

Seleksi kapang endofit

asal taman nasional gunung halimun (tng) penghasil senyawa antimikroba
escherichia coli atcc 35218 dan *staphylococcus aureus* atcc 25923

Oleh

Harni

M.0401030

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kondisi alam tropis Indonesia menyimpan kekayaan alam yang begitu beraneka ragam, baik flora, maupun faunanya. Tidak diragukan lagi, bahwa keanekaragaman mikrobiologisnya pun sangat melimpah (Handayani, 2004). Taman Nasional Gunung Halimun (TNGH) merupakan satu kesatuan rangkaian pegunungan bersama dengan Gunung Gede Pangrango dan Gunung Salak. Secara administrasi, Taman Nasional ini termasuk dalam tiga kabupaten dan dua propinsi, yaitu Kabupaten Bogor dan Sukabumi di Propinsi Jawa Barat dan Kabupaten Lebak di Propinsi Banten (Kahono dan Amir, 2002).

Taman Nasional Gunung Halimun merupakan kawasan hutan tropis basah yang topografinya berbukit-bukit, dengan ketinggian 600-2300 meter di atas permukaan laut (mdpl). Secara geografis TNGH terletak di antara 106° 21'-106° 38' Bujur Timur (BT) dan 6° 37'- 6° 51' Lintang Selatan (LS) dengan luas sekitar 40.000 Hektar (Ha) (Kahono dan Amir, 2002). Selain berfungsi sebagai daerah konservasi keanekaragaman flora dan fauna, taman ini juga berfungsi sebagai pengatur iklim mikro, tata air, penunjang pariwisata. Di samping itu TNGH juga

dapat berfungsi sebagai tempat pendidikan dan tempat penelitian (Djuwarsah, 1997).

Kawasan TNGH dihuni berbagai jenis flora, fauna dan mikroorganisme yang sangat melimpah sebagai aset yang tak ternilai harganya. Banyak jenis flora dan fauna yang dikategorikan sebagai biota langka dan endemik yang memiliki potensi untuk dimanfaatkan serta dikembangkan. Berbagai jenis mikroorganisme terutama mikroorganisme endofitnya berpotensi tetapi belum banyak dimanfaatkan untuk kesejahteraan masyarakat (Kahono dan Amir, 2002).

Penyakit infeksi pada manusia yang disebabkan mikroorganisme patogen, merupakan permasalahan kesehatan yang pernah dihadapi oleh setiap orang. Hingga saat ini, cara yang dilakukan untuk pengobatan berbagai jenis penyakit infeksi ini adalah dengan pemberian antibiotik. Pemakaian antibiotik ini ternyata dapat menyebabkan mikroorganisme patogen tersebut resisten (Neneng, 2000).

Resistensi bakteri patogen Gram-positif dan Gram-negatif terhadap antibiotik dapat terjadi melalui mekanisme, misalnya dengan memproduksi enzim yang mampu mendegradasi antibiotik, misalnya *Extended Spectrum Beta-Laktamase* (ESBL), yang berperan memotong cincin β -laktam, sehingga aktivitas antibakterinya menjadi hilang (Kompas, 2002; Neneng, 2000). Selain itu, dengan mengalami mutasi (Brooks *et al.*, 2001). Amin Soebandrio seorang Doktor dari Kedokteran Umum Universitas Indonesia, dalam konferensi pers mengenai "Infeksi Dapat Mengancam Jiwa" mengatakan, bahwa bakteri yang meningkat kekebalannya terhadap antibiotik antara lain *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae*. Tingkat kekebalan kedua bakteri ini meningkat 2-3 kali lipat sejak tahun 1997. *Escherichia coli* kekebalannya meningkat dari 19% pada tahun 1997 menjadi 32% terhadap antibiotik. Di Indonesia ada sekitar 23 jenis bakteri

Escherichia coli dan 33 *Klebsiella pneumonia* yang kebal terhadap antibiotik. Sedangkan, menurut Tjay (2002) sejak akhir tahun 1980-an muncul berbagai kuman dari kelompok Stafilokok yang resisten terhadap penisillin.

Permasalahan resistensi bakteri dapat dikurangi dengan mencari senyawa antibiotik baru atau mencari antibiotik yang resisten terhadap aktivitas enzim β -laktamase dengan mengeksploitasi dunia mikroorganisme.

Salah satu mikroorganisme penghasil antibiotik yang sedang banyak dibicarakan sekarang ini adalah fungi/kapang endofit. Kapang endofit adalah mikrofungi 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 tanpa menimbulkan gejala yang tampak sebagai penyakit (Bills, 1996; Tan and 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). Penelitian Dreyfuss *et al.* (1986), diperoleh **penisillin**, **sporiofungin** yang dihasilkan oleh isolat-isolat endofit *Pleurophomopsis* sp. dan *Cryptosporiopsis* sp. yang diisolasi dari tumbuhan *Cardamin heptaphylla* Schulz. **Siklosporin** dihasilkan oleh strain *Acremonium luzulae* (Fuckel) W. Gams, yang diisolasi dari buah strawberry (Moussaif *et al.*, 1977). Antibiotik **sefalosporin**, yang mulanya dihasilkan oleh suatu strain *Cephalosporium* dan *Emericellopsis* (*Acremonium*), selanjutnya ditemukan juga pada fungi *Anixiopsis*,

Arachnomyces, *Diheterospora*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* dan *Spiroidium* (Morin dan Gorman, 1982 dalam Worang, 2003).

Penelitian ini akan dilakukan seleksi kapang endofit yang mampu menghasilkan senyawa antibakteri *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Kapang endofit yang diseleksi sebanyak 29 isolat, yang diisolasi dari 9 sampel tumbuhan berkhasiat obat yang ada di Taman Nasional Gunung Halimun. Isolat ini merupakan koleksi Puslit Bioteknologi LIPI Cibinong-Bogor.

Mikroorganisme uji yang digunakan dalam penelitian ini 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). *Escherichia coli* mempunyai sifat yang dapat mengakibatkan terjadinya diare, infeksi tractus urinarius, infeksi kantung empedu, meningitis dan endokarditis (Syahrurachman, 1993). Sedangkan *Staphylococcus aureus* merupakan mikoflora pada kulit dan membran mukosa saluran pernafasan, dan dalam kondisi tertentu dapat menyebabkan infeksi pada kulit, membran mukosa, dan dapat menyebabkan bisul, borok serta nanah pada luka (Salle, 1961).

B. Perumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Adakah dari 29 isolat kapang endofit yang diseleksi mampu menghasilkan senyawa antibakteri terhadap *Escherichia coli* strain ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* strain ATCC 25923?

2. Berapa nilai waktu retensi (Rt) senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh kapang endofit pada analisis dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)?

C. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mendapatkan isolat kapang endofit yang mampu menghasilkan senyawa antibakteri terhadap *Escherichia coli* strain ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* strain ATCC 25923.
2. Mengetahui waktu retensi (Rt) senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh kapang endofit pada analisis dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat:

1. Memberikan informasi, pengetahuan, dan gambaran terutama kepada penulis dan masyarakat luas terutama bidang biologi, kesehatan, dan farmasi tentang karakteristik kapang endofit yang berasal dari TNGH, serta potensi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkannya.
2. Sebagai kajian lebih lanjut, diharapkan dapat memberikan alternatif penggunaan senyawa antibiotik alami dalam bidang kesehatan dan terapeutik dalam mengatasi infeksi oleh mikroba patogen.

BAB II

LANDASAN TEORI

A. Tinjauan Pustaka

1. Kapang Endofit

a. Definisi Kapang endofit

Kapang endofit) adalah kapang yang terdapat dalam jaringan tumbuhan, seperti daun, batang, bunga, ranting, maupun akar tumbuhan (Clay, 1988). Kapang endofit selalu hidup tanpa adanya gejala yang tampak sebagai penyakit di dalam jaringan tumbuhan inang mereka (Bills *et al.*, 1996; Tan and Zou, 2001; Faeth, 2002). Fungi endofit tumbuh intraseluler menurut sistem jaringan aleuron pada biji dengan *culm piths* (inti kulum), pelepah daun, dan jaringan pada bunga yang sedang berkembang (Wilson *et al.*, 1995; Tan and Zou, 2001).

Menurut Azevedo (2000), mikoriza dapat juga dianggap sebagai mikroorganisme endofit. Kapang endofit menarik perhatian besar bagi peneliti karena ada dua alasan, yaitu pertama dapat ditemukan di semua tumbuhan, biasanya jumlah dan jenisnya sangat beragam (Stone and Petrini, 1997; Arnold *et al.*, 2000). Alasan kedua, yaitu mampu menghasilkan mikotoksin yang

menguntungkan bagi tumbuhan inang untuk melawan mikroorganisme patogen (Carrol, 1988 *in* Faeth, 2002).

b. Taksonomi Kapang Endofit

Ditinjau dari segi taksonomi dan ekologi kapang endofit digolongkan menjadi dua kelompok berdasarkan bentuk simbiosisnya, yaitu *Clavicipitaceous teleomorphic endophytes* dan *Clavicipitaceous anamorphic endophytes* (Wilson *et al.*, 1991; Petrini *et al.*, 1992). Teleomorphic endophytes merupakan kelompok **Ascomycetes** (famili Balansieae), suku ini menginfeksi tumbuhan Poaceae (Grasses), Cyperaceae, dan Juncaceae. Kelompok ini merupakan parasit bagi tumbuhan inang (Clay, 1989 *in* Wilson, 1995). Sedangkan Anamorphic endophytes merupakan kelompok **Deuteromycetes** (fungi imperfecti), contohnya genus *Acremonium*, *Albolanosa* umumnya menginfeksi Grasses pada musim dingin terutama rumput suku Pooideae. Kelompok ini bersimbiosis mutualisme dengan tumbuhan inang (Clay, 1990 dalam Worang, 2003). Strobel *et al.* (1996) dalam Worang (2003) menyatakan bahwa fungi endofit meliputi genus *Pestalotia*, *Pestelotiopsis*, *Monochaetia* dll. Sedangkan menurut Clay (1988) fungi endofit dimasukkan dalam famili Balansieae yang terdiri dari lima genus, yaitu *Akkinsonella*, *Balansiae*, *Balansiopsis*, *Epichole*, dan *Myriogenospora*.

c. Hubungan Mutualisme Kapang Endofit dengan Tumbuhan Inang

Hubungan antara kapang endofit dan tumbuhan inang adalah mulai dari phytopathogen laten sampai simbiosis mutualisme (Tan and Zou, 2001). Phytopathogen laten artinya kapang endofit merupakan patogen lemah bagi

tumbuhan inang tetapi suatu saat dapat menimbulkan gejala penyakit apabila jaringan sudah tua dan rusak (Azevedo, 2000).

Hubungan mutualisme antara kapang endofit dengan tumbuhan inang adalah fungi akan memperoleh nutrisi dari tumbuhan inang dan tumbuhan inang akan memperoleh zat metabolit dari metabolisme sekunder kapang endofit (Saikkonen and Helander, 1999). Menurut Petrini *et al.* (1992); Rao (1994); Bacon (2000) genus *Balansiae* umumnya menginfeksi tumbuhan tahunan dan hidup secara simbiosis mutualistik dengan tumbuhan inangnya. Dalam simbiosis ini, kapang endofit dapat membantu proses penyerapan unsur-unsur hara yang dibutuhkan oleh tumbuhan untuk proses fotosintesis serta melindungi tumbuhan inang dari serangan penyakit, dan hasil dari fotosintesis dapat digunakan oleh kapang endofit untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya.

Keuntungan penting kapang endofit bagi tumbuhan inang adalah untuk meningkatkan resistensi tumbuhan terhadap hewan herbivora dengan memproduksi senyawa alkaloid, meningkatkan daya tahan terhadap serangan kelompok nematoda dan penyakit yang disebabkan oleh jamur atau patogen lain dengan menghasilkan mikotoksin, antiviral dan antibiotic (Siegel *et al.*, 1987). Selain itu kapang endofit ini juga meningkatkan pertumbuhan tumbuhan inang dengan memproduksi hormon IAA (auksin) (Debattista *et al.*, 1990 *in* Wilson *et al.*, 1995).

d. Metabolit Sekunder Kapang Endofit

Mikroba endofit memiliki potensi dalam dunia farmasi dan agrokimia, yaitu dengan menghasilkan produk antibiotik, komponen antivirus, *volatile antibiotic*

antikanker, antioksidan, insektisida, agen antidiabetik, dan komponen immunosupresif (Strobel and Daisy, 2003).

1.) Produk antibiotik

Banyak kelompok kapang endofit yang mampu memproduksi senyawa antibiotik yang aktif melawan bakteri, fungi patogen terhadap manusia, hewan dan tumbuhan, terutama genus *Coniothirum* dan *Microsphaeropsis* (Petrini *et al.*, 1992). Penelitian Dryfuss *et al.*, (1986) menunjukkan adanya aktivitas yang tinggi dari **penisilin**, **sporiofungin** yang dihasilkan oleh isolat-isolat endofit *Pleurophomopsis* sp dan *Cryptosporiopsis* sp yang diisolasi dari tumbuhan *Cardamin heptaphylla* Schultz. Endofit *Cryptosporiopsis* sp pada umumnya merupakan penghasil senyawa antibiotik berspektrum luas. Isolat kapang endofit *Xylaria* spp juga memiliki potensi besar dalam penelitian industri farmasi maupun pertanian. Isolat kapang endofit yang diisolasi dari tumbuhan epifit di Amerika Selatan dan Mexico dilaporkan dapat menghasilkan suatu senyawa antibiotik baru dari kelompok sitokalasin (Dreyfuss *et al.*, 1986 dalam Worang, 2003).

