

Produk Esktraseluler Isolat Kapang Endofit C.1.1 dan C.3.3 dari Ranting Cempaka Kuning (*Michelia champaca* L.) sebagai Antimikroba

(Extracellular Products of Endophytic Fungi Isolate C.1.1 and C.3.3 from Cempaka Kuning Branch (*Michelia champaca* L.) as an Antimicrobial)

ADEFIRA ELISYIA JUNIHARTI, DESI NADYA AULENA, NOVI YANTIH,
NUR MIFTAHURROHMAH, SHIRLY KUMALA*

**Fakultas Farmasi Universitas Pancasila,
JI Srengseng Sawah Jagakarsa, Jakarta 12640.**

Diterima 9 Desember 2020, Disetujui 8 Maret 2021

Abstrak: Cempaka Kuning (*Michelia champaca* L.) adalah tanaman yang diketahui memiliki khasiat sebagai antimikroba, antioksidan, dan antikanker. Secara umum kapang endofit yang hidup di dalam jaringan tanaman dapat menghasilkan senyawa yang memiliki khasiat sama dengan tumbuhan inangnya. Penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi antimikroba isolat kapang endofit C.1.1 dan C.3.3 dari ranting cempaka kuning (*Michelia champaca* L.). Isolat yang telah didapat dari penelitian sebelumnya, diremajakan terlebih dahulu pada media PDA. Selanjutnya dilakukan fermentasi pada setiap isolat selama 12 hari. Supernatan hasil fermentasi diekstraksi secara partisi dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan n-butanol. Ekstrak kemudian dipekatkan dan diuji aktivitas antimikroba dengan kombinasi dua metode yaitu metode difusi cakram dan mikrodilusi. Ekstrak n-butanol isolat kapang endofit ranting cempaka kuning mampu menghambat pertumbuhan mikroba dengan nilai diameter daerah hambat terbesar pada isolat C.1.1 terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (12.26 mm), *Escherichia coli* ATCC 8739 (11.40 mm), *Candida albicans* ATCC 10231 (10.50 mm), dan *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus* (11.30 mm) dengan Konsentrasi Hambat Minimum dan Konsentrasi Bunuh Minimum sebesar 12,5%. Disimpulkan bahwa kedua isolat kapang endofit ranting cempaka kuning memiliki potensi dalam menghambat pertumbuhan mikroba patogen.

Kata kunci: Kapang endofit, aktivitas antimikroba, metabolit sekunder, ranting cempaka kuning (*Michelia champaca* L.)

Abstract: *Michelia champaca* L. is known to have efficacy as an antimicrobial, antioxidant, and anticancer. In general, endophytic fungi that live in plant tissues is capable of producing secondary metabolites as their host plant. The objective of this research is to examine the antimicrobial potential of endophytic mold isolates C.1.1 and C.3.3 from yellow cempaka branches (*Michelia champaca* L.). Isolates obtained from previous research, first was rejuvenated on PDA. Fermentation was carried out on each isolate for 12 days. The fermented supernatant was then extracted partially with *n*-hexane, ethyl acetate, and *n*-butanol solvent. The extract was then concentrated and tested for antimicrobial activity using disk diffusion and microdilution methods. *N*-butanol extract of endophytic fungi isolates of yellow champaca branches was able to inhibit the microbial growth with the largest inhibition area in isolate C.1.1 in *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (12.26 mm), *Escherichia coli* ATCC 8739 (11.40 mm), *Candida albicans* ATCC 10231 (10.50 mm), and *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus* (11.30 mm) with Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Concentration of 12,5% . It was concluded that both endophytic fungi isolates of yellow champaca branches had the potential to inhibit the growth of pathogenic microbes.

Keywords: Endophytic fungi, microbial activities, secondary metabolites, branch of *Michelia champaca* L.

*Penulis korespondensi
email: shirlykumala@univpancasila.ac.id

PENDAHULUAN

MIKROBA endofit adalah mikroorganisme yang dapat tumbuh di dalam jaringan tumbuhan dan menghasilkan metabolit sekunder yang sama dengan metabolit sekunder tanaman asalnya. Mikroba endofit ditemukan hampir pada semua tumbuhan dan diisolasi dari seluruh jaringan tumbuhan. Mikroba endofit dapat berasal dari bakteri, maupun jamur⁽¹⁾. Dalam satu tanaman terdapat beberapa spesies bakteri endofit baik Gram positif dan Gram negatif, sedangkan kapang endofit umumnya memiliki inang yang spesifik. Kapang endofit merupakan sumber potensial sebagai bahan baku penghasil metabolit yang memiliki bioaktivitas. Secara alami, kandungan senyawa bioaktif dari kapang endofit berfungsi untuk menjaga tanaman inang agar bertahan dalam kondisi lingkungan biotik dan abiotik yang tidak menguntungkan. Hubungan kapang endofit dan inangnya dapat membentuk hubungan simbiosis mutualisme sampai membentuk hubungan patogenik. Kapang endofit dapat melindungi tumbuhan inangnya dari serangan patogen dengan mengeluarkan senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif yang dikeluarkan ini kemudian memiliki potensi dalam membunuh patogen. Maka dapat dikatakan bahwa senyawa bioaktif yang dikeluarkan oleh kapang endofit ini dapat melindungi tumbuhan inangnya. Sehingga kapang endofit membangun sistem imun tanaman inang dari serangan mikroba patogen. Kapang endofit memiliki kemampuan menghasilkan kandungan yang sama atau sejenis dengan yang dihasilkan tanaman inangnya⁽²⁾.

