

**SKRIPSI**

**YUANITA ANGGRAINI**

**ISOLASI, IDENTIFIKASI dan PROFIL KLT  
DENSITOMETRI METABOLIT  
JAMUR ENDOFIT TANAMAN *Dioscorea sp***

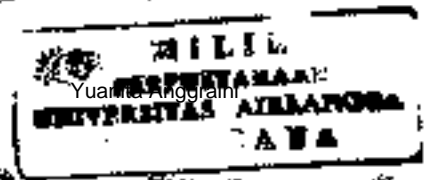


**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA  
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM**

**SURABAYA**

**2006**

FF 133/07  
Ang



**Lembar Pengesahan**

**ISOLASI, IDENTIFIKASI dan PROFIL KLT  
DENSITOMETRI METABOLIT  
JAMUR ENDOFIT TANAMAN *Dioscorea sp***

**SKRIPSI**

Dibuat untuk memenuhi syarat mencapai Gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas  
Farmasi Universitas Airlangga  
2006


Oleh :

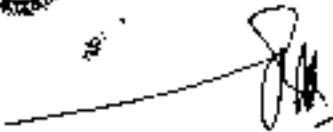
**YUANITA ANGGRAINI**  
**030210133 E**

Disetujui oleh

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta

  
**Prof. Dr. AM. Gunawan I., Apt.**  
**130 541 814**

  
**Dra. Noor Erma NS., Apt., MS.**  
**130 809 075**

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga kami dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “ **ISOLASI, IDENTIFIKASI dan PROFIL KLT-DENSITOMETRI METABOLIT JAMUR ENDOFIT TANAMAN *Dioscorea sp*** “ dengan baik.

Penulisan skripsi ini dapat diselesaikan dengan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan keikhlasan hati penulis menyampaikan banyak terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. H. Noor Cholil Zaini selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan untuk meraih gelar sarjana
2. Prof. Dr. Gunawan Indrayanto, sebagai dosen pembimbing utama yang dengan sabar membimbing, membantu dan memberi dukungan kepada kami, serta Dra. Noor Erma NS selaku dosen pembimbing serta yang banyak memberi dorongan semangat, saran dan kritik kepada kami semua
3. Dr. Isnani, MS, Dra. Rakhmawati Apt dan Drs. Abdul Rahman, Msi selaku dosen penguji atas saran dan kritik yang telah diberikan kepada penulis
4. Drs. Herra Studiawan selaku dosen wali atas nasehat yang diberikan.
5. Kepala laboratorium mikrobiologi atas sarana yang diberikan beserta para staf, Mas Gun, Mas Roy, Mbak Yuyun, Pak Bakir, Pak Sonar, Mas Faris.
6. Kepala laboratorium Multipurpose atas izin yang diberikan untuk menggunakan sarana yang tersedia dan semua staf, Pak Har, Pak Kusairi, Mbak Yayuk, Pak Dasuki atas semua bantuannya.
7. Bapak dan mamaku tersayang yang telah memberi dukungan moral serta doa restu selama kuliah
8. Adikku Murni dan seluruh keluargaku atas bantuan yang diberikan.
9. Temanku satu perjuangan : Catur, Mukali dan Mila atas kerjasamanya sampai skripsi ini selesai. Semangat ya....

10. Sahabat-sahabatku : Meta, Whyka, Indah, Septy, Mbak Ida, Riza dan Happy makasih atas dukungan dan kekompakannya.
11. Teman Spesialku Febri Ariyanto atas bantuan, cerita dan setianya.
12. Mbak Andri, Hermanto, Mbak Sri, Mas Abid atas bantuannya selama penulis menyelesaikan skripsi.
13. Teman-teman angkatan 2002, khususnya non reguler ganjil yang makin kompak aja.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik dari semua pihak untuk kesempurnaan skripsi ini.

Akhir kata, penulis berharap skripsi ini mampu memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, September 2006

Penulis

## ISOLASI, IDENTIFIKASI dan PROFIL KLT DENSITOMETRI METABOLIT JAMUR ENDOFIT TANAMAN *Dioscorea sp*

Yuanita Anggraini

Jamur endofit adalah jamur yang dapat menginfeksi tumbuhan sehat pada jaringan tertentu dari tanaman dan pada umumnya tidak menyebabkan efek yang merugikan bagi tanaman inangnya (Faeth, 2002).

Pada penelitian ini dilakukan isolasi tanaman *Dioscorea sp* untuk mendapatkan jamur endofit, kemudian dilakukan pengamatan makroskopis, mikroskopis, profil pertumbuhan serta profil metabolit secara KLT-Densitometri.