Antibiotik **siklosporin** dihasilkan oleh strain *Acremonium luzulae* (Fuckel) W. Gams yang diisolasi dari buah strawberry (Moussaif *et al.*, 1997 dalam Worang, 2003). **Siklosporin** ternyata berpotensi sebagai antifungi dan bahan immunosupresif (Borel *et al.*, 1976; Petrini *et al.*, 1992). Senyawa antibiotik **sefalosporin** yang mulanya dihasilkan oleh suatu strain *Cephalosporium* dan *Emericellopsis* (*Acremonium*) selanjutnya juga ditemukan pada kapang endofit *Anixiopsis*, *Arachnomyces*, *Diheterospora*, *Paccilomyces*, *Scupulariopsis*, dan *Spirodium* (Morin dan Gorman, 1982 dalam Worang, 2003).

Kapang *Cryptosporiopsis quercina* yang diisolasi dari spesies *Tripterigeum wilfordii* mampu menghasilkan antifungi yang efektif pada beberapa fungi patogen pada manusia *Candida albicans* dan *Trycophyton* spp, antifungi yang dihasilkan berupa **Cryptocandin**. Cryptocandin ternyata juga efektif pada sejumlah fungi patogen tumbuhan *Sclerotinia sclerotirum* dan *Botrytis cinerea* (Strobel *et al.*, 1999). **Encomycin** diproduksi oleh *Pseudomonas viridiflava* yang diisolasi dari daun rumput. Encomycin efektif menghambat fungi patogen manusia *Cryptococcus neoformans* dan *Candida albicans* (Miller *et al.*, 1998). Antifungi **Pseudomycons** yang dihasilkan kapang endofit *Pseudomonas* mempunyai aktivitas penghambatan terhadap fungi patogen manusia dan tumbuhan, *Candida albicans*, *Candida neoformans* dan *Cerotocystis ulmi* serta *Mycospaerella fijiensis* (patogen pada pisang) (Strobel and Daisy, 2003). Antibakteri **Phomopsichalasin** metabolit sekunder pada endofit *Phomopsis* sp mempunyai aktivitas antibakteri pada *disk diffusion assay* dengan konsentrasi 4 µg/disk mampu menghambat *Bacillus subtilis* (12 mm zona penghambatan), *Salmonella enterica* (11 mm zone penghambatan), dan *Staphylococcus aureus* (8 mm zona penghambatan) (Horn *et al.*, 1995 *in* Strobel and Daisy, 2003). Antibakteri **Mumubicins** yang dihasilkan oleh *Streptomyces* strain NRRL 30562 kapang endofit pada *Kennedia nigriscans*, mempunyai aktivitas penghambatan terhadap bakteri Gram-positif seperti *Bacillus anthracis* dan *multidrug resistance Mycobacterium tuberculosis* (Castillo *et al.*, 2002). Endofit *Streptomyces* NRRL 30566 yang diisolasi dari *Grevellia pteridifolia* yang tumbuh di Australia mampu menghasilkan antibakteri **Kakadomycins** yang efektif menghambat bakteri Gram-negatif (Castillo *et al.*, 2003).

Coronamycins merupakan kompleks antibiotik peptida yang efektif menghambat fungsi patogen tumbuhan dan *Cryptococcus neoformans* fungi patogen pada manusia. Senyawa antibiotik ini dihasilkan oleh *Streptomyces* sp endofit pada epifit *Monstera* sp yang hidup di hutan Amazon. Antibiotik ini juga aktif melawan parasit malaria *Plasmodium falciparum* dengan IC₅₀ 9,0 ng ml⁻¹ (Ezra *et al.*, 2004b).

2.) Komponen antivirus

Kapang endofit *Cytospora* sp mampu menghasilkan *Cytomegalo-Virus Protease Inhibitor* **Cytonic acids A** dan **Cytonic acid B** sebagai agen antivirus (Guo *et al.*, 1999 in Strobel and Daisy, 2003).

3.) Volatile antibiotic

Muscudor albus, merupakan kapang endofit asli yang diisolasi dari *Cinnamomum zeylanicum*, mampu menghasilkan campuran komponen organik menguap (VOCs). Antibiotik ini memiliki aktivitas antimikrobia luas (*broad-spectrum antibiotic*). Isolat ini kemungkinan juga dapat ditemukan pada *Grevillia pterifolia*, *Kennedia nigricans*, *Termenalia prostata* yang tumbuh di Australia bagian utara (Strobel *et al.*, 2001,2004; Stierle *et al.*, 2003; Ezra *et al.*, 2004a).

4.) Antikanker

Beberapa tahun terakhir ini telah ditemukan isolat kapang endofit *Taxomyces andreanae* yang diisolasi dari *Taxus brevifolia*. Kapang endofit

ini mampu menghasilkan senyawa **paclitaxel** (taxol) sebagai antikanker (Stierle *et al.*, 1995; Strobel *et al.*, 1996 and Yang *et al.*, 1994).

5.) Antioksidan

Isopestasin merupakan antioksidan yang dihasilkan oleh kapang endofit *Pseudomonas microspora* yang diisolasi dari *Termenalia morobensis* yang tumbuh di Papua New Guinea (Strobel *et al.*, 2002).

6.) Insektisida

Bioinsektisida dapat diisolasi dari endofit *Nodulsporium* sp dari tanaman *Bontia daphnoides*. Toksin terhadap insekta telah dapat diisolasi dari kapang endofit *Gaultheria procumbens* (Findlay *et al.*, 1997). Insektisida lainnya adalah **Naphtalene** yang dihasilkan kapang endofit *Muscudor vitigenus* diisolasi dari tanaman liana *Paullinia paullinioides* (Daisy *et al.*, 2002 in Strobel and Daisy, 2003).

2. Antibiotik

Antibiotik merupakan substansi kimia alamiah hasil metabolisme sekunder mikroorganisme yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan maupun membunuh mikroorganisme lain (Brock, 1970; Madigan *et al.*, 2000; Worang, 2003). Berdasarkan sifat toksisitas selektif antibiotik dibagi menjadi dua, yaitu antibiotik dengan aktivitas bakteriostatik (antibiotik yang bersifat menghambat pertumbuhan mikroorganisme), dan antibiotik dengan aktivitas bakterisida (antibiotik yang bersifat membunuh mikroorganisme) (Setyabudi dan Gan, 1995; Ganiswara, 1995). Berdasarkan sifat resistensinya atau menurut pola sensitifitas alamiahnya, antibiotik dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu antibiotik berspektrum luas (*broad-spectrum antibiotic*) dan antibiotik berspektrum

sempit (*narrow-spectrum antibiotic*). Senyawa antibiotik yang mempunyai spektrum sempit hanya dapat mempengaruhi satu kelompok mikroorganisme saja. Adapun antibiotik dengan spektrum luas merupakan senyawa yang efektif untuk melawan lebih dari satu kelompok mikroorganisme (Brock, 1970; Baley and Caylor, 1977; Madigan *et al.*, 2000).

a. Mekanisme Kerja Antibiotik

Menurut Ganiswara (1995); Williams *et al.* (1996) dan Brooks *et al.* (2001), mekanisme kerja antibiotik antara lain:

1.) Menghambat sintesis dinding sel bakteri

Antibiotik akan menghambat reaksi sintesis dinding sel dengan jalan menghambat aktivitas enzim dan merusak fungsi ikatan silang antara dua peptida pada rantai polisakarida. Penghambatan sintesis dinding sel sering diikuti dengan lisisnya sel karena enzim autolitik. Antibiotik yang termasuk dalam jenis ini adalah penisilin, sefalosporin, basitrasin, sikloserin, dan vankomisin.

2.) Mengganggu permeabilitas membran sel bakteri

Antibiotik ini dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipida membran sel mikroorganisme, sehingga membran sel akan kehilangan sifat permeabilitasnya. Antibiotik yang termasuk dalam jenis ini, antara lain polimiksin, tiazole, polienes, imidazol, kolistin, amphoterasin B.

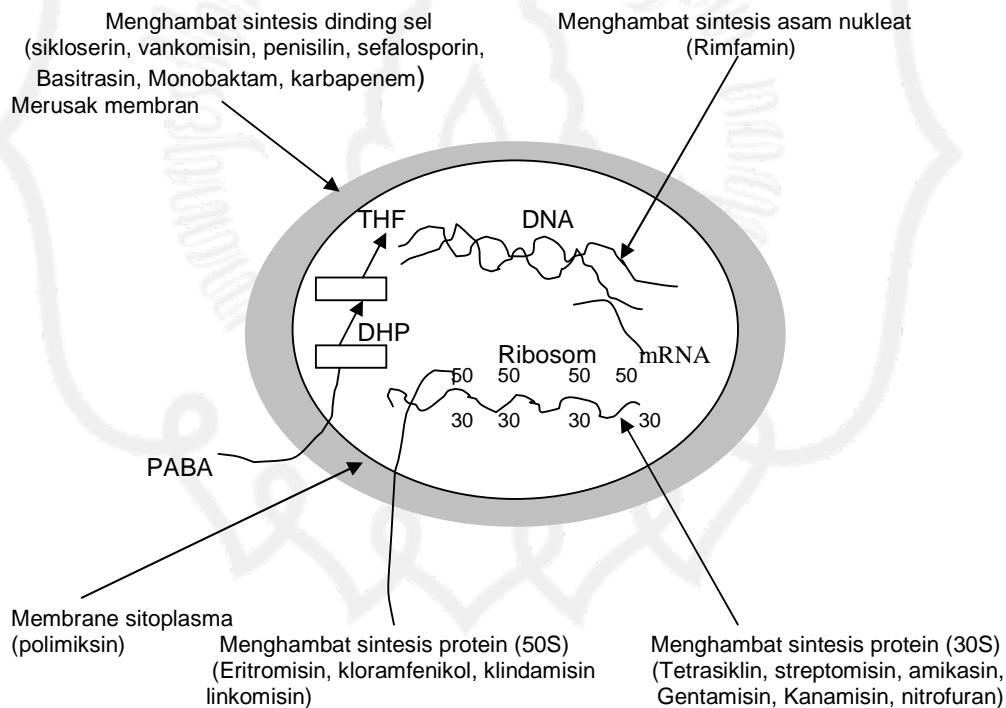
3.) Menghambat sintesis protein

Penghambatan sintesis protein terjadi dengan kerusakan terhadap fungsi ribosom atau subpartikelnya oleh antibiotik. Antibiotik akan berikatan dengan

salah satu sub unit ribosom bakteri (30S dan 50S) dan sub unit ribosom yang berikatan dengan antibiotic tersebut fungsinya akan rusak, sehingga proses translasi akan terhambat.

4.) Menghambat sintesis asam nukleat

Penghambatan model ini terjadi dengan cara mengganggu pembentukan purin dan pirimidin, serta mengubah fungsi enzim DNA polimerase. Hal ini mengakibatkan tidak normalnya proses replikasi DNA dan transkripsi. Antibiotik yang termasuk jenis ini adalah quinolon, pyrimethamin, rifamin, sulfonamida, trimethoprin dan trimetrexate.



Gambar 1. Mekanisme kerja antibiotik (Tortora *et al.*, 1995).

b. Uji Aktivitas Antibiotik

Uji aktivitas antimikrobia merupakan uji kepekaan antibiotik atau bahan antimikroba terhadap mikroorganisme patogen (Lay *et al.*, 1994). Menurut Pelczar dan Chan (1988), Lay (1994) metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibiotik secara *in vitro* ada dua macam, yaitu:

1.) Metode Difusi (*Diffusion Method*)

Penentuan aktivitas antibiotik dengan metode difusi dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu cara cakram, cara silinder dan cara sumuran. Suatu cakram kertas (*paper disk*), cawan berliang renik (cara sumuran) dan suatu silinder tidak beralas yang mengandung antibiotik dalam jumlah tertentu di tempatkan di medium padat yang telah diinokulasi dengan mikroba uji. Penghambatan pertumbuhan akan terlihat sebagai zona jernih (*clear zone*) di sekitar *reservoir* setelah diinkubasi selama 18-24 jam. Jadi penentuan aktivitas antibiotik dengan metode difusi adalah berdasarkan besarnya zona hambat. Menurut Henida (1999), zona hambat dapat dinyatakan dalam tiga kategori, yaitu zona hambat total (apabila zona hambat yang terbentuk terlihat jelas), zona hambat partial (apabila zona hambat yang terbentuk kurang jelas atau masih terlihat adanya pertumbuhan beberapa koloni mikroorganisme uji) dan zona hambat nol (apabila tidak ada zona hambat yang terbentuk).