Pada penelitian ini digunakan tanaman cempaka kuning (*Michelia champaca* L.) untuk di ambil senyawa bioaktifnya yang berasal dari mikroba endofit. Cempaka kuning (*Michelia champaca* L.) termasuk dalam famili Magnoliaceae, merupakan tanaman daerah tropis dan subtropis. Tanaman cempaka merupakan tanaman berkayu dan memiliki nilai ekonomis yang cukup tinggi, karena merupakan bahan baku untuk produk-produk obat dan industri parfum^(3,4).

Solusi untuk memperoleh bahan baku obat tanpa perlu adanya kekhawatiran akan kendala budidaya dan konservasi dapat dilakukan dengan memanfaatkan kapang endofit. telah banyak dilaporkan sebagai sumber senyawa bioaktif antimikroba.

Berdasarkan penelitian sebelumnya produk ekstraseluler yang terkandung dalam ekstrak metanol batang cempaka memiliki kandungan kimia alkaloid, flavonoid, saponin dan triterpenoid. Flavonoid dan saponin yang diketahui memiliki aktivitas sebagai antimikroba⁽⁵⁾.

Akhir akhir ini penelitian terkait dengan penca-

rian senyawa yang berpotensi sebagai antimikro baru mulai terus dilakukan oleh peneliti. Dalam penelitian ini dilakukan uji aktivitas antimikroba kapang endofit ranting cempaka kuning terhadap beberapa mikroba patogen *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, dan *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) serta *Aspergillus niger* ATCC 16404, dan *Candida albicans* ATCC 1031.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Isolat Kapang endofit C.1.1 dan C.3.3 dari ranting cempaka kuning (*Michelia champaca* L.) berasal dari penelitian sebelumnya. *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol, Media *Tryptic Soy Broth* (TSB), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Nutrient Agar* (NA), *Potato Dextrose Yeast* (PDY), *Mueller Hilton Broth* (MHB), *Mueller Hilton Agar* (MHA), *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), Kaldu Pepton, CaCO₃, kloramfenikol 0,005%, nistatin, tween 80, *Lactofenol cottonblue*, kertas cakram 6 mm, microplate 96 well flat, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* ATCC 10231, *Asergillus niger* ATCC 16404, aquadest, pereaksi dragendroff, pereaksi mayer, pereaksi stiansy, HCl 2N, logam magnesium, HCl pekat, amil alkohol, ammonia 10%, NaOH 1N, kloroform, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, besi (III) klorida.

Alat. *Laminar Air Flow* (LAF) (Geelman), autoklaf (Newclave Model HL 36 Ae), inkubator (Memmert), mikroskop (Olympus), *rotary evaporator*, *homogenizer* (Termolyne), *orbital shaker*, oven (Memmert), sentrifuge (Kokusuan H-103n), timbangan analitik (AND GR 200), *cork borer*, sengkeli, pinset, cawan Petri, erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung, gelas ukur, *beaker glass* pisau, lampu spiritus, dan jangka sorong.

Peremajaan Isolat Kapang Endofit. Peremajaan isolat kapang endofit C.11 dan C.3.3 ranting cempaka kuning (*Michelia champaca* L.) dilakukan dengan cara ditanam kembali pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dalam cawan Petri steril. Kemudian diinkubasi selama 5 sampai 7 hari pada suhu kamar.

Fermentasi Goyang Kapang Endofit^(6,7). Media fermentasi cair *Potato Dextrose Yeast* (PDY) disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian ditambahkan serbuk CaCO₃ yang telah disterilkan dalam oven. Isolat tunggal kapang endofit ranting tanaman cempaka kuning (*Michelia champaca* L.) yang telah ditumbuhkan selama 7 hari diambil sebanyak 3-5 potong dengan menggunakan pembolong

gabus, *cork borer*. Potongan kapang dimasukkan ke dalam media fermentasi cair *Potato Dextrose Yeast* (PDY) sebanyak 50 ml dalam Erlenmeyer 250 ml. Dilakukan fermentasi starter dengan menggunakan *orbital shaker incubator* pada kecepatan 130 rpm, selama 5 hari pada suhu kamar (25-27 °C). Sejumlah 10 mL fermentasi starter dipindahkan ke dalam media PDY 190 mL yang telah ditambahkan serbuk CaCO₃ steril dalam erlenmeyer 1000 mL. Selanjutnya di fermentasi kembali menggunakan orbital shaker selama 7 hari pada suhu kamar (25-27 °C). Hasil fermentasi dilakukan sentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 2000 rpm pada suhu kamar (25-27 °C) untuk memisahkan biomassa dari supernatan.

