 3, no. 2, hh. 146-152.
29. Fadlila, W. N., Yuliawati, K. M., & Syafnir, L. (2015). *Identifikasi Senyawa Aktif Antibakteri dengan Metode Bioautografi KLT terhadap Ekstrak Etanol Tangkai Daun Talas (Colocasia EsculentaL) Schott. Jurnal Farmasi Gelombang, 2, 2460-6472.*
30. Susanto, D, Sudrajat, & R, Ruga, 2012, 'Studi Kandungan Bahan Aktif Tumbuhan Meranti Merah (Shorea leprosula Miq) Sebagai Sumber Senyawa Antibakteri', Mulawarmnan Scientifie, vol. 11, no. 2, hh. 181-190.
31. Herlina, R, Yasir, Y, Semsuli, 2018, 'Deteksi Antimikroba Secara KLT Bioautografi Ekstrak Buah Belimbing Wuluh (Averrhoa blimbi Linn.), Makassar: Universitas Hasanuddin.
32. Poeloengan, M, & Pratiwi, 2010, 'Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Mangga (Garcinia mangostana Linn)', Media Litbang Kesehatan, vol. 20, no.2, hh. 65-69.