2.) *Tube Dillution Method* (Metode Pengenceran Tabung)

Aktivitas antibiotik diukur dengan menentukan konsentrasi terendah yang masih mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme, atau sering disebut *Minimum Inhibitory Consentration* (MIC). Dalam uji ini diperlukan suspensi mikroorganisme uji yang dimasukkan dalam tabung yang mengandung medium dengan konsentrasi antibiotik mulai dari yang terendah

sampai yang tertinggi. Cara ini sering disebut juga metode pengenceran tabung (*Tube Dillution Method*).

c. Isolasi Antibiotik

Menurut Madigan *et al.* (2000), hal yang perlu diperhatikan dalam memproduksi antibiotik dari jamur benang antara lain, media harus mengandung nutrisi yang dibutuhkan oleh jamur benang. Kondisi optimum untuk akumulasi, ekstraksi dan purifikasi/pemurnian penisilin yaitu medium yang dibutuhkan harus mengandung:

- a. Sumber karbon: laktosa merupakan sumber karbon yang baik untuk produksi penisilin pada konsentrasi 6%. Sebagai pengganti laktosa dapat menggunakan maizena atau glukosa.
- b. Sumber nitrogen: beberapa senyawa yang dapat dijadikan sumber nitrogen antara lain sodium nitrat, amonium sulfat, amonium asetat, dan amonium laktat serta *corn-steep liquor*.
- c. Sumber mineral, berupa elemen potassium, fosfor, magnesium sulfat, dan zink mempunyai peran penting dalam produksi penisilin, yang di antaranya banyak ditemukan dalam *corn-steep liquor*.
- d. *Corn-steep liquor*: menggunakan *corn-steep liquor* dalam fermentasi ini dapat meningkatkan hasil dalam produksi penisilin. *Corn-steep liquor* diperoleh dari proses pembuatan tepung jagung dan produk lainnya. Larutan ini mengandung asam laktat, nitrogen, amino nitrogen, gula reduksi, arginin, histidin, asam glutamat, fenilalanin, dan turunan asam laktat.
- e. Prekursor merupakan substansi yang digunakan untuk meningkatkan produk antibiotik, contohnya *corn-steep liquor*.

3. Bakteri Uji

Suatu zat antibiotik/antimikroba mempunyai kemampuan penghambatan terhadap beberapa mikroorganisme tertentu. Beberapa bakteri yang biasa digunakan sebagai mikroorganisme uji adalah *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus (viridans group)*, *Bacillus anthracis*, dan *Bacillus subtilis* yang merupakan kelompok bakteri Gram-positif. Adapun kelompok bakteri Gram-negatif, antara lain: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, dan *Shigella* (Goodman and Gilman, 1975).

a. Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri Gram-negatif, bentuk selnya pendek bervariasi dari bentuk kokus sampai batang pendek; ukurannya 0,5 x 1,0-3,0 µm; motil atau tidak motil. Pada strain yang motil memiliki flagel peritrikus; pada umumnya tidak berkapsula, tidak membentuk spora; aerobik dan anaerobik fakultatif; termasuk dalam ordo Enterobacteriaceae (Holt *et al.*, 1994).

Escherichia coli dapat tumbuh hampir di semua media pada suhu kamar. Bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 15 °C-45 °C dengan suhu optimum 30 °C-37 °C, dan pH optimum pertumbuhan pada 7,0-7,5. sebagian besar tumbuh dengan koloni yang dapat memfermentasi laktosa menjadi asam (Fardiaz, 1993).

Escherichia coli merupakan bakteri oportunistis yang banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal. Bakteri ini biasanya mengkontaminasi alat-alat dan tempat persiapan makanan. *E. coli* mempunyai

masa inkubasi 1-3 hari. *E. coli* kadang-kadang dapat menyebabkan infeksi pada sistem pencernaan. Penyakit yang ditimbulkan, antara lain gastroenteritis, demam enterik dengan gejala yang menonjol adalah diare. Penyakit lain yang disebabkan *E. coli* di luar usus adalah infeksi saluran kemih, pneumonia, meningitis, dan infeksi luka terutama bila di dalam abdomen (Syahrurachman, 1993).

b. Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus termasuk bakteri Gram positif, berbentuk coccus, dengan diameter 0,8-1,0 μm , biasanya ditemukan sebagai sel tunggal atau berpasangan, tersusun berkelompok seperti buah anggur, tidak bergerak, tidak membentuk kapsul dan spora. *S. aureus* tumbuh baik dalam medium cair pada suhu 37 °C, kisaran suhu pertumbuhannya 15 °C-40 °C, pertumbuhan yang baik dan khas adalah pada suasana aerob. Bakteri juga bersifat fakultatif anaerob dengan pH optimum pertumbuhan 7,4. Bakteri *S. aureus* patogen bersifat invasif, penyebab hemolisis, membentuk enzim koagolase, mencairkan gelatin, dan memfermentasi manitol (Syahrurachman, 1993).

Koloni *S. aureus* tumbuh cepat pada media agar dengan suhu normal dan bergaris tengah 1-2 mm setelah diinkubasi 24 jam. Koloni berbentuk halus, basah, menonjol dengan tepi bulat, berwarna putih, kuning, hingga kuning keemasan (Syahrurachman, 1993; Fardiaz, 1993).

S. aureus mampu membentuk toksin penyebab keracunan makanan. Pada manusia, toksin yang dihasilkan berupa leukosidin yang dapat menyebabkan gastroenteritis dengan gejala mual, muntah, dan diare. Infeksi yang ditimbulkannya menyebabkan penyakit dengan tanda yang khas berupa nekrosis

(Syahrurachman, 1993). Pada umumnya, penyakit yang disebabkan *S. aureus* yaitu jerawat kecil, bisul, borok, gatal-gatal, dan infeksi luka operasi (Henida, 1999). *S. aureus* juga dapat menyebabkan terjadinya endokarditis, meningitis, pneumonia, dan osteomyelitis (Syahrurachman, 1993).

4. Taman Nasional Gunung Halimun (TNGH)

Taman Nasional Gunung Halimun (TNGH) memiliki luas 40.000 Ha, merupakan hutan yang memiliki bentangan kawasan yang sangat khas, dengan keragaman flora dan fauna serta kekayaan sosial budaya yang sangat melimpah (Kahono dan Arif, 2002). Taman Nasional Gunung Halimun ini mempunyai ketinggian yang bervariasi mulai dari 500 mdpl di sebelah utara Taman Nasional, sampai dengan 1.929 mdpl di puncak Gunung Halimun utara. Pembagian zonasi di TNGH menjadi tiga daerah, yaitu *Coline zone* pada ketinggian 500-1000 mdpl, sedangkan pada *sub montane zone* berada pada ketinggian 1000-1500 mdpl, serta *montane zone* yang menempati ketinggian di atas 1500 mdpl. Rata-rata curah hujan di TNGH adalah 5.948 mm pertahun, dengan rata-rata suhu berkisar antara 18,3 °C-23,4 °C. Variasi suhu harian berkisar antara 24,7 °C-26,5 °C (Djuwarsah, 1997; Kahono dan Amir, 2002).

Tidak kurang dari 700 jenis tumbuhan berbunga yang terdiri dari 391 marga dan 119 suku menghuni kawasan TNGH (Kahono dan Amir, 2002). Lebih dari 300 jenis tumbuhan tinggi di antaranya berperan sebagai sumber plasma nutfah penting, misalnya, *Altingia exelsa*, *Schima wallichii*, dan *Dipterocarpus hasseltii*. Lebih dari 100 jenis tumbuhan hutan dimanfaatkan untuk obat tradisional, upacara adat, bahan bangunan dan manfaat penting lainnya oleh masyarakat di sekitar kawasan TNGH termasuk suku Baduy (Harada dkk., 2002 dalam Kahono

dan Amir, 2002). Banyak jenis flora dan fauna dikategorikan sebagai biota langka dan endemik yang potensial dimanfaatkan dan dikembangkan (Kahono dan Amir, 2002).

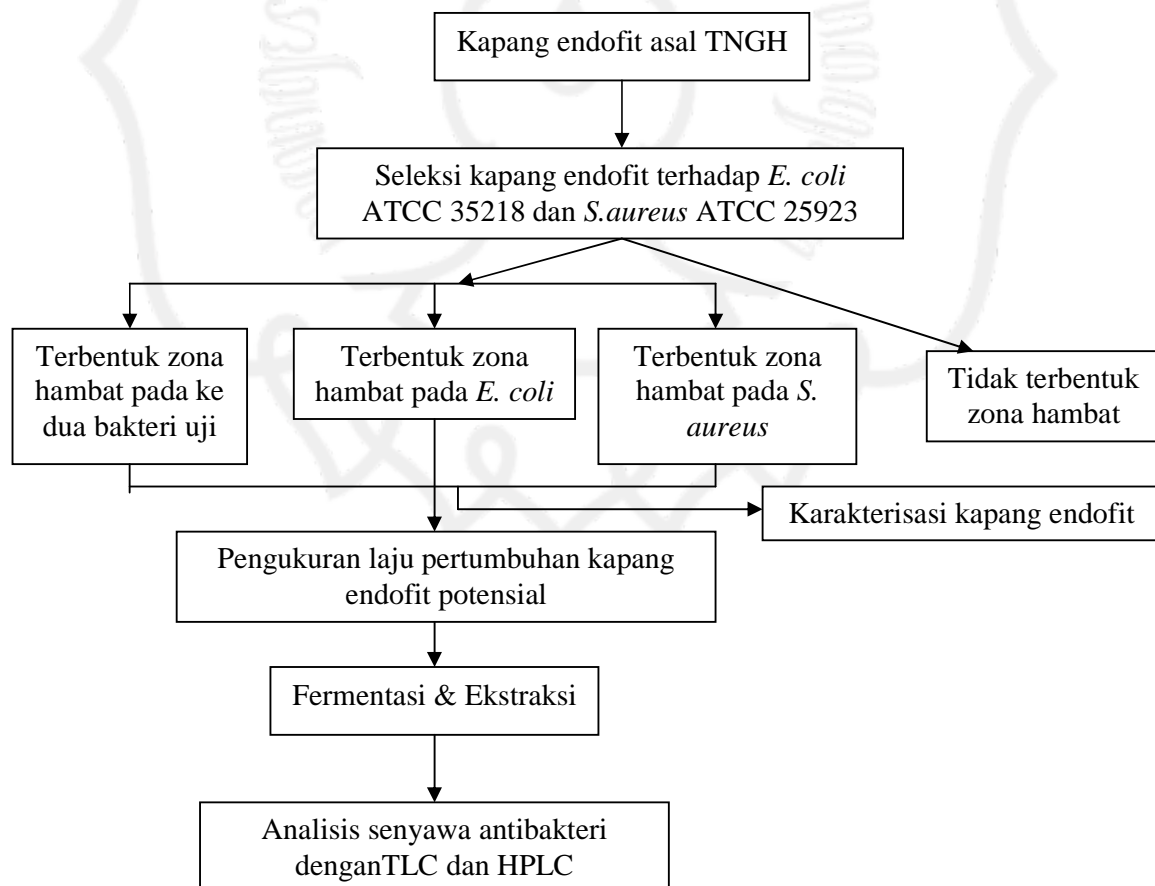
Selain dihuni berbagai jenis flora dan fauna yang sangat beragam, kawasan TNGH juga dihuni berbagai jenis mikroorganisme yang sangat melimpah. Berbagai jenis mikroorganisme ini sangat berpotensi, tetapi belum banyak dimanfaatkan untuk kesejahteraan masyarakat (Kahono dan Amir, 2002), sehingga selain berfungsi sebagai daerah konservasi keanekaragaman flora dan fauna, sebagai pengatur iklim mikro, tata air dan penunjang pariwisata alam, TNGH juga berperan sebagai tempat pendidikan dan tempat penelitian (Djuwarsah, 1997).

B. Kerangka Pemikiran

Permasalahan penyakit infeksi oleh mikroorganisme patogen merupakan hal yang pernah dialami oleh setiap manusia. Cara yang sering digunakan untuk mengatasi masalah ini adalah dengan terapi antibiotik. Penggunaan antibiotik ternyata dapat menyebabkan mikroorganisme patogen resisten, karena mikroorganisme tersebut memiliki suatu mekanisme untuk mempertahankan diri dari senyawa antibiotik. Untuk mengatasi hal tersebut, maka perlu adanya usaha penelitian/pencarian senyawa antibiotik alami baru yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen tersebut, dengan cara mengeksploitasi dunia mikroorganisme. Salah satu mikroorganisme yang sedang banyak dibicarakan sekarang ini adalah mikrofungi/kapang endofit.

Kapang endofit) ini ternyata mampu menghasilkan berbagai senyawa metabolit sekunder, misalnya antibiotik, antikanker, enzim, mikotoksin, insektisida yang kemungkinan besar dapat digunakan untuk kesejahteraan manusia.

Penelitian ini difokuskan pada seleksi kapang endofit sebanyak 29 isolat yang diisolasi dari 9 jenis tumbuhan berkhasiat obat di area Taman Nasional Gunung Halimun (TNGH). Isolasi kapang endofit ini telah dilakukan oleh Staf Peneliti Bioteknologi LIPI Cibinong-Bogor. Kapang endofit ini akan diujikan pada mikroba uji *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Kemampuan kapang endofit untuk menghasilkan senyawa antibakteri dapat diketahui dengan adanya zona jernih di sekitar kapang endofit. Analisis senyawa antibakteri yang dihasilkan kapang endofit dilakukan dengan metode pemisahan TLC, kromatografi kolom dan HPLC. Untuk bagan kerangka pemikiran ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 2. Bagan Alur Kerangka Pemikiran**BAB III****METODE PENELITIAN****A. Waktu dan Tempat**

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Juni-Oktober 2005, di Laboratorium Fermentasi, Bidang Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong-Bogor.