Ekstraksi Hasil Fermentasi Kapang Endofit. Supernatan yang diperoleh dari hasil fermentasi kapang endofit diekstraksi bertingkat dengan menggunakan pelarut organik yaitu *n*-heksan, etilasetat, dan *n*-butanol. Sejumlah 50 mL supernatan diekstraksi dengan 100 mL *n*-heksan terlebih dahulu sampai terasari sempurna. Kemudian fase air yang tersisa diekstraksi kembali dengan 100 mL etilasetat sampai tersari sempurna. Fase air yang tersisa diekstraksi kembali dengan 100 mL *n*-butanol, sampai tersari sempurna. Masing-masing ekstrak fase *n*-heksan, etilasetat, *n*-butanol dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator*. Ekstrak dari masing-masing pelarut digunakan untuk uji aktivitas antimikroba.

Penapisan Fitokimia ⁽⁸⁾. Pada uji penapisan fitokimia digunakan supernatan yang telah disaring dari fase *n*-heksan, etilasetat, *n*-butanol, untuk mengetahui golongan senyawa kimia dari masing-masing isolat. Penapisan fitokimia meliputi: Identifikasi golongan Alkaloid, Flavonoid, Saponin, Identifikasi golongan Tanin, golongan kuinon, golongan steroid dan triterpenoid, Identifikasi golongan minyak atsiri, dan identifikasi golongan kumarin.

Pembuatan Media. Media Padat: Media padat yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA) untuk bakteri dan *Potato Dextrose Agar* (PDA) untuk kapang, khamir. Media cair yang digunakan: Kaldu Pepton untuk bakteri dan *Tryptic Soy Broth* (TSB) untuk kapang dan khamir.

Penyiapan Stok Bakteri Uji. Mikroba uji *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, dan *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus* diinokulasikan sebanyak 1 ose ke dalam media agar miring *Nutrient Agar* (NA) kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Sedangkan untuk jamur *Candida albicans* ATCC 10231 diinokulasikan ke dalam media agar miring *Potato Dextrose Agar* (PDA), dan *Aspergillus niger* ATCC 16404 diinokulasikan ke dalam media agar

miring *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) kemudian diinkubasi pada suhu kamar (25 - 27°C) selama 5-7 hari.

Pembuatan Suspensi Mikroba Uji. Biakan bakteri dari stok mikroba uji diambil sebanyak 1 ose menggunakan sengkeli, kemudian disuspensikan ke dalam *Mueller Hilton Broth* (MHB), lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Sedangkan untuk khamir dan Kapang disuspensikan ke dalam media *Tryptic Soy Broth* (TSB) steril, kemudian diinkubasi pada suhu 25-27°C selama 5-7 hari. Kekeuhan dari suspensi mikroba disetarakan hingga mencapai kekeuhan yang sama dengan pengukuran 25% T di spektrofotometer.

Pengujian Aktivitas Antimikroba Metode Difusi Agar ^(9,10). Metode difusi agar dilakukan dengan metode *disc diffusion* dengan menggunakan kertas cakram. Lidi berkapas steril dicelupkan ke dalam suspensi mikroba uji yang telah setara dengan Mc Farland 0.5 lalu ditiriskan dengan menempatkan lidi berkapas pada dinding tabung. Kemudian lidi berkapas diswab pada media padat *Nutrient Agar* (NA) steril untuk bakteri dan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) steril untuk kapang dan khamir dengan cara memutar cawan 60° hingga rata pada permukaan agar. Kertas cakram dijenuhkan dengan larutan uji yang berupa ekstrak kental *n*-heksana, ekstrak kental etilasetat, ekstrak kental *n*-butanol, kontrol negatif, dan kontrol positif (kloramfenikol untuk antibakteri dan nistatin untuk antijamur). Kertas cakram yang telah jenuh, diletakkan diatas media NA dan PDA dengan menggunakan pinset steril dalam cawan Petri. Kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C untuk bakteri dan diinkubasi selama selama 2-5 hari pada suhu 20-25°C untuk kapang, khamir. Daerah bening di sekitar cakram menunjukkan adanya diameter daerah hambat (DDH) terhadap bakteri yang diuji. DDH diukur dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan millimeter (mm).