Penelitian diawali dengan melakukan penanaman bagian batang, daun dan akar tanaman *Dioscorea sp* ke dalam cawan petri yang berisi media padat *Malt Extract Agar* dan dilakukan optimasi alkohol dan klorox untuk sterilisasi permukaan dan kemudian diinkubasi selama 14 hari. Bagian daun menunjukkan pertumbuhan sedangkan akar dan batang tidak. Jamur endofit selanjutnya dipisahkan pada media miring *Malt Extract Agar* dan *Potato Dextrose Agar*. Pemisahan dilakukan berdasarkan bentuk dan warna koloni hingga didapatkan koloni jamur dengan penampakan makroskopis yang sama. Bagian daun ini didapatkan 2 macam koloni jamur yaitu yang berbentuk seperti bunga karang dengan warna koloni kuning gading dan kecoklatan.

Isolat jamur endofit diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis. Selanjutnya dilakukan perbanyakan jamur endofit pada media cair *Potato Dextrose Agar* 50 ml dan diinkubasi selama 28 hari. Dilakukan sampling sebanyak 2 botol kultur pada hari ke 7, 14, 21 dan 28 untuk memperoleh kurva pertumbuhan. Setelah 28 hari, jamur dipanen dan disaring sehingga didapatkan dua bagian yaitu media cair dan miselia jamur. Filtrat media diukur volumenya, kemudian diekstraksi dengan etil asetat sejumlah setengah dari jumlah volume mediana. Media setelah diekstraksi dengan etil asetat dipekatkan dan diekstraksi dengan metanol. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3x hingga didapatkan ekstrak metanol. Miselia diekstraksi dengan n-Heksan, etil asetat dan metanol sebanyak 3 kali kemudian hasilnya dikeringkan. Didapatkan 3 macam ekstrak yaitu n-heksan, metanol miselia dan etil asetat miselia.

Kelima macam ekstrak yaitu ekstrak etil asetat dan metanol dari media serta ekstrak etil asetat, metanol dan n-heksan dari miselia dilarutkan dengan pelarut yang sesuai kemudian ditotolkan pada lempeng KLT dan diekluasi. Ekstrak etil asetat dan metanol yang berasal dari miselia diekluasi dengan menggunakan fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1 %, dan etil asetat : metanol : air = 7 : 2 : 1 %, ekstrak etil asetat, n-heksan dan metanol dari media diekluasi dengan fase gerak etil asetat : n-heksan = 4 : 1 %, kloroform : metanol : air = 2 : 7 : ½ %, etil asetat : metanol = 9 : 1 %.

Hasil penelitian menunjukkan semua ekstrak mengandung senyawa yang bersifat UV aktif serta memberikan reaksi positif terhadap penampak noda amisaldehyd-asam sulfat dan vanilin asam sulfat, tetapi memberikan reaksi negatif terhadap penampak noda dragendorff dan sitrat borat. Disimpulkan bahwa ekstrak dari jamur endofit yang diisolasi dari tanaman *Dioscorea sp* secara KLT diduga mengandung senyawa-senyawa golongan terpenoid dan steroid.

## **ISOLASI, IDENTIFIKASI dan PROFIL KLT-DENSITOMETRI METABOLIT JAMUR ENDOFIT TANAMAN *Dioscorea sp***

Endophytic fungi infected the leaf tissues of *Dioscorea sp*. There are two kinds coloni of the fungi, which shape likes a flower with yellow and brown colour.

Macroscopic and microscopic observation was done with 4 kinds of medium. The growth of this fungi was measured the weight of the dried misselium every 7 days after the inoculation in *Potato Dextrose Broth* medium. In this study, the profiles of endophytic fungi were analysed by TLC-Densitometric method. There were 5 kinds of extracts, those were ethyl acetate and methanol from medium and n-hexan, ethyl acetate and methanol from the mycelium. n-hexan : ethyl acetate : methanol = 4 : 5 : 1 % dan ethyl acetate : methanol : water = 7 : 2 : 1 %, were used as mobile phase of ethyl acetate and methanol extract from medium. Ethyl acetate : n-hexan = 4 : 1 %, chloroform : methanol : water = 2 : 7 : ½ %, and ethyl acetate : methanol = 9 : 1 %, used as mobile phase of n-hexan, ethyl acetate and methanol extract from the mycelium. Besides using UV light, some reagents were used to analyze the profile of metabolites. The spectra and densitogram were evaluated by densitometry. The results showed that all extract contained some substances which had positive reaction with UV light and the anisaldehyd  $H_2SO_4$  and vanillin  $H_2SO_4$  reagents.