B. Alat dan Bahan**1. Alat**

Alat-alat yang digunakan meliputi: *Autoclave*, *Incubator Shaker*, pH-meter, Timbangan analitik/Ohaus, Spektrofotometer UV-Vis, *Chamber*, *Vortex*, Sinar UV (254 nm dan 365 nm), *Water bath*, Oven pengering, Lemari pendingin, Mikroskop Nikon FX-35DX, Mikropipet, Pelat TLC, Kertas saring Whatmann no. 42, *Laminar air flow*, Kuvet, Mikrohematokrit, Labu pemisah, Millipore, Syringe, Cawan petri, Erlenmeyer 100 ml dan 500 ml, Tabung reaksi, Gelas ukur, Gelas beker, Lampu pemanas (*Bunsen*), jarum ose, dan seperangkat instrumen HPLC dll.

2. Bahan

- a. Mikroorganisme yang digunakan untuk menguji dalam penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- b. Mikroorganisme yang diuji sebanyak 29 Isolat kapang endofit hasil isolasi dari 9 jenis tumbuhan berkhasiat obat di Taman Nasional Gunung Halimun (TNGH) yang merupakan koleksi Puslit Bioteknologi LIPI Cibinong-Bogor.
- c. Media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan penambahan air rendaman jagung (Hadioetomo, 1993; Madigan *et al.*, 2000), untuk pemeliharaan kapang endofit. (komposisi dan proses pembuatannya pada lampiran 1).
- d. Media *Potato Dextrose Broth* (PDB) (Hadioetomo, 1993; Madigan *et al.*, 2000), untuk fermentasi produksi senyawa antibakteri. (komposisi dan proses pembuatannya pada lampiran 1).
- e. Media *Nutrient Agar* (NA) (Hadioetomo, 1993; Madigan *et al.*, 2000), medium untuk pemeliharaan bakteri uji. (komposisi dan proses pembuatannya pada lampiran 1).

- f. Kloroform teknis, Kloroform p.a., Methanol p.a., Alkohol 75% dan 96% , Aquades, Cat Gram, *Phenol-red*, Laktofenol, air rendaman jagung (*Corn-steep Liquor*), kloramfenikol dan ampisilin.

C. Cara kerja

1. Persiapan alat

Semua peralatan seperti cawan petri, tabung reaksi, ampul dicuci bersih, kemudian disterilisasi menggunakan oven (sterilisasi kering) pada suhu 160⁰C, selama 2 jam.

2. Peremajaan kultur murni kapang endofit

Isolat kapang endofit diremajakan atau disegarkan di medium PDA miring sebagai kultur stok dan pada medium PDA dalam cawan petri sebagai isolat kultur untuk uji, lalu diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar.

3. Seleksi kapang endofit terhadap bakteri uji

Pada tahap ini dilakukan pengujian dengan metode difusi agar padat (*Diffusion Agar Plate Method*), untuk mengetahui kapang endofit yang mampu menghasilkan senyawa antibakteri. Nutrien Agar tegak sebanyak 15 ml pada tabung reaksi dicairkan dalam penangas air. Setelah itu didinginkan sampai temperatur sekitar 40 °C atau hangat-hangat kuku. Biakan murni bakteri uji umur 24 jam, dilarutkan dengan 5 ml aquades steril, kemudian dipipet 1ml dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Medium NA yang sudah agak dingin dituangkan ke dalam cawan petri steril yang sudah diinokulasi dengan bakteri uji secara aseptis, dihomogenkan dengan cara digoyang secara perlahan-lahan dengan lintasan angka 8. Setelah medium menjadi padat dan

dingin, biakan murni kapang endofit yang telah diremajakan di medium PDA dalam cawan petri (umur 7 hari) diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi bakteri uji. Inokulan kapang endofit berukuran ± 6 mm yang dibentuk dengan menggunakan batang ampul. Inkubasi dilakukan selama 2-3 hari pada suhu ruang (± 37 °C). Terbentuknya zona jernih di sekitar kapang endofit, dapat diduga bahwa kapang endofit tersebut menghasilkan senyawa antibakteri (Strobel *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2002). Kemudian diameter zona hambat diukur.

4. Pengukuran laju pertumbuhan kapang endofit potensial

Kapang endofit yang positif menghasilkan senyawa antibakteri, ditumbuhkan dalam 100 ml medium PDB, kemudian diinkubasi selama 7 hari pada *inkubator shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar. Setiap 24 jam dilakukan pengambilan sampel sebanyak 1 ml untuk menghitung jumlah sel yang hidup dengan metode pengenceran. Sebelumnya disiapkan medium PDA dalam cawan petri steril. Kemudian sebanyak 0,1 ml dari sample yang telah diencerkan dipipet pada permukaan agar tersebut. Sebuah batang gelas melengkung (*Hockey stick*) dicelupkan ke dalam alkohol 75 % dan dipijarkan sehingga alkohol habis terbakar. Setelah dingin, batang gelas tersebut digunakan untuk meratakan sample yang ditumbuhkan pada media PDA dalam cawan petri tersebut. Kemudian diinkubasi di dalam *incubator* dengan suhu 35 °C. Setiap hari dilakukan penghitungan sel yang tumbuh sampai membentuk koloni yang sudah tidak bisa dihitung lagi. Cara ini sekaligus dapat mengetahui pola pertumbuhan kapang. Pengukuran pH dilakukan pada awal dan akhir fermentasi.

Faktor pengenceran = pengenceran x 0,1 ml

Jumlah koloni = Jml koloni per cawan x 1/ faktor pengenceran

5. Fermentasi dan isolasi senyawa antibakteri

Kapang endofit yang positif menghasilkan zona penghambatan dilarutkan dengan 5 ml aquades steril. Tiga persen cairan spora/misellium kapang endofit tersebut diinokulasikan pada 300 ml PDB dan diinkubasi selama 5 hari dalam *inkubator shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar (Castillo *et al.*, 2002; Simanjutak, dkk., 2002).

Isolasi dilakukan dengan mengekstraksi 300 ml kultur kapang endofit hasil fermentasi dengan kloroform (1:1) sebanyak tiga kali. Ekstraksi pertama, 300 ml kultur cair fungi endofit ditambahkan dengan 150 ml kloroform, diekstraksi dengan labu pemisah, diinkubasi selama beberapa waktu (45-60 menit) hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan bawah jernih merupakan fase kloroform dengan metabolit sekunder dan lapisan atas merupakan fase medium terekstrak bersama pelarut. Kemudian sisa medium (lapisan atas) diekstrak kembali dengan 100 ml kloroform (ekstraksi kedua), kemudian ekstraksi terakhir dengan kloroform 50 ml, cara ekstraksi yang ke dua dan ke tiga sama dengan cara ekstraksi yang pertama. Masing-masing filtrat yang terbentuk dipisahkan dan dikeringkan. Ekstrak kering selanjutnya digunakan untuk uji TLC dan HPLC (Simanjutak, dkk. 2002).

6. Analisis senyawa antibakteri melalui *Thin Layer Chromatography* (TLC)

Analisis senyawa antibakteri dilakukan melalui pemisahan menggunakan metode TLC. Filtrat yang terdiri dari campuran kloroform dan senyawa metabolit sekunder yang telah kering/pekat dilarutkan dengan kloroform, sedangkan fase medium dan air yang telah kering/pekat pada *waterbath* dilarutkan dengan metanol. Masing-masing ekstrak ditotolkan pada pelat silika Gel G F254 TLC dengan menggunakan mikrohematokrit, dan dibandingkan dengan senyawa antibiotik standar. Setelah totolan kering, pelat dimasukkan dalam botol *Chamber* yang telah diisi 8 ml eluen kloroform:metanol yang

telah dijenuhkan 60-90 menit. Setelah eluen merambat sampai batas yang telah ditentukan, yaitu sekitar 5 cm pelat diambil dan dikeringanginkan (Stahl, 1969).

Untuk karakterisasi antibiotik, setelah pelat kering kemudian dilihat di bawah UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Kemudian disemprot dengan *Cerium Sulfat* untuk lebih jelas melihat adanya spot-spot pada pelat silika (Stahl, 1969).

7. Kromatografi kolom

Sebelum analisis menggunakan HPLC, masing-masing ekstrak fase kloroform dan fase air difraksinasi dengan kromatografi kolom untuk memurnikan senyawa. Kolom yang telah diisi dengan silika gel 60, dibasahi dengan eluen (kloroform : methanol) hingga sempurna (menetes). Sampel sebanyak 1-2 ml dimasukkan dengan cara meneteskan kedalam kolom. Untuk sampel yang kental diencerkan terlebih dahulu. Setelah sampel meresap ke dalam silika gel 60, kolom ditambahkan dengan eluen. Pada bagian bawah kolom diletakkan botol penampung yang telah diberi label: no. 1-10 (jika masing-masing menampung 2 ml) dan no. 1-20 (jika masing-masing menampung 1ml). Penampungan fraksi dilakukan sampai warna benar-benar jernih baru dihentikan. Masing-masing fraksi hasil kolom diuapkan hingga mengental. Kemudian kembali dilakukan uji TLC untuk mendapatkan senyawa yang terpisah sempurna (noda tidak tumpang tindih), lalu dihitung nilai Rf dan dibandingkan dengan standar.

Cara penghitungan nilai Rf adalah sebagai berikut (Stahl, 1969):

$$R_f = \frac{\text{Jarak noda/ spot} - \text{titik awal}}{\text{Jarak start-finish}}$$

8. Analisis senyawa antibakteri dengan metode HPLC

Sebelum melakukan analisis HPLC, semua fraksi sampel hasil kolom dan antibiotik standar diukur panjang gelombangnya berdasarkan absorbansi maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Untuk preparasi analisis HPLC, disiapkan eluen Kloroform : Methanol (2:4), kemudian dijenuhkan/disaring dengan mesin saringan HPLC model DOA-V130-BN dan Millipore *Type HA* 0,45 μM . Semua fraksi sampel dan standar antibiotik disaring dengan Millipore *Type HA* 0,45 μM . Sampel ekstrak masing-masing diinjeksikan sebanyak 20 μl kemudian di *running*, tetapi sebelumnya injeksikan larutan standar (antibiotik Kloramfenikol dan Ampisillin).

Adapun kondisi alat HPLC adalah sebagai berikut:

Pompa	: Jasco, PU-980 intelligen HPLC
Detekto	: Jasco, UV-970 MD-910 Multiwave leght intelligen UV/Vis
Pencetak	: Jasco, 807-IT Integrator
Kolom	: μ Bondapak C18 TM (3,9 x 300 mm waters) Part No. WAT027324, made in Ireland
Suhu kolom	: Suhu ruang
Fase gerak	: Kloroform : Methanol (2:4)
Laju alir	: 1ml/menit
Panjang gelombang	: 319 nm
Tekanan	: 71-79 kg/cm ²
Volume injeksi :	
Contoh	: 20 μl
Standar	: 20 μl
Sistem	: Isokratik

9. Karakterisasi kapang endofit

Karakterisasi ini dilakukan pada kapang endofit yang positif menghasilkan zona penghambatan, dengan cara mengamati morfologi kapang pada medium PDA dan pengamatan secara mikroskopis di bawah mikroskop. Satu ose fungi diinokulasikan pada medium PDA secara aseptis kemudian diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang. Setelah fungi tumbuh, dilakukan pengamatan morfologi terhadap bentuk dan warnanya. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan cara membuat preparat, yaitu kapang pada medium PDA diambil dan diletakkan di atas gelas benda yang telah ditetesi dengan aquades/laktofenol 1-2 tetes, kemudian ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x, kemudian difoto.

D. Analisis Data

Analisis data dilakukan pada kapang endofit yang positif menghasilkan senyawa aktif (ditandai dengan zona penghambatan) dan analisis senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh kapang endofit dengan cara ekstraksi dan pemisahan menggunakan metode TLC dan HPLC.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Seleksi dan Uji Kapang Endofit terhadap Bakteri Uji

Seleksi kapang endofit bertujuan untuk memperoleh kapang endofit yang mampu menghasilkan senyawa antibakteri terhadap bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Adapun metode yang digunakan adalah metode Difusi Agar Padat (*Diffusion Agar Plate Methode*). Kapang endofit yang positif menghambat pertumbuhan bakteri uji akan membentuk sebuah zona bening di sekitar kapang endofit tersebut, zona jernih yang terbentuk menunjukkan adanya antibiotik yang dihasilkan oleh kapang endofit untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji.

Isolat kapang endofit yang digunakan dalam penelitian ini merupakan koleksi Puslit Bioteknologi LIPI Cibinong-Bogor. Dalam penelitian ini dipilih kapang endofit yang diisolasi dari 9 jenis tumbuhan berkhasiat obat (ada 29 isolat kapang endofit) yang tumbuh di area Taman Nasional Gunung Halimun (TNGH) (tabel 1).

Tabel 1. Sumber kapang endofit dari tumbuhan obat di area Taman Nasional Gunung Halimun (TNGH).