Metode Dilusi Cair ^(11,12). Metode dilusi cair dilakukan dengan metode mikro dilusi yang menggunakan *microplate* dilakukan berdasarkan cara kerja yang telah dilakukan oleh Neng et al 2017⁽¹²⁾ dan dimodifikasi sesuai kebutuhan pada penelitian ini. *Microplate* yang terdiri dari 96 sumur, kolom dan 8 baris. Baris pertama (A) digunakan sebagai kontrol negatif yang diisi dengan 200 mL media *Mueller Hilton Broth* (MHB) untuk bakteri dan media *Tryptic Soy Broth* (TSB) untuk khamir. Baris kedua digunakan sebagai kontrol yang diisi suspensi bakteri dengan media MHB dan suspensi khamir dengan media TSB, ketiga (C) ditambahkan 100 µL larutan ekstrak uji dengan konsentrasi 100%. Setelah campuran tersebut homogen diambil 100 µL dari sumur baris ketiga

(C) lalu dipindahkan ke sumur baris keempat (D). Kemudian langkah tersebut diulangi hingga hasil pengenceran ekstrak telah mengisi sumur baris H. Pada setiap sumur uji ditambahkan 100 L suspensi mikroba uji. *Microplate* diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C untuk mikroba uji bakteri dan diinkubasi selama 2-5 hari pada suhu 20-25°C untuk mikroba uji khamir. Setelah itu sebanyak 10 mL media *Mueller Hilton Agar* (MHA) steril untuk bakteri dan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) steril untuk khamir dituangkan ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan memadat. Sejumlah larutan diambil menggunakan tusuk gigi steril dari sumur *microplate* yang menunjukkan nilai KHM serta dari seluruh sumur yang berada di atas nilai KHM. Larutan tersebut kemudian digoreskan ke atas permukaan media MHA dan PDA yang telah disiapkan. Cawan petri diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37°C untuk mikroba uji bakteri dan diinkubasi selama 2-5 hari pada suhu 25-27 °C untuk mikroba uji khamir.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fermentasi. Metode fermentasi yang digunakan adalah fermentasi goyang menggunakan *orbital shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Goyangan berfungsi untuk meningkatkan aerasi dan kultur fermentasi. Aerasi bertujuan untuk memberikan pasokan oksigen yang memadai agar dapat mempertahankan kondisi aerobik serta membuang gas karbondioksida yang dihasilkan selama fermentasi berlangsung, serta meratakan

penyebaran mikroorganisme, nutrien, dan oksigen dalam medium fermentasi. Fermentasi dilakukan dengan fermentasi starter terlebih dahulu dengan tujuan untuk menghasilkan sel kapang endofit dalam jumlah banyak sehingga mengoptimalkan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dalam proses fermentasi. Keuntungan starter sendiri adalah kondisi awal untuk melakukan fermentasi sama.

Dalam proses fermentasi isolat yang digunakan merupakan biakan kapang endofit yang telah berumur 7 hari setelah dilakukan peremajaan isolat, dengan tujuan agar pada saat proses fermentasi isolat kapang endofit berada dalam fase pertumbuhan log atau biasa disebut dengan fase eksponensial, dimana fase ketika mikroba aktif membelah kecepatan maksimum. Sehingga jumlah sel metabolit sekunder terbentuk dalam jumlah banyak. Proses fermentasi dilakukan secara aseptik agar tidak terjadi kontaminasi.

Hasil fermentasi didapatkan supernatan dan biomassa. Dalam penelitian ini digunakan supernatan. Dilakukan proses sentrifugasi dengan tujuan untuk memisahkan supernatan dan biomassa hasil fermentasi⁽¹⁰⁾.

Penapisan Fitokimia Supernatan Dan Ekstrak Isolat Kapang Endofit Ranting Cempaka Kuning (*Michelia champaca* L.) Penapisan fitokimia bertujuan memberikan informasi golongan senyawa ekstraseluler yang terkandung dalam supernatan dan ekstrak dari tiga pelarut yaitu n-heksan, etil asetat, dan n-butanol dari isolat kapang endofit ranting cempaka kuning (*Michelia champaca* L.). Hasil penapisan fitokimia dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil penapisan fitokimia isolat kapang endofit ranting cempaka kuning (*Michelia champaca* L.)

Penapisan Fitokimia	Supernatan		<i>n</i> -heksan		Etil asetat		<i>n</i> -butanol	
	C.1.1	C.3.3	C.1.1	C.3.3	C.1.1	C.3.3	C.1.1	C.3.3
Alkaloid	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoid	+	+	-	-	-	-	+	+
Saponin	+	+	-	-	-	-	+	+
Tanin	-	-	-	-	-	-	-	-
Kuinon	-	-	-	-	-	-	-	-
Steroid/Triterpenoid	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Kumarin	-	-	-	-	-	-	-	-
Minyak atsiri	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: + = terdeteksi, - = tidak terdeteksi

Hasil penapisan fitokimia supernatan isolat kapang endofit ranting cempaka kuning *Michelia champaca* L. didapatkan hasil positif terhadap senyawa golongan flavonoid, saponin, dan triterpenoid. Pada penelitian terdahulu tanaman cempaka memiliki kandungan senyawa flavonoid asam galat dan kuersetin. Ekstrak metanol dan etanol bagian bunga cempaka kuning menunjukkan aktivitas antiinflamasi dan penyembuhan luka, dan kandungan senyawa bioaktif golongan steroid yang diduga terlibat adalah stigmasterol, dan 3β -16 α -dihydroxy-5-cholesten-21-*aln*-docosanoic acid^(2,4). Senyawa golongan alkaloid, tanin, kuinon, steroid, kumarin, dan minyak atsiri tidak terdeteksi.