**Keywords** : *Dioscorea sp*, *Potato Dextrose agar*, metabolite profiles, TLC-Densitometry, mycelium, medium.

	Halaman
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b>	ii
<b>KATA PENGANTAR</b>	iii
<b>RINGKASAN</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vi
<b>DAFTAR ISI</b>	vii
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	x
<b>DAFTAR TABEL</b>	
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Tinjauan Tentang <i>Dioscorea sp</i>	5
2.1.1 Klasifikasi	5
2.1.2 Habitus dan Morfologi	5
2.1.3 Kandungan Kimia	6
2.1.4 Kegunaan Tanaman	6
2.2 Tinjauan Tentang Jamur	6
2.2.1 Pengertian dan Morfologi Jamur	6
2.2.2 Sifat Umum Jamur	7
2.2.3 Media Kultur Jamur	7
2.3 Tinjauan Tentang Jamur Endofit	9
2.4 Tinjauan Tentang Isolasi Jamur Endofit	9
2.5 Tinjauan Tentang Identifikasi Jamur Secara Umum	13
2.6 Tinjauan Tentang Metabolit	15
2.7 Tinjauan Tentang Ekstraksi	16
2.7.1 Metode Ekstraksi	16
2.8 Tinjauan Tentang Kromatografi	17
2.8.1 Kromatografi Lapis Tipis	17
2.8.2 Tinjauan Tentang Densitometri	18

<b>BAB III KERANGKA KONSEPTUAL</b>	<b>19</b>
<b>BAB IV METODE PENELITIAN</b>	
<b>4.1 Bahan Penelitian</b>	<b>21</b>
4.1.1 Bahan Tumbuhan	21
4.1.2 Bahan Kimia	21
4.2 Alat Penelitian	22
4.3 Prosedur Penelitian	22
4.3.1 Penyiapan Alat	22
4.3.2 Pembuatan Media	23
4.3.2.1 Pembuatan Media Padat ( awal )	23
4.3.2.2 Pembuatan Media Padat ( tahap 2 )	23
4.3.2.3 Pembuatan Media Padat dalam Cawan Petri	23
4.3.2.4 Pembuatan Media Agar Miring	24
4.3.3 Penyiapan Tanaman	24
4.3.4 Proses Penanaman Bagian Tanaman	24
4.3.5 Proses Pemindahan Tanaman dari Media Awal	25
4.3.6 Proses Pemotongan Bagian Tumbuhan	25
4.3.7 Proses Penunian Jamur Endofit	25
4.3.8 Penyiapan Studi Profil Metabolit	25
4.3.8.1 Penyiapan Alat	25
4.3.8.2 Pembuatan Media Cair	25
4.3.8.3 Pembuatan Kultur Induk	26
4.3.8.4 Proses Inokulasi Jamur pada Media Cair	26
4.3.9 Pengamatan terhadap Jamur Endofit	27
4.3.9.1 Pengamatan Mikroskopis Jamur	27
4.3.9.2 Pengamatan Makroskopis Jamur	27
4.3.9.3 Pengamatan Pertumbuhan Jamur	27
4.3.10 Studi Profil Senyawa Metabolit	28
4.3.10.1 Persiapan Sampel ( Pemeliharaan Jamur )	28
4.3.10.2 Proses Pengekstraksian	29
4.3.11 Preparasi Ekstrak secara KLT-Densitometri	30
4.3.11.1 Persiapan Untuk KLT-Densitometri	30
4.3.11.2 Ekstrak etil asetat	31



4.3.11.3 Ekstrak metanol	31
4.3.11.4 Ekstrak n-heksan	31

## BAB V HASIL PENELITIAN

5.1 Isolasi fungi endofit dari tanaman <i>Dioscorea sp</i>	48
5.2 Pengamatan Hasil Isolasi Bagian Daun Tanaman <i>Dioscorea sp</i>	51
5.3 Pengamatan Hasil Pemisahan Jamur Endofit dari Bagian Daun Tanaman <i>Dioscorea sp</i> .	52
5.4 Pengamatan Miselia Jamur Endofit secara Mikroskopis	53
5.5 Pengamatan Miselia Jamur Endofit secara Makroskopis	51
5.6 Pertumbuhan Miselia Jamur pada Media cair <i>Potato Dextrose</i>	55
5.7 Hasil Studi Profil Senyawa Metabolit Jamur Endofit Tanaman <i>Dioscorea sp</i>	58
5.7.1 Ekstrak etil asetat miselia dengan fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1 %v	58
5.7.2 Ekstrak etil asetat media dengan fase gerak etil asetat : n-heksan = 4 : 1 %v	64
5.7.3 Ekstrak n-heksan dengan fase gerak etil asetat : metanol = 9 : 1 %v	73
5.7.4 Ekstrak metanol media dengan fase gerak kloroform : metanol : air = 2 : 7 : 1/2 %v	78
5.7.5 Ekstrak metanol miselia dengan fase gerak etil asetat : metanol : air = 7 : 2 : 1 %v	86
BAB VI PEMBAHASAN	90
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan	100
7.2 Saran	101
DAFTAR PUSTAKA	102
DAFTAR LAMPIRAN	
Lampiran 1 Surat Keterangan Identifikasi Tumbuhan	105
Lampiran 2 Komposisi Media	106
Lampiran 3 Komposisi Penampak Noda	107