No.	Tumbuhan Obat	Nama Lokal	Khasiat Obat	Kode Isolat fungi endofit
1.	<i>G. macrophyllus</i> (BL)	Kisantung	Stomathic, rematik	HL.8F.30 – HL.8F.33
2.	<i>Saurauia pendula</i> (BL)	Kileho	Obat mata	HL.25F.112- HL.25F.116
3.	<i>Ardisia crispa</i> (Thumb) D.C	Kiajang	Obat eksim/alergi	HL.5F.18 – HL.5F.23
4.	<i>Ficus pandana</i>	Ficus	Obat Diare	HL.26F.117- HL.26F.118
5.	<i>Schima walichii</i>	Puspa	antimutagenik	HL.46F.209 -HL.46F.214

6.	<i>Michelia campaka</i>	Cempaka	Obat demam	HL.48F.217-HL.48F.221
7.	<i>Melastoma speciosa</i>	Harendong	Obat sakit perut	HL.53F.241- HL.53F.243
8.	<i>Magnolia candolii</i> (Hkeng)	Maja	Obat kudis, disentris	HL.57F.258 -HL.57F.261
9.	<i>Euodia crispa</i> (Thumb) D.C.	Kisampang	Obat care Hicting	HL.58F.265

Isolasi kapang endofit telah dilakukan oleh Staff peneliti Puslit Bioteknologi LIPI Cibinong-Bogor pada tahun 2003. Pengamatan morfologi dilakukan terhadap bentuk dan warna kapang endofit dan hasil pengamatan morfologi kapang endofit dapat dilihat pada lampiran 15.

Hasil seleksi 29 kapang endofit terhadap *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diperlihatkan pada tabel 2.

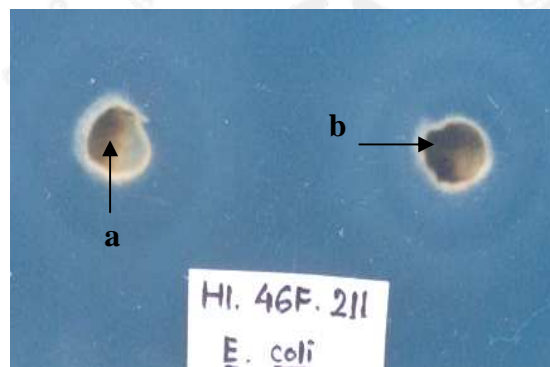
Tabel 2. Zona hambat dari kapang endofit terhadap *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 .

No	Kode isolat kapang endofit	Zona hambat terhadap	
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
1.	HL.5F.18	-	-
2.	HL.5F.19	-	-
3.	HL.5F.20	-	-
4.	HL.5F.21	-	-
5.	HL.5F.23	-	-
6.	HL.8F.30	-	-
7.	HL.8F.31	-	-
8.	HL.8F.32	-	-
9.	HL.8F.33	-	-
10.	HL.25F.112	-	-
11.	HL.25F.114	-	-
12.	HL.25F.115	-	-
13.	HL.25F.117	-	-
14.	HL.25F.118	-	-
15.	HL.46F.209	-	-
16.	HL.46F.210	-	-
17.	HL.46F.211	+++	-
18.	HL.46F.212	-	-
19.	HL.46F.213	-	-
20.	HL.48F.217	-	+
21.	HL.48F.218	-	-
22.	HL.48F.219	-	-
23.	HL.48F.221	-	-
24.	HL.53F.241	-	-
25.	HL.53F.243	-	+
26.	HL.57F.258	++	+++
27.	HL.57F.260	-	-
28.	HL.57F.261	-	-
29.	HL.57F.265	-	-

Keterangan : - : Tidak terbentuk zona jernih
+ : 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)

Dari 29 kapang endofit yang diseleksi, diperoleh 4 kapang endofit yang positif menghasilkan senyawa antibakteri yaitu kapang endofit HL.46F.211, HL.48F.217, HL.53F.243 dan HL.57F.258. Kapang endofit HL.46F.211 positif menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 35218 (tabel 2 dan gambar 3). Zona jernih yang terbentuk menunjukkan adanya antibiotik yang dihasilkan oleh fungi endofit HL.46F.211 yang mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 35218.

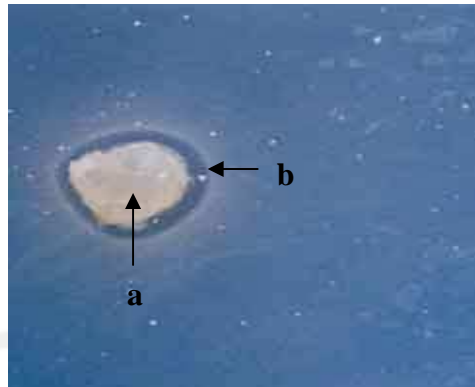
Gambar 3. Zona hambat kapang endofit HL.46F.211 terhadap



Escherichia coli ATCC 35218

- a. Zona jernih
- b. Kapang endofit HL.46F.211

Isolat kapang endofit HL.48F.217 dan HL.53F.243 mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (tabel 2 dan gambar 4 dan 5).



Gambar 4. Zona hambat kapang endofit HL.48F.217 terhadap *S. aureus* ATCC 25923
a. Kapang endofit HL.48F.217
b. Zona jernih



Gambar 5. Zona hambat kapang endofit HL.57F.243 terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
a. Kapang endofit HL.48F.217
b. Zona jernih

Sedangkan kapang endofit HL.57F.258 mampu menghambat pertumbuhan kedua bakteri uji yaitu terhadap *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus*

ATCC 25923 (tabel 2). Menurut Holler (1999) bila suatu senyawa dapat membentuk zona hambat $\geq 3,14 \text{ mm}^2$, maka senyawa tersebut dianggap positif menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji.

Zona hambat yang dibentuk oleh kapang endofit HL.46F.211 terhadap *Escherichia coli* ATCC 35218 dan kapang endofit HL.57F.258 terhadap *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 tidak begitu jelas (transparan), tetapi kedua kapang endofit ini positif menghambat bakteri uji, seperti yang diungkapkan oleh Henida (1999), bahwa zona hambat yang terbentuk dapat kurang jelas atau masih terlihat adanya pertumbuhan beberapa koloni mikroorganisme uji. Menurut Brooks *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 ini adalah dengan memproduksi enzim β -laktamase, enzim ini dapat memotong cincin β -laktam sehingga aktivitas antibiotik tersebut menjadi hilang. Dan 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.

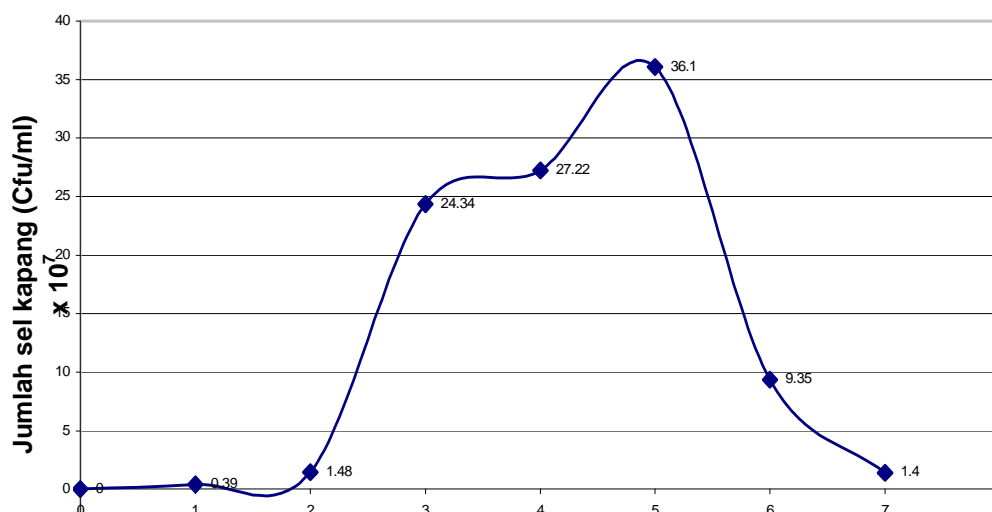
Dilihat dari aktivitas penghambatannya, senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh kapang endofit HL.57F.258 termasuk antibiotik yang berspektrum luas (*Broad-spectrum Antibiotic*), karena senyawa antibakteri yang dihasilkan mampu menghambat pertumbuhan kedua bakteri uji. Sedangkan senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh kapang endofit HL.46F.211, HL.48F.217 dan HL.53F.243 termasuk dalam kelompok antibiotik berspektrum sempit (*Narrow-spectrum Antibiotic*), karena senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh ketiga kapang endofit ini hanya mampu menghambat pertumbuhan

salah satu baktri uji, seperti yang di jelaskan oleh Tjay (2002) bahwa antibiotik dapat beraktivitas sempit (*Narrow-spectrum Antibiotic*), yaitu kelompok antibiotik yang aktif hanya pada beberapa bakteri tertentu, dan antibiotik dapat berspektrum luas (*Broad-spectrum Antibiotic*) yaitu, antibiotik yang aktif menghambat pertumbuhan baik bakteri Gram-positif maupun Gram-negatif.

2. Pengukuran Laju Pertumbuhan Kapang Endofit Potensial

Pengukuran laju pertumbuhan kapang endofit potensial ini bertujuan untuk mendapatkan waktu yang tepat saat pemanenan senyawa antibakteri (metabolit sekunder) pada proses fermentasi. Senyawa metabolit sekunder dibentuk pada saat akhir fase Logaritmik atau awal fase stasioner. Pada fase ini terjadi akumulasi senyawa metabolit sekunder pada medium fermentasi (Ingrahman, 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), sehingga pengukuran laju pertumbuhan sangat penting dilakukan untuk mengetahui waktu yang tepat melakukan *recovery*.

Adapun kapang endofit yang diukur laju pertumbuhannya adalah kapang endofit HL.46F.211 dan HL.57F.258. Hasil pengukuran laju pertumbuhan kapang endofit diperlihatkan pada gambar 6, 7 dan lampiran 17, 18.



Gambar 6. Grafik laju pertumbuhan kapang endofit HL.46F.211

Dari gambar 6 dapat diketahui bahwa, fase adaptasi dimulai pada hari ke-0 sampai hari ke-1. Pada fase ini terjadi penyesuaian diri kapang endofit pada lingkungan barunya. Fase ini belum terjadi pembelahan sel melainkan terjadi penambahan 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-3. Pada fase ini terjadi pembelahan sel secara cepat. Pertambahan jumlah sel mengikuti kurva logaritmik. Berakhirnya fase ini, kemudian diikuti fase pembiakan diperlambat (hari ke 3-5). Pada fase ini pembelahan sel mulai melambat, sehingga jumlah sel yang hidup hampir sama dengan jumlah 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 pertumbuhan kultur sel tertinggi seperti ditunjukkan pada gambar 12. 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 diharapkan saat itu senyawa metabolit sekunder yang terakumulasi juga mencapai maksimal (Simanjutak dkk, 2002). Setelah fase stasioner berakhir, kemudian diikuti fase kemunduran atau fase kematian. Fase ini dimulai pada hari ke-6 dan seterusnya. Pada fase ini jumlah sel yang mati lebih besar dari pada jumlah sel yang hidup.



Gambar 7. Grafik laju pertumbuhan kapang endofit HL.57F.258

Pada gambar 7, laju pertumbuhan kapang endofit HL.57F.258 dapat diketahui bahwa, pada hari ke-5 merupakan waktu yang tepat untuk memanen senyawa antibakteri pada proses fermentasi. Karena sel mencapai jumlah paling tinggi ($2,40 \times 10^8$ cfu/ ml).

Pengukuran pH juga dilakukan, pada awal dan akhir fermentasi. pH awal medium kultur kapang endofit HL.46F.211 adalah 5,63 kemudian terjadi kenaikan pH yaitu menjadi 7,19 (lampiran 17). Pada kultur kapang endofit HL.57F.258 juga terjadi kenaikan dari 5,67 menjadi 7,23 (lampiran 18). Peningkatan nilai pH terjadi karena senyawa asam yang terakumulasi dalam medium dimanfaatkan oleh sel sebagai sumber energi selama sporulasi (Benoit *et al.*, 1990 dalam Simanjatak dkk, 2002). Selain itu, kenaikan pH mungkin juga disebabkan karena terakumulasinya bahan-bahan alkali dalam medium (Simanjatak dkk, 2002). Menurut El-Sayed (1994) dalam usaha produksi penisillin membutuhkan perlakuan khusus berupa pH berkisar 5 sampai 7,5. Jadi Kenaikan pH fermentasi masih dalam batas kisaran yang cocok untuk pertumbuhan kapang endofit dan untuk produksi senyawa antibiotik.

3. Fermentasi dan ekstraksi kapang endofit HL.46F.211 dan HL.57F.258

Fermentasi ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder dari kedua kapang endofit. Senyawa metabolit sekunder diharapkan dapat dikeluarkan secara ekstraseluler ke dalam medium fermentasi. Senyawa aktif dapat dihasilkan secara optimal apabila faktor aerasi, suhu, pH medium dan ketersediaan nutrisi cukup untuk pertumbuhan kapang endofit selama proses fermentasi, dan bahan-bahan organik seperti karbon, nitrogen, dan mineral dibutuhkan oleh kapang endofit untuk biosintesis. Menurut Madigan *et al.* (2001) akumulasi pembentukan antibiotik penisillin terjadi secara optimum apabila medium mengandung sumber karbon, nitrogen, mineral dan prekursor. Sumber-sumber ini dapat diperoleh dari *Corn-steep liquor*.