Hasil penapisan fitokimia pada ekstrak n-heksan dan etil asetat isolat kapang endofit ranting *Michelia champaca* L. tidak terdeteksi adanya senyawa-senyawa. Hasil penapisan fitokimia n-butanol isolat kapang endofit ranting *Michelia champaca* L.) terdeteksi senyawa flavonoid dan saponin, hal ini dipengaruhi karena kedua senyawa ini bersifat polar dan sesuai dengan kepolaran pelarut ekstrak yaitu n-butanol. Maka senyawa flavonoid dan saponin dapat tertarik ke dalam ekstrak n-butanol sehingga didapat hasil positif pada golongan flavonoid dan saponin.

Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kapang Endofit Ranting Cempaka Kuning (*Michelia champaca* L.) dengan Metode Difusi. Potensi aktivitas antimikroba dengan metode difusi agar dilakukan pada tiga pelarut

ekstrak dari masing-masing isolat yaitu isolat C.1.1 dan C.3.3 dengan tiga pelarut yaitu n-heksan, etil asetat, dan n-butanol. Mikroba uji yang digunakan dalam pengujian ini merupakan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram positif), *Escherichia coli* ATCC 8739 (Gram negatif), *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus* (bakteri resisten), *Candida albicans* ATCC 10231 (kelompok khamir) dan *Asergillus niger* ATCC 16404 (kelompok kapang).

Metode difusi cakram pada penelitian ini merupakan pengujian secara kualitatif yang dilakukan terhadap masing-masing isolat dengan ekstrak yang memiliki pelarut berbeda. Pelarut tersebut mewakili masing-masing tingkat kepolaran. Pada saat pengujian digunakan suspensi mikroba uji yang telah disetarakan kekeruhan dengan McFarland 0,5, menghasilkan jumlah koloni mikroba sebesar 1×10^8 CFU/mL. Kontrol positif yang digunakan dalam pengujian adalah kloramfenikol untuk antibakteri dan nistatin untuk antijamur. Sedangkan kontrol negatif yang digunakan dalam pengujian ini adalah masing-masing pelarut dari ekstrak n-heksan, etil asetat, dan n-butanol. Pengujian dilakukan di ruang *Laminar Air Flow* (LAF) agar tidak terjadi kontaminasi yang dapat mempengaruhi hasil aktivitas antimikroba. Selanjutnya diukur hasil Diameter Daerah Hambat (DDH) yang terbentuk menggunakan jangka sorong. Hasil pengukuran Diameter Daerah Hambat (DDH) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Diameter Daerah Hambat (DDH) ekstrak isolat kapang endofit ranting (*Michelia champaca* L.)

Mikroba Uji	Diameter Daerah Hambat (mm)					
	Isolat Kapang		Kontrol Positif		Kontrol Negatif	
	C.1.1	C.3.3	C.1.1	C.3.3	C.1.1	C.3.3
Ekstrak n-heksan						
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	22,97±0,67	22,10±0,51	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	22,17±0,35	22,03±0,31	-	-
MRSA	-	-	22,07±0,51	21,90±0,12	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	15,13±0,47	14,70±0,36	-	-
<i>Asergillus niger</i>	-	-	26,30±2,26	26,13±2,35	-	-
Ekstrak etil asetat						
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	22,97±0,67	22,10±0,51	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	22,17±0,35	22,03±0,31	-	-
MRSA	-	-	22,07±0,51	21,90±0,12	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	15,13±0,47	14,70±0,36	-	-
<i>Asergillus niger</i>	-	-	26,30±2,26	26,13±2,35	-	-
Ekstrak n-butanol						
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,26±0,25	11,47±0,31	22,97±0,67	22,10±0,51	-	-
<i>Escherichia coli</i>	11,40±0,56	11,23±0,55	22,17±0,35	22,03±0,31	-	-
MRSA	11,30±0,87	10,93±0,25	22,07±0,51	21,90±0,12	-	-
<i>Candida albicans</i>	10,50±0,46	10,20±0,26	15,13±0,47	14,70±0,36	-	-
<i>Asergillus niger</i>	-	-	26,30±2,26	26,13±2,35	-	-

Keterangan: - = tidak ada daerah hambatan; Diameter cakram = 6 mm; MRSA: *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus*.