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel II.1 Waktu Sterilisasi dan Konsentrasi NaOCl yang Digunakan untuk Isolasi Endofit	11
Tabel II.2 Contoh prosedur isolasi untuk endofit dari tanaman	12
Tabel V.1 Data Optimasi Kadar dan Waktu Perendaman Larutan Pensteril ( alkohol-Na hipoklorit-alkohol ) pada bagian tanaman <i>Dioscorea sp</i>	48
Tabel V.2 Data Pengamatan Berat Kering Miselia Jamur ( kode Dsp 2 ) pada Media Cair <i>Potato Dextrose</i>	57
Tabel V.3 Data Profil KLT-Densitometri Ekstrak etil asetat Miselia Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman <i>Dioscorea sp</i> dengan Eluen n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1 %, dan Berbagai Penampak Noda	59
Tabel V.4 Data Profil KLT-Densitometri Ekstrak etil asetat Media Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman <i>Dioscorea sp</i> dengan etil asetat : n-heksan = 4 : 1 %, dan Berbagai Penampak Noda	66
Tabel V.5 Data Profil KLT-Densitometri Ekstrak etil asetat media kontrol Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman <i>Dioscorea sp</i> dengan Eluen n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1 %, dan Berbagai Penampak Noda	67
Tabel V.6 Data Profil KLT-Densitometri Ekstrak n-heksan Miselia Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman <i>Dioscorea sp</i> dengan Eluen etil asetat : metanol = 9 : 1 %, dan Berbagai Penampak Noda	74
Tabel V.6 Data Profil KLT- Ekstrak Methanol media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman <i>Dioscorea sp</i> dengan Eluen kloroform : metanol : air = 2 : 7 : ½ %, dan Berbagai Penampak Noda	79

<b>Tabel V.7 Data Profil KLT- Ekstrak metanol media kontrol Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman <i>Dioscorea sp</i> dengan Eluen kloroform : metanol : air = 2 : 7 : ½ % dan Berbagai Penampak Noda</b>	<b>80</b>
<b>Tabel V.8 Data Profil KLT- Ekstrak metanol miselia Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman <i>Dioscorea sp</i> dengan Eluen etil asetat : metanol : air =7: 2: 1%, dan Berbagai Penampak Noda</b>	<b>84</b>



	<b>Halaman</b>
Gambar 3.1 Skema Kerangka Konseptual	20
Gambar 4.1 Skema Pembuatan Media Padat ( tahap awal )	32
Gambar 4.2 Skema Pembuatan Media Padat ( Tahap 2 )	33
Gambar 4.3 Skema Proses Penanaman Bagian Tanaman	34
Gambar 4.4 Skema Proses Pemurnian dan Identifikasi	35
Gambar 4.5 Skema Pembuatan Media Cair	36
Gambar 4.6 Skema Pembuatan media padat <i>Sabouroud Dextrose Agar</i>	37
Gambar 4.7 Skema Pembuatan media padat <i>Czapek-Dox Agar</i>	38
Gambar 4.8 Skema Pembuatan media padat <i>Potato Dextrose Agar</i>	39
Gambar 4.9 Skema Kerja Proses Ekstraksi Jamur	40
Gambar 4.10 Skema Kerja pada Miselia Jamur	42
Gambar 4.11 Skema Kerja pada Cairan Media Jamur	43
Gambar 4.12 Preparasi Ekstrak untuk KLT	44
Gambar 4.13 Skema Pengamatan Pertumbuhan Jamur	45
Gambar 4.14 Skema pengamatan mikroskopik fungi endofit	46
Gambar 4.15 Skema pengamatan makroskopik fungi endofit	47
Gambar 5.1. Hasil isolasi jamur endofit dari <i>Dioscorea sp.</i>	51
Gambar 5.2 Hasil pemisahan jamur dalam beberapa waktu tertentu dan diamati secara visual.	52
Gambar 5.3 Profil Mikroskopi jamur endofit dari tanaman <i>Dioscorea sp</i> ( kode Dsp 2)	53
Gambar 5.4 Profil makroskopi jamur endofit ( kode Dsp 2 ) usia 7 hari	54
Gambar 5.5 Profil makroskopi jamur endofit ( kode Dsp 2 ) usia 14 hari	55
Gambar 5.6 Profil jamur endofit ( kode Dsp 2