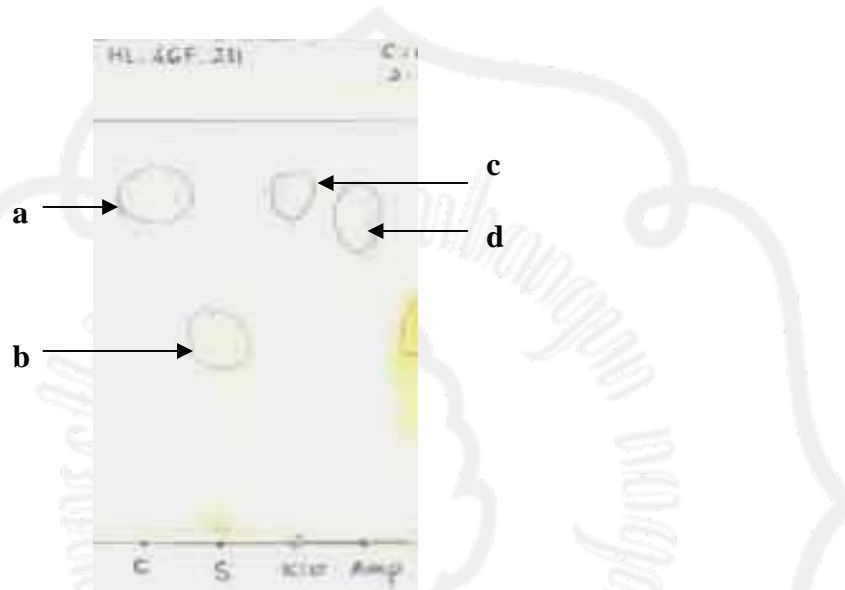
Isolasi senyawa antibakteri dengan cara ekstraksi dengan kloroform. Ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali agar senyawa aktif yang diinginkan terekstrak sempurna di dalam pelarut kloroform (Houghton & Raman, 1998 dalam Simanjatak dkk, 2002). Setiap kali ekstraksi dilakukan inkubasi dengan tujuan untuk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

4. Analisis Snyawa Antibakteri Melalui Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi merupakan metode pemisahan senyawa dalam suatu campuran berdasarkan berat molekulnya. Pencarian perbandingan eluen yang sesuai dilakukan untuk mendapatkan hasil yang optimal. Hasilnya diperoleh perbandingan eluen kloroform : methanol yang tepat adalah (4:2 dan 2:4). Sebagai antibiotik standar adalah kloramfenikol dan ampisillin.

Adapun hasil analisis TLC dari masing-masing ekstrak adalah sebagai berikut :

- A. Sampel : Ekstrak kapang endofit HL.46F.211
Eluen : Kloroform : Metanol (2:4)
Jumlah totolan : 8 kali
Standar antibiotik : Kloramfenikol dan Ampisillin



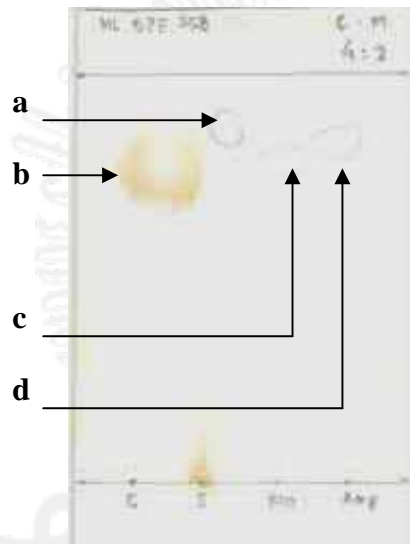
Gambar 8. Hasil TLC awal ekstrak kapang endofit HL.46F.211 pada silika gel F254.

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

Hasil uji TLC terhadap ekstrak fase kloroform (a) dan fase air (b) kapang endofit HL.46F.211 menunjukkan adanya identifikasi positif, yaitu seluruh contoh uji mempunyai kisaran nilai Rf yang mendekati Rf antibiotik standar. Ekstrak fase kloroform mempunyai nilai Rf yang mendekati dengan nilai Rf Kloramfenikol (0,84) dan Ampisillin (0,76), sedangkan 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 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. Dan setelah disemprot dengan penapak bercak CeSO_4 (*Cerium Sulfat*) warna noda yang terbentuk ungu.

- B. Sampel : Ekstrak kapang endofit HL.57F.258
Eluen : Kloroform : methanol (4 : 2)
Jumlah totalan : 8 kali
Standar antibiotik : Kloramfenikol dan Ampisilin



Gambar 9. Hasil uji TLC awal ekstrak kapang endofit HL.57F.258 pada silika gel F254
a. Spot ekstrak fase kloroform
b. Spot ekstrak fase air
c. Spot Kloramfenikol
d. Spot Ampisillin

Analisis TLC terhadap ekstrak fase kloroform dan fase air kapang endofit HL.57F.258 menunjukkan hasil positif, yaitu contoh uji mempunyai kisaran nilai R_f yang 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

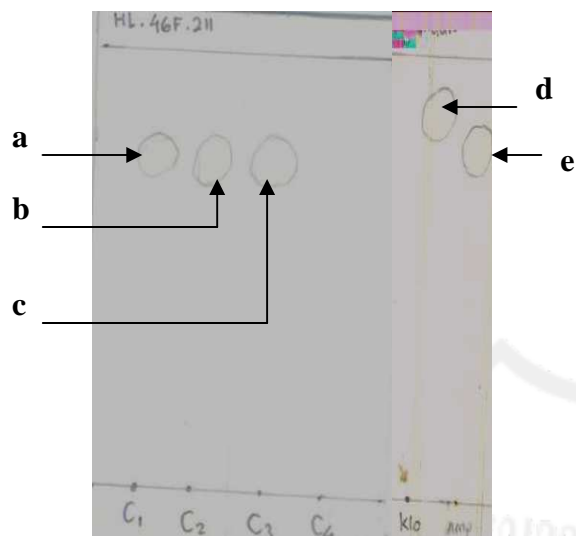
mengindikasikan bahwa senyawa metabolit sekunder pada ekstrak kapang endofit HL.57F.258 terlarut dalam kloroform, atau senyawa metabolit sekunder tersebut bersifat non polar.

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. Dan setelah dilakukan penyemprotan dengan penapak bercak CeSO_4 (*Cerium Sulfat*). warna noda/ spot yang terbentuk adalah ungu.

6. Kromatografi kolom

Kromatografi kolom ini bertujuan untuk memurnikan senyawa metabolit sekunder. Hasil kromatografi kolom ini berupa fraksi-fraksi (1-2 ml), Kemurnian senyawa antibiotik dapat diketahui dengan meninjeksikan masing-masing fraksi pada instrumen HPLC.

Setelah melalui kromatografi kolom, sampel ekstrak fase kloroform fungi endofit HL.46F.211 terbagi menjadi 4 fraksi. Hasil analisis TLC menunjukkan semua nilai R_f dari masing-masing fraksi sama, yaitu 0,74 dan setelah dibandingkan dengan antibiotik standar ternyata mempunyai kisaran nilai R_f yang mendekati R_f Ampisillin yaitu 0,76, sehingga diduga senyawa metabolit sekunder yang larut dalam fase kloroform adalah Ampisillin atau turunannya.



Gambar 10. Analisis TLC setelah kromatografi kolom ekstrak fase kloroform kapang endofit HL.46F.211 pada silika gel F254.

- Spot fraksi 1 fase kloroform (C1)
- Spot fraksi 2 fase kloroform (C2)
- Spot fraksi 3 fase kloroform (C3)
- Spot standar Kloramfenikol
- Spot standar Ampisillin

Untuk ekstrak fase air kapang endofit HL.46F.211 setelah melalui kromatografi kolom terbagi menjadi 15 fraksi. Hasil analisis TLC diperlihatkan gambar 11 dan tabel 3.

Tabel 3. Nilai Rf masing-masing fraksi dari kapang endofit HL.46F.211 yang larut dalam air

Hasil fraksinasi	Nilai Rf	Rf Kloramfenikol	Rf Ampisillin
S 1	0,68	0,84	0,76
S 2	0,78		
S 3	0,82		
S 4	0,82		
S 5	0,82		
S 6	0,78		
S 7	0,78		
S 8	0,78		
S 9	0,78		
S 10	0,78		
S 11	0,78		
S 12	0,78		
S 13	0,78		
S 14	0,78		
S 15	0,78		

Dari tabel 3, fraksi S2, S6 sampai S15 mempunyai kisaran nilai Rf yang mendekati antibiotik standar Ampisillin, sedangkan fraksi S3 sampai S5 mempunyai kisaran nilai Rf yang mendekati antibiotik standar Kloramfenikol. Sehingga senyawa aktif dari ekstrak kapang endofit HL.46F.211 perkiraan mendekati/ sama dengan antibiotik standar atau senyawa turunannya.



Gambar 11. Analisis TLC setelah kromatografi kolom ekstrak fase air kapang endofit HL.46F.211 pada silica gel F254. (a. spot fraksi, b. spot standar Kloramfenikol, c. spot standar Ampisillin).

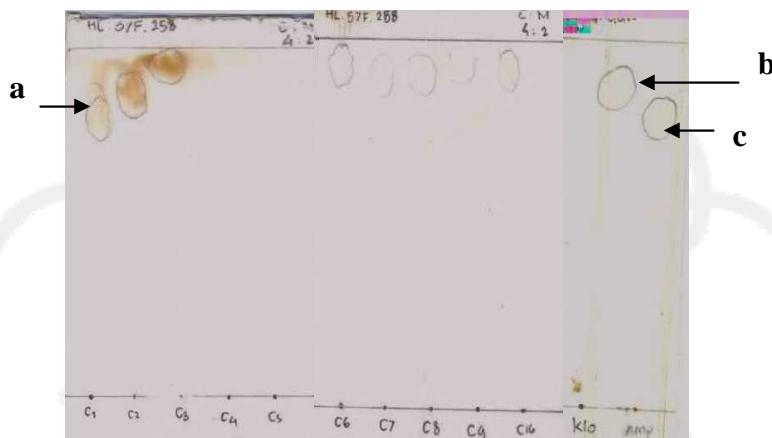
Untuk ekstrak fase kloroform kapang endofit HL.57F.258 setelah melalui kromatografi kolom terbagi menjadi 10 fraksi. Hasil analisis TLC adalah sebagai berikut:

Tabel 4. Nilai Rf masing-masing fraksi dari kapang endofit HL.57F.258 yang larut dalam kloroform

Hasil fraksinasi	Nilai Rf	Rf Kloramfenikol	Rf Ampisillin
C1	0,72	0,84	0,76
C2	0,78		
C3	0,95		
C4	-		
C5	-		
C6	0,92		
C7	0,90		
C8	0,90		
C9	0,90		
C10	0,90		

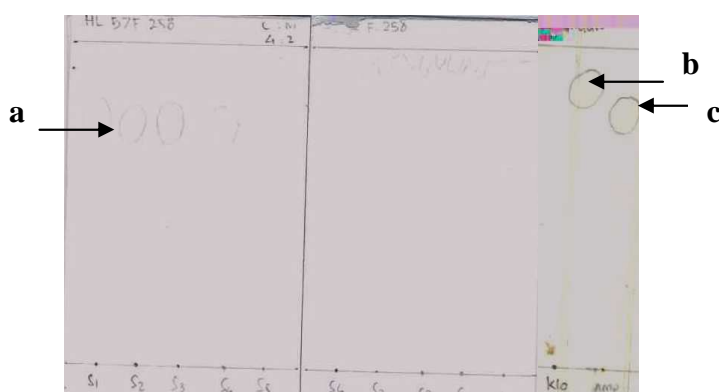
Dari tabel 4 dapat diketahui bahwa fraksi C1 mempunyai kisaran nilai Rf yang mendekati antibiotik standar Ampisillin. Fraksi C2 mempunyai kisaran nilai Rf yang

mendekati antibiotik standar Kloramfenikol, sedangkan fraksi C3, C6-C10 mempunyai kisaran nilai Rf yang sama yaitu 0,9, nilai Rf ini berbeda dengan Rf standar. Pada fraksi C4 dan C5 tidak terbentuk spot/ noda pada pelat silika Gel F 254 TLC, hal ini diduga dalam fraksi tersebut kadar senyawa metabolit sekunder sangat rendah sehingga tidak terdeteksi.



Gambar 12. Analisis TLC setelah kromatografi kolom ekstrak fase kloroform kapang endofit HL.57F.258 pada silika gel F254, (a. spot fraksi, b. spot standar Kloramfenikol, c. spot standar Ampisillin).

Untuk ekstrak fase air kapang endofit HL.57F.258 setelah melalui kromatografi kolom terbagi menjadi 10 fraksi. Hasil analisis TLC menunjukkan fraksi S1 sampai S10 terbentuk noda pada pelat silika Gel F 254 yang tidak begitu jelas dan nilai Rf dari masing-masing spot berbeda dengan Rf antibiotik standar, diduga dalam fraksi tersebut kadar senyawa metabolit sekunder sangat rendah sehingga tidak mampu terdeteksi dan senyawa tersebut berbeda dengan antibiotik standar.



Gambar 13. Analisis TLC setelah kromatografi kolom ekstrak fase air kapang endofit HL.57F.258 pada silika gel F 254, (a. spot fraksi, b. spot standar Kloramfenikol, c. spot standar Ampisillin).