Pada hasil pengukuran terhadap diameter daerah hambat dalam satuan mm ekstrak n-heksan dan etil asetat tidak didapatkan adanya DDH. Maka ekstrak n-heksan dan ekstrak etil asetat tidak dapat menghambat semua pertumbuhan pada mikroba uji. Ekstrak *n*-butanol isolat kapang endofit ranting cempaka kuning (*Michelia champaca* L.) dapat menghambat semua pertumbuhan mikroba uji kecuali *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Hasil penapisan fitokimia senyawa metabolit sekunder yang telah didapat pada ekstrak *n*-butanol terdapat senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid dan saponin. Kedua senyawa ini merupakan senyawa yang memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan mikroba.

Senyawa flavonoid memiliki 3 mekanisme kerja sebagai antimikroba yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi dari suatu mikroba. Flavonoid penting dalam penghambatan sintesis asam nukleat dimana cincin A dan B senyawa flavonoid berperan dalam proses interkalisasi atau ikatan hidrogen dengan cara menumpuk basa dari asam nukleat sehingga menghambat pembentukan DNA dan RNA dari mikroba. Letak gugus hidroksil dari senyawa flavonoid berada di posisi 2',4' atau 2',6' dihidroksilasi pada cincin B dan 5,7 dihidroksilasi pada cincin. Mekanisme kerja kedua senyawa flavonoid dalam menghambat fungsi membran sel bakteri caranya membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dari dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Hal ini dipengaruhi oleh interaksi antara flavonoid dan DNA. Mekanisme kerja flavonoid terakhir adalah menghambat metabolisme energi dengan menghambat penggunaan oksigen dari bakteri yang dipengaruhi oleh sitokrom C reduktase dimana terdapat energi untuk biosintesis makromolekul bakteri sehingga pembentukan metabolisme bakteri terhambat. Secara keseluruhan proses senyawa flavonoid diawali dengan merusak dinding sel bakteri yang terdiri atas lipid dan asam amino. Lipid dan asam amino akan bereaksi dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid sehingga dinding sel rusak dan senyawa flavonoid akan masuk ke dalam inti sel bakteri. Didalam inti sel flavonoid berinteraksi dengan DNA yang menyebabkan kerusakan pada struktur lipid DNA. Interaksi ini menyebabkan lisisnya bakteri dan sel akan mati⁽¹³⁾.

Senyawa saponin dapat bekerja sebagai antimikroba karena dapat melakukan mekanisme penghambatan dengan cara membentuk senyawa kompleks dengan membran sel melalui ikatan hidrogen, sehingga

menyebabkan sifat permeabilitas dinding sel bakteri hancur dan menimbulkan kematian sel bakteri. Saponin mengandung zat yang dapat menghemolisis darah. Membran sel darah dikatakan menyerupai dengan membran sel bakteri. Oleh karena itu saponin dapat menghemolisis membran sel bakteri sama seperti prosesnya yang dapat menghemolisis membran sel darah merah. Telah dijelaskan sebelumnya bahwa saponin menghasilkan efek antimikroba dengan membentuk senyawa kompleks. Senyawa kompleks yang terbentuk adalah kompleks polisakarida pada dinding sel. Interaksi senyawa kompleks ini menyebabkan kerusakan dinding sel hingga membran sel dan berakhir pada bakterilisis. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri dapat menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel. Saponin dapat menjadi senyawa antibakteri karena permukaan senyawa menyerupai detergen. Hal ini menyebabkan tegangan permukaan dinding sel mengalami penurunan dan merusak permeabilitas membran⁽¹⁴⁾.

Pada pengukuran hasil DDH bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Escherichia coli* ATCC 8739 didapat hasil DDH pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 lebih besar kemungkinan dipengaruhi oleh struktur dinding sel bakteri. Bakteri Gram positif memiliki struktur dinding yang berbeda dengan bakteri Gram negatif. Struktur dinding sel bakteri Gram positif hanya memiliki satu lapisan tunggal dan mengandung sedikit lipopolisakarida, sedangkan bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel yang relatif kompleks, terdiri dari tiga lapisan yaitu lapisan luar, lapisan tengah, dan lapisan dalam, serta mengandung banyak lipopolisakarida. Akibat struktur dinding sel bakteri Gram negatif relatif kompleks mempengaruhi senyawa antimikroba lebih sukar masuk ke dalam sel bakteri sehingga didapat hasil yang lebih besar pada bakteri Gram negatif. Hal ini juga berlaku untuk jamur, dimana jamur memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks dengan rangka dasar yang terdiri dari kristalin, kitin, β -glukan. Sehingga menyebabkan senyawa sukar masuk ke dalam sel jamur⁽¹⁵⁾.

Hasil pengujian aktivitas antimikroba dengan metode difusi didapat bahwa isolat kapang endofit ranting cempaka kuning mampu menghambat pertumbuhan mikroba patogen. Semua isolat kapang endofit ranting cempaka kuning memiliki potensi antibakteri berspektrum luas dan antijamur karena dapat menghambat bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli* ATCC 8739, bakteri resisten yaitu *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus*, dan khamir yaitu *Candida albicans* ATCC 10231.

Antimikroba Metode Mikrodilusi Terhadap

Isolat Kapang Endofit Ranting Cempaka Kuning (*Michelia champaca* L.). Potensi aktivitas antimikroba dengan metode mikrodilusi dilakukan hanya pada ekstrak dengan pelarut *n*-butanol dari masing-masing isolat yaitu isolat C.1.1 dan C.3.3. Karena telah didapat dari hasil uji difusi secara kualitatif ekstrak yang dapat menghambat mikroba uji adalah ekstrak *n*-butanol maka dalam pengujian mikrodilusi digunakan hanya ekstrak *n*-butanol. Mikroba uji yang digunakan dalam pengujian ini merupakan bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli* ATCC 8739, bakteri resisten yaitu *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus*, khamir yaitu *Candida albicans* ATCC 10231. Pengujian aktivitas antimikroba dalam penelitian ini dilakukan dengan penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) dan penentuan konsentrasi bunuh minimum (KBM) dengan metode mikrodilusi menggunakan microplate 96 well flat v. Metode mikrodilusi dalam penelitian ini merupakan pengujian secara kuantitatif. Pada penelitian ini digunakan microplate dalam menentukan KHM karena metode ini lebih sederhana dan membutuhkan sampel yang lebih sedikit, serta sensitivitasnya lebih tinggi dan didapat hasil kuantitatif⁽¹²⁾.

Pengujian KHM dilakukan dengan empat kali pengulangan yang menggunakan kolom 1-4 untuk isolat C.1.1 dan kolom 5-8 untuk isolat C.3.3. Prinsip pengujian ini dilakukan pengenceran pada ekstrak dengan menggunakan media MHB untuk bakteri dan TSB untuk jamur. Konsentrasi paling tertinggi berada pada sumur baris C dimana konsentrasi ekstrak *n*-butanol 100% selanjutnya dilakukan pengenceran seterusnya ke sumur baris D hingga H. Sumur pada baris A merupakan kontrol negatif yang berisikan 200 μ L media MHB dan sumur pada baris B merupakan kontrol positif yang berisikan 100 μ L media MHB dan 100 μ L suspensi bakteri Gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, bakteri Gram negatif yaitu *Escherichia coli* ATCC 8739, bakteri resisten yaitu *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus*, khamir yaitu *Candida albicans* ATCC 10231. Suspensi bakteri yang digunakan dalam pengujian dengan metode mikrodilusi digunakan sesuai dengan pedoman CLSI, yaitu konsentrasi akhir suspensi mikroba yang berada didalam sumur adalah 2-8 $\times 10^5$ CFU/mL. Suspensi bakteri diukur dengan ketentuan 25% T.

Nilai KHM merupakan nilai konsentrasi terkecil dimana tidak ada pertumbuhan mikroba yang dilihat secara visual dari kejernihan ekstrak pada microplat 96 well flat v. Secara visual didapat tingkat kejernihan terdapat pada baris C dan D dimana ekstrak memiliki konsentrasi 100%, 50%, 25%, dan 12,5% dimana masing-

masing konsentrasi diwakilkan dengan baris C, D, E, dan F. Selanjutnya untuk mendapatkan nilai KBM yang merupakan nilai konsentrasi terkecil yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan media agar setelah diinkubasi dilakukan uji penegasan pada KHM yang telah ditentukan. Uji penegasan dilakukan penggosan terhadap baris C, D, E, dan F dalam media MHA.

Tabel 3. Hasil uji mikrodilusi.

Isolat	KBM (%) terhadap Mikroba Uji			
	<i>S. Aureus</i>	<i>E. Coli</i>	<i>MRSA</i>	<i>Candida albicans</i>
Kapang	ATCC	ATCC		ATCC
Endofit	6538	8739		10231
C.1.1	12,5	12,5	12,5	50
C.3.3	25	12,5	12,5	50

Hasil dari goresan dilakukan terhadap kedua isolat dan empat bakteri serta satu khamir. Hasil yang didapatkan pada isolat C.1.1 terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 tidak ada pertumbuhan mikroba pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, dan 12,5% namun pada isolat C.3.3 didapatkan hasil pertumbuhan mikroba pada konsentrasi 12,5%. Hasil yang didapatkan pada isolat C.1.1 dan isolat C.3.3 terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 8739 tidak ada pertumbuhan mikroba pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, dan 12,5%. Hasil yang didapatkan pada isolat C.1.1 dan isolat C.3.3 terhadap bakteri *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus* tidak ada pertumbuhan mikroba pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, dan 12,5%. Dan pada khamir *Candida albicans* ATCC 10231 dilakukan uji penegasan hanya pada dua konsentrasi dan tidak ada pertumbuhan mikroba pada konsentrasi 100% dan 50%.