7. Analisis senyawa antibakteri dengan metode HPLC

Selain uji TLC, dilakukan juga uji dengan HPLC untuk mengetahui kemurnian masing-masing fraksi setelah difraksinasi dengan kromatografi kolom. Analisis HPLC ini memiliki tingkat akuritas yang paling tinggi. Setiap senyawa akan terdeteksi dengan terbentuk peak yang berbeda-beda sesuai waktu retensinya. Dasar pemisahan kromatografi adalah kesetimbangan komponen-komponen campuran diantara fase gerak dan fase diam. Hasil analisis ditunjukkan berupa kromatogram. Kromatogram berfungsi sebagai analisis kualitatif dan kuantitatif. Posisi puncak (*peak*) pada sumbu waktu berfungsi untuk mengidentifikasi komponen cuplikan, sedangkan luas area (area %) atau tinggi *peak* merupakan ukuran kuantitatif tiap komponen. Waktu retensi (*retention time/ Rt*) merupakan petunjuk kualitatif suatu senyawa. Waktu retensi adalah waktu yang dibutuhkan oleh suatu senyawa untuk mencapai detektor. Jumlah *peak* yang terdapat pada kromatogram menunjukkan jumlah komponen yang terdapat dalam cuplikan.

Masing-masing fraksi yang menunjukkan uji positif pada TLC (spot yang terbentuk mempunyai harga R_f yang kisarannya mendekati antibiotik standar) diinjeksikan pada instrumen HPLC. Fraksi tersebut antara lain C (211), S1 (211), S2 (211), S3 (211), C1 (258), C2 (258), C3 (258) dan S (258).

Hasil pengukuran panjang gelombang semua fraksi dan antibiotik standar diperoleh kisaran panjang gelombang dengan absorbansi maksimum yang relatif stabil sebesar 319 nm, sehingga panjang gelombang ini digunakan pada saat analisis senyawa dengan HPLC.

Hasil analisis HPLC menunjukkan bahwa, Jumlah *Peak* yang terbentuk pada kromatogram antibiotik standar Kloramfenikol sebanyak 2 dengan *Rt* dan area % yang berbeda (lampiran 3). Senyawa kloramfenikol murni terdeteksi pada *Rt* 2,796. Sedangkan, *Peak* yang lain merupakan senyawa campuran dalam antibiotik Kloramfenikol yang juga bersifat antibakteri. Kemudian *Peak* yang terbentuk pada kromatogram Ampisillin sebanyak 6. Ampisillin murni terdeteksi pada *Rt* 2,650. *Peak* yang memiliki luas area % kecil dapat diduga merupakan senyawa campuran yang juga bersifat antibakteri tetapi kadar dalam antibiotik tersebut sangat kecil. Hasil kromatogram dapat dilihat pada lampiran 4.

Pada kromatogram hasil analisis fraksi kloroform (HL46F211) dengan HPLC, diketahui nilai *Rt* senyawa yang terdeteksi kisarannya mendekati *Rt* Ampisillin pada menit 2,650, sedangkan metabolit sekunder tersebut terdeteksi pada menit 2,679. Hasil kromatogram dapat dilihat pada lampiran 5.

Pada kromatogram HL46F211(1) (lampiran 6) nilai *Rt* senyawa yang terdeteksi kisarannya mendekati *Rt* Kloramfenikol pada menit 2,796 sedangkan metabolit sekunder tersebut terdeteksi pada menit 2,708. Dari hasil kromatogram dapat diketahui pula bahwa senyawa pada fraksi HL46F211(1) hasil kromatografi kolom tersebut sudah benar-benar murni, karena *Peak* yang terbentuk hanya satu dengan luas area % sebesar 100,000%. Pada kromatogram HL46F211(2) (lampiran 7) nilai *Rt* senyawa yang terdeteksi kisarannya mendekati *Rt* kloramfenikol pada menit 2,725, sedangkan dari kromatogram HL46F211(3) dapat diketahui bahwa senyawa yang terdeteksi kisaran nilai *Rt* mendekati *Rt* Kloramfenikol pada menit 2,792. Sehingga diduga bahwa senyawa metabolit

sekunder yang dihasilkan oleh fungi endofit HI.46F.211 adalah senyawa Kloramfenikol dan Ampisillin atau turunannya. Dari kromatogram tersebut juga dapat diketahui bahwa senyawa pada kedua fraksi tersebut belum murni, karena *Peak* yang terbentuk lebih dari satu. Kemungkinan senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa turunan antibiotik yang juga bersifat antibakteri.

Peak yang terbentuk pada kromatogram antibiotik standar pada injeksi yang ke-2 mempunyai *Rt* dan area % yang berbeda dengan kromatogram hasil injeksi yang pertama. Tetapi kisaran nilai *Rt*nya tidak begitu jauh. Pada kromatogram antibiotik Kloramfenikol pada injeksi yang ke-2, senyawa terdeteksi pada menit 2,796 sama dengan nilai *Rt* pada injeksi pertama 2,796. Sedangkan *Peak* yang terbentuk pada kromatogram ampisillin hasil injeksi yang kedua pun sebanyak 6. Ampisillin murni terdeteksi pada *Rt* 2,662 sedang harga *Rt* pada injeksi pertama 2,650. Perbedaan *Rt* antibiotik standar injeksi yang pertama dengan yang ke-2 disebabkan oleh faktor penyimpanan antibiotik, yaitu suhu. Penyimpanan antibiotik harus dengan suhu rendah, antibiotik akan rusak apabila disimpan pada suhu ruang. Hasil kromatogram dapat dilihat pada lampiran 9 dan 10.

Kromatogram hasil analisis HPLC fraksi kloroform HL57F258(1), HL57F258(2) menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder tersebut mempunyai waktu retensi yang kisarannya mendekati nilai *Rt* Ampisillin satandar. Hasil kromatogram dapat dilihat pada lampiran 11, 12. Untuk fraksi kloroform HL57F258(1), senyawa metabolit sekunder terdeteksi pada menit 2,604, mendekati *Rt* Ampisillin pada menit 2,662. Fraksi kloroform HL57F258(2), senyawa metabolit sekunder terdeteksi pada menit 2,658 mendekati *Rt* Ampisillin pada menit 2,662. Sehingga diduga bahwa senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang endofit HI.57F.258 adalah senyawa Ampisillin atau turunannya. Sedangkan Fraksi kloroform HL57F258(3), dan fraksi air HL53F258, senyawa metabolit sekunder terdeteksi hanya berupa eluen saja, kemungkinan senyawa metabolit

sekunder yang terkandung dalam fraksi ini bukan senyawa Kloramfenikol dan Ampisillin. Hal ini sesuai dengan hasil TLC, dimana spot yang terbentuk nilai Rfnya berbeda dengan standar. Dari kromatogram tersebut juga dapat diketahui bahwa fungi endofit tersebut juga menghasilkan senyawa metabolit sekunder lainnya yang mungkin juga bersifat antibakteri.

8. Karakterisasi kapang endofit potensial

Hasil seleksi 29 kapang endofit dari 9 jenis tanaman obat yang tumbuh di area Taman Nasional Gunung Halimun (TNHG), diperoleh 4 isolat fungi endofit yang positif menghambat bakteri uji.

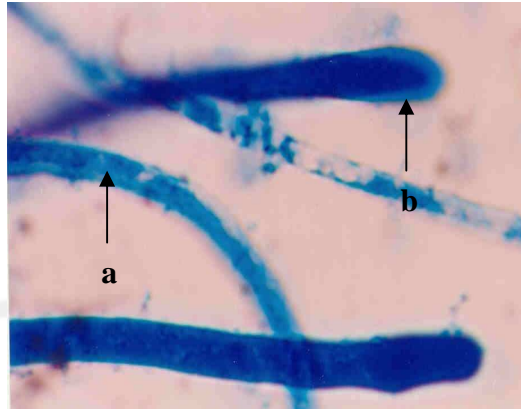
a. Kapang endofit HL.46F.211

Pengamatan morfologi kapang endofit HL.46F.211 pada medium PDA, hifa berwarna putih pada waktu masih muda, hifa panjang, lebat, pertumbuhan cepat, setelah tua warna hifa menjadi hitam, dan tidak mengubah warna media. Secara mikroskopis, hifa kapang endofit HL.46F.211 tidak bersekat, ujung hifa menggembung



membentuk sporangium.

Gambar 14. Kapang endofit HL.46F.211 pada medium PDA (umur 7 hari)



Gambar 15. Kapang endofit HL.46F.211 (umur 5 hari) dengan perbesaran 1000x, pewarnaan *Laktofenol blue* (a. Hifa, b. Sporangium). (hasil biakan pada tabung PDA miring)

b. Kapang endofit HL.48F.217

Morfologi kapang endofit HL.47F.217 pada medium PDA, hifa berwarna putih pada waktu masih muda, dengan dasar hijau, hifa pendek, pertumbuhan cepat dan setelah tua warna hifa menjadi hitam, medium tidak berubah. Secara mikroskopis, hifa kapang endofit HL.47F.217 tidak bersekat.



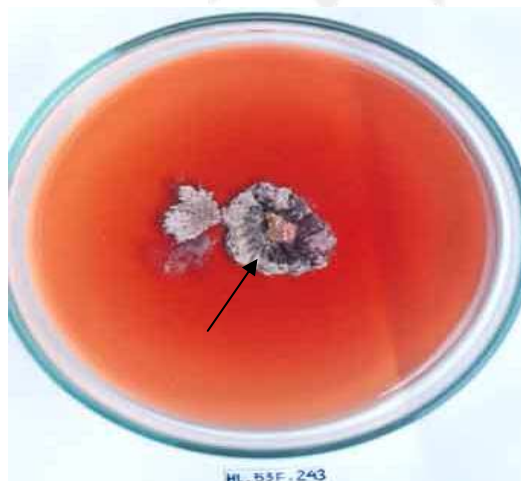
Gambar 16. Kapang endofit pada medium PDA (umur 10 hari)



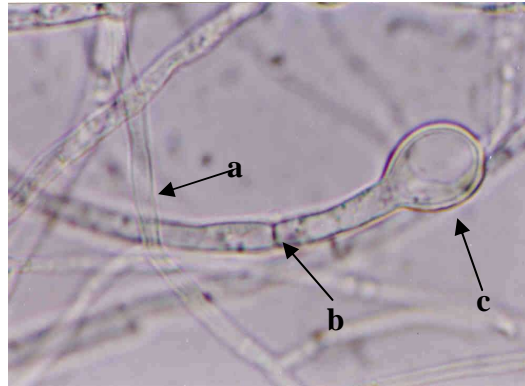
Gambar 17. Kapang endofit HL.48F.217 (umur 5 hari) dengan perbesaran 1000x (a. Hifa). (Hasil biakan pada tabung PDA miring).

c. Kapang endofit HL.53F.243

Morfologi kapang endofit HL.53F.243 pada medium PDA, hifa berwarna putih kemerahan pada waktu masih muda, hifa pendek, pertumbuhan lambat dan setelah tua warna menjadi merah kehijauan, dan medium berubah menjadi merah muda. Secara mikroskopis, hifa fungi endofit HL.53F.243 bersekat, hifa bercabang, ujung hifa menggebung (vesikel), tanpa konidium.



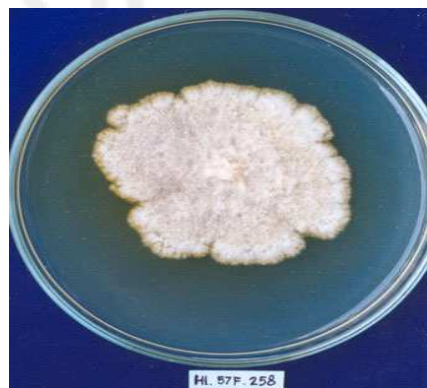
Gambar 18. Kapang endofit HL.53F.243 pada medium PDA (umur 7 hari)



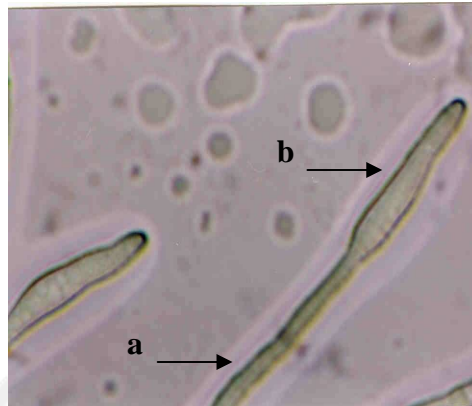
Gambar 19. Kapang endofit HL.53F.243 (umur 5 hari) dengan perbesaran 1000x
(a) Hifa, (b.) Sekat /septa, (c) Vesikel
(hasil biakan pada tabung PDA miring)

d. Kapang endofit HL.57F.258

Morfologi kapang endofit HL.57F.258 pada medium PDA, hifa berwarna putih pada waktu masih muda, hifa pendek, pertumbuhan cepat dan setelah tua warna menjadi putih kekuningan dengan dasar coklat, dan medium berubah menjadi kuning. Secara mikroskopis, hifa kapang endofit HL.57F.258 tidak bersekat, hifa bercabang, ujung hifa menggebung membentuk sporangium.