Didapat hasil (Tabel 3) bahwa nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yang didapat dari isolat C.1.1 terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 adalah 12,5% dan dari isolat C.3.3 adalah 25%. Hasil ini telah dibuktikan oleh uji T statistik dimana kedua isolat kapang endofit ranting cempaka kuning (*Michelia champaca* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 memiliki perbedaan yang signifikan sehingga didapat nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yang lebih baik pada isolat C.1.1. Dan disimpulkan pula bahwa isolat C.1.1 dan C.3.3 terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 8739 dan bakteri *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus* menghasilkan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

sebesar 12,5%. Serta nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) isolat C.1.1 dan C.3.3 terhadap khamir *Candida albicans* ATCC 10231 adalah 50%.

SIMPULAN

Ekstrak *n*-butanol isolat C.1.1 dan C.3.3 dari ekstraseluler produk kapang endofit ranting cempaka kuning (*Michelia champaca* L.) dapat menghambat pertumbuhan mikroba *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231, dan *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Sedangkan ekstrak *n*-heksan dan ekstrak etil asetat tidak dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Ekstrak *n*-butanol isolat C.1.1 dan C.3.3 dari ekstraseluler produk kapang endofit ranting cempaka kuning (*Michelia champaca* L.) memberikan hasil konsentrasi bunuh minimum (KBM) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 12,5% dan 25%, terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 8739 12,5%, terhadap bakteri *Metichillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) 12,5%, terhadap jamur *Candida albicans* ATCC 10231 50%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kumala S. Mikroba Endofit. Jakarta: ISFI Penerbitan; edisi ke 2, 2019. hal 2-4
2. Rajamanikyam M, Vadlapudi V, Amanchy R, Upadhyayula SM. Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2017. Vol. 60 (e17160542).
3. Panneerselvam P, Narayanan VHB, Dura2i RD. Pharmacological and Medicinal Potential from Flowers of Perfume Tree *M. champaca*—A Review. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. 2016. 8(11): 1896-900.
4. Biodiversity, India. India Biodiversity Portal. Joy Perfume Tree. Diambil dari: <https://indiabiodiversity.org/species/show/15644> Diakses pada tanggal:20 Agustus 2018
5. International Food Research Journal. Manhas, N. Dahiya, P. Amity Institute of Biotechnology, Amity University Uttar Pradesh, Noida-201303, Uttar Pradesh, India. In vitro antimicrobial activity and phytochemical screening of leaf and stem extracts of *Michelia champaca* Linn. 2017. h. 24(6): 2672-6.
6. Kumala S, Pratiwi A Ainun. Efek Antimikroba dari kapang endofit ranting tanaman biduri. Jurnal farmasi indonesia 2014;7(2); h 111-119.
7. Kumala S, Ardyanti DSA. Antibacterial Activities of Secondary Metabolite in Endophytic Fungi from Bark of Beringin (*Ficus benjamina* L.) Tree in vitro PSR-November(S). 2018
8. Farnsworth, Norman F. Biological and Phytochemical Screening Of Plants, Journal Of Pharmaceutical Sciences. Americans Pharmacist Association. Amerika. 1966. 55:3.
9. Z Zakaria, SoekamtoNH, Syah YM, Fidaus. Aktivitas antibakteri dari Fraksi *Artocarpus integer* (Thunb). Merr dengan metode Difusi agar. Jurnal Industri Hasil Perkebunan Vol 12, No.2 Desember 2017: 1-6.
10. Noverita, Fitria D, Sinaga E. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri jamur endofit dari daun dan rimpang Zingiber ottensii Val. Jurnal Farmasi Indonesi 2009. Vol 4 No.4: 171-6.
11. Rollando R, Prasetyo YSA, Sitepu R. Uji Antimikroba Minyak atsiri Masoyi (*Masosia aromatica*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Majalah Farmasi dan farmakologi (MFF) 2019 ;23(2);52-7.
12. Kurniati NF. Aktivitas Antibakteri dan Antijamur Ekstrak Etanol Akar, Bunga, dan Daun Turi (*Sesbania Grandiflora* L. Poir). Departemen Farmakologi-Farmasi Klinik. Bandung : Institut Teknologi Bandung. Acta Pharmaceutica Indonesia. 2017. 42:1. hlm. 1-8.
13. Hafsa A, Anurag M, Rajiv G, Shubhini AS. Determination of Quercetin in *Michelia champaca* L. (Champa) Leaves and Stem Bark by HPTLC. Int J Pharm Biol Sci. 2011. 2:388-97.
14. Amoolya G, Venkatesh S, Smita S, Eesha RB, Krishnananda P, Raghu M, Nelluri V, Prashanth kumar G, Mukunda N, Tara S. Wound healing property of topical application of ethanolic extract of *Michelia champaca* flowers in diabetic rats. International Journal of Pharmacology and Clinical Sciences. 2013. 2:67-74.
15. Makhija K, Vignesh SC, Richard L, Prasanna. Isolation of 3 β -16 α -dihydroxy-5-cholesten-21-al, n-Docosanoic acid and Stigmasterol from petroleum ether extract of stem bark of *Michelia champaca*. Arch Appl Sci Res. 2010. 2:344-8.