Gambar 20. Kapang endofit HL.57F.258 pada medium PDA (umur 7 hari)



Gambar 21. Kapang endofit HL.57F.258 (umur 5 hari) dengan perbesaran 1000x
a. Hifa
b. Sporangium
(Hasil biakan pada tabung PDA miring).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Diperoleh 2 isolat kapang endofit yaitu HL.46F.211 dan HL.57F.258 yang 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.
2. Hasil analisis senyawa antibakteri dengan HPLC, diketahui bahwa senyawa aktif HL.46F.211 mempunyai nilai waktu retensi (Rt) mendekati antibiotik standar Kloramfenikol yaitu 2,796 (pada fraksi air) dan Ampisillin (2,650) pada fraksi kloroform. Sedangkan nilai Rt senyawa antibakteri dari kapang endofit HL.57F.258 kisarannya mendekati nilai Rt antibiotik Ampisillin yaitu 2,662.

B. SARAN

1. Perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut terhadap struktur kimia senyawa aktif yang dihasilkan oleh kapang endofit HL.46F.211 dan HL.57F.258 dengan menggunakan instrumen Spektrum IR dan GC-MS.
2. Perlu dilakukan identifikasi terhadap 4 isolat kapang endofit yang positif menghasilkan senyawa antibakteri.
3. Perlu dilakukan analisis senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh isolat fungi endofit HL.48F.217 dan HL.53F.243.

DAFTAR PUSTAKA

- Arnold, A.E., Z. Maynard, G. S. Gilbert. 2000. "Are Tropical Fungal Endophytes Hyperdiverse?". *Ecology*. 3:267-274
- Azevedo, J. L., Jr. Walter, M. Pereira, J.D. Araujo, W.L. De. 2000. "Endophytic Microorganism: a Review on Insect Control and Recent Advances on Tropical Plants". *EJB. Electronic Journal Plant Biotechnology*. Vol. 3
- Bacon, C. W., W. Charles, J.F. White. 2000. *Microbial Endophytes*. Marcd Dekker Inc. New York.
- Baley, R. R., D. P. Caylor. 1977. *Microbiology Laboratory Manual*. Burgess Publishing Company. Minnessota.
- Bills, G. F. 1996. "Isolation and Analysis of Endophytic Fungal Communities from Woody Plants". *World Mycologia Journal*. New York. Pp.31-65
- Brock, J. D. 1970. *Biology Microorganism*. Prentisce Hall Inc. Englewood Cliffs. New Jersey.
- Brooks, G. F., J. S. Butel and S. F. Morse. 2001. *Medical Microbiology*. 2th edition. Mc. Graw Hill. New York.
- Carroll, G. C. 1988. "Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Simbiont". *Ecology*. 62:2-9
- Carroll, G. C. 1991. "Bey and Pest Detterence Alternative Strategies and Hidden Cost of Endophytic Microorganism in Vascular Plants". In Andrew, J.H. and Manamo, S.S. (eds.). *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag

- Castillo, U. F., G. A. Strobel, E. J. Frod, W. M. Hess, H. Porter, J. B. Jensen, H. Albert, R. Robison, M. A. Condrón, D. B. Teplow, D. Stevens and D. Yaver. 2002. "Mumubicins Wide-Spectrum Antibiotic Produced by *Streptomyces* NRRL 30562, Endophytes on *Kennedia nigricans*". *Microbiology*. 148: 2675-2685
- Castillo, U. F., J. K. Harper, G. A. strobel, J. Sears, K. Alesi, E. Frod, J. Lin, M. Hunter, M. Maranta, H. Ge, D. Yaver, J. B. Jensen, H. Porter, R. Robinson, D. Miller, W. H. Hess, M. Condrón, and D. Teplow. 2003. "Kakadumycins, novel Antibiotic From *Streptomyces* sp NRRL 30566 an Endophyte of *Grevillea pteridifolia*". *FEM Lett.* 224: 183-190
- Clay, K. 1988. "Fungal Endophytes of Grasses: A Devese Mutualism Between Plants and Fungi". *Ecology*. 69(1): 10-16
- Dhramaputra, O. S., A. W. Gunawan dan Nampiah. 1989. *Mikologi Dasar*. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat IPB. Bogor
- Djuwarsih, M. 1997. "The Soil of Gunung Halimun National Park, Research and Conservation of Biodiversity in Indonesia. Vol. II. The Inventory of Natural Resource in Gunung Halimun National Park", Bogor: 105-110. In *Journal Biodiversity Taman Nasional Gunung Halimun*. 5(6): 773-779.
- El-Sayed, A. H. M. M. 1994. Production of Penicillins and Cephalosporins by Fungi. In: *The Mycota*. Springer. Berlin, Tokyo, Singapura. Hal. 517.
- Ezra, D. W. M. Hess, and G. A. Strobel. 2004. "New Endophytic Isolates of *Muscudor albus*, a Volatile Antibiotic Producing Fungus". *Microbiology*. 12: 4023-4031.
- Ezra, D., U. F. Castillo, G. A. Strobel, W. M. Hess, J. Porter, J. B. Jensen, M. A. Condrón, D. B. Teplow, J. Scars, M. Maranta, M. Hunter, B. Weber, and D. Yaver. 2004. "Coronamycins, Peptide Antibiotic Produced by a Verticillatae *Streptomyces* sp (MSU-2110) Endophytic on *Monstera* sp". *Microbiology*. 150 (10): 3093-3094.
- Faeth, S. H. 2002. Are Endophytic Fungi Defensive Plant Mutualism?. *Journal Oikos*. 98:25-36.
- Fardiaz, S. 1993. *Analisis Mikrobiologi Pangan*. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Findlay, J. A., S. Bethelzi, G. Li, and M. Sevek. 1997. "Insect Toxin from an Rndophyte Fungus from Winter Green". *Journal Natural Product*. 60 :1214-1215.
- Ganiswara, G. R. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi IV. Farmakologi Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Goodman L. S. and A. Gillman. 1975. *The Pharmacological Basic of Therapeutic*. 5th Edition. Mcmillan Pub. Co. Inc. New York. Pp. 67.
- Hadioetomo, R. S. 1990. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*. PT. Gramedia. Jakarta

- Handayani, D L. 2004. "Mikrofungi Endofit Penghasil Antibakteri Penghambat *Escherichia coli*". *Skripsi*. Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Henida, L.1999. "Penapisan Kandungan Kimia dan Uji Daya Antibakteri Ekstrak Jamur Merah (*Pycnoporus sanguineus*) Terhadap *Staphylococcus aureus* NCTC8532, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 dan *Salmonella typhi* NCTC 786". *Skripsi*. ISTN. Jakarta
- Hertiani, T., Palupi, S. I., Sanliferianti dan Nurwindasari, D. H. 2003. "Uji In Vitro Potensi Antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, dan *Candida albicans* dari Beberapa tanaman Obat Tradisional untuk Penyakit infeksi". *Pharmakon*. 4(2): 89-95.
- Holler, U. 1999. *Isolation, Biological Activity and Scondary Metabolite Investigations of Marine derived Fungi and Selected Host Sponges*. Wihelmina. Carolo University. www.opus.tu-bs.de/opus/volltexte/1999/40
- Holt, J G.; N. R. Krcig; P. H. A. saneth; J. T. Staley and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determination bacteriology*. 9th edition. Williams and Willkins. Baltimore. Pp. 155, 179-180
- Ingraham, J. L. and C. A. Ingraham. 2000. *Introductionary of Microbiology*. Scond edition. Brooks/ Cole. USA.
- Kahono, S. dan A. J. Arief. 2002. *Kegiatan Penelitian Keanekaragaman Hayati di TNGH: Kerjasama LIPI-PHKA-JICA. Workshop Riew BCP-JICA*. Hotel Paninsula, Sipi Jakarta. Hal. 10.
- Kompas. 16 juli 2002. *Bakteri Semakin Kebal Antibiotik*. [Http://www.kompas.com/kesehatan/news/0207/16/210613.htm](http://www.kompas.com/kesehatan/news/0207/16/210613.htm)
- Lay, B. W. 1994. *Analisis Mikrobia di Laboratorium*. PT. Raja grafindo Persada. Jakarta.
- Malloch, D. 1940. *The Isolation, Cultivation, and Identification*. University of Toronto Press. Toronto Buffalo London.
- Miller, R. V., C. M. Miller, D. Garton-Kinney, B. Redgrave, J. Sears, M. Condron, D. Teplow, and G. A. Strobel. 1998. "Encomycin, unique Antimycotic from *Pseudomonas viridiflava*". *Journal Applications Microbiol*. 84: 937-944.
- Morin, R. B. and M. Gorman. 1995. *Kimi dan Biologi Antibiotik Beta-Laktam*. Vol I dan II. Penerjemah Sri Mulyani. Academic Press. New York.
- 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)
- Pelczar, M. J. dan Chan, E. C. S. 1988. *Dasar-dasar Microbiologi*. Edisi 2. UI-Press. Jakarta.
- Petrini, D., T. N. Sieber, T. Toti, and D. Viret. 1992. "Ecology Metabolite Production and Substrate Utilization in Endophytic Fungi". *Natural Toxin*. 1: 185-196.

- Saikkonen, K., M. L. Helander, S. H. Faeth, F. Schulthess and D. Wilson. 1999. "Endophytes-Grasses-Herbivore Interactions: The Case on Neothypodium Endophytes In Arizona Fescue Populations". *World Mycologia Journal*. Pp. 121, 411-420. <http://www.utu.fi/k/karisaik/endofyyti.htm>
- Salle, B. S. 1961. *Fundamentals Principles of Bacteriology*, 5th edition. Mc. Graw Hill Book Co. Piladelphia. Pp. 265
- Siegel, M. R., G. C. M. Latech, and M. C. Johnson. 1987. "Fungal Endophytes of Grasses". *Ann. Rev. Phytopathology*. 25: 293-315.
- Setiabudy, R. dan G. H. S. Gann. 1995. "Pengantar Antimikrobia". Dalam S.G. Ganiswara, R. Setiabudy, F.D. Suyatna, purwastyastuti, Nofrialdi (Eds.). *Farmakologi dan Terapi*. Gaya Baru . Jakarta.
- Simanjutak, P., R. Melliawati, A. Soeksmanto., T. Parwati dan 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 Springer-Verlag. New York. Pp. 101, 148
- Stierle, A. and G. Strobel. 1995. "The Search for a Taxol-Producing Microorganism Among The Endophytic Fungi of The Pasific Yew, *Taxus brevifolia*". *Journal of Natural Product*. 58(9):1315-1324
- Stierle, A., G. A. Strobel and D. Stierle. 2003. "An Endophytic *Gliocladium* sp of *Eurhythpha cordifolia* Producing Selective Volatile Antimicrobial Compounds". *Plants Science*. 165: 913-922.
- Stone, J. K. and Petrini, O. 1997. "Endophytes of Forest Tress: a Model of Fungus Plants Interactions". In. Carroll, G.C. and Tudzyinky, P. (Eds.). *The Mycota V Plant Interactions*shif. Part B. Springer-Verlag. Pp. 129-142.
- Strobel, G. A., W. M. Hess, E. Frod, R. S. Sidhu, and X. Yang. 1996. "Taxol from Fungal Endophytes and The Issue of Biodiversity". *Journal of Industrial Microbiology*. 17: 417-425.
- Strobel, G. A., R. V. Miller, C. Miller, M. Condron, D. B. Teplow, and W. M. Hess. 1999. "Cryptocandin a Potent Antimycotic from The Endophytic Fungus *Cryptosporiopsis Cf. quercina*". *Microbiology*. 145:1919-1926.
- Strobel, G. A., E. Dirkse, J. Sears and C. Markworth. 2001. "Volatile Antimicrobilas from *Muscudor albus* a Novel Endophytic Fungus". *Journal Microbiology*. 147: 2943-2950.
- Strobel, G. A. 2002. "Raint Forest Endophytes and Bioactive Product". *Crit. Review Biotechnol*. 22(4): 315-333.

- Strobel, G. A., W. M. Hess, J. Y. Li, E. Frod, J. Sears, R. S. Sidhu and B. Summerell. 2004. "*Pestalotiopsis querpinii*, a Taxol-Producing Endophyte of The Wollemi pine, *Wollemia*". *Australian Journal of Botani*. 45(6): 1073-1082.
- Syahrurachman, A. 1993. *Mikrobiologi Kedokteran*. Binarupa Aksara. Jakarta
- Tan, R. X. and Zou, W. X. 2001. "Endophytes: a Rich Source of Funcional Metabolites". *Journal Natural Product*. The Royal Society of Chemistry. 18:448-459
- Tyler, V. E., J. E. Robberts and M. K. Specdic. 1996. *Pharmakology and Pharmacobiotechnology Williams and Willkins, A. Waverly Co. USA*. Pp. 219-221.
- Williams, R. A. D., P. A. Lambert and P. Singleton. 1996. *Antimicrobial Drug Action*. Bios Scientific Pub. London.
- Wilson, A. D., S. L. Clement, W. J. Kaiser, and D. E. Lester. 1991. "First Report of Clavicipitaceous Anamorphic Endophytes in *Hordeum* Species". *Plant Diseases*. 75:215
- Worang, R. L. 2003. "Fungi Endofit Penghasil Antibiotik". *Artikel*. Pasca Sarjana IPB. Bogor.
- Yang, X., G. Strobel, A. Stierle, W. H. Hess, J. Lee, and J. Clardy. 1994. "A Fungal Endophyte Tree Relationship: *Phoma* sp in *Taxus wallanchiana*". *Plant Science*. 102: 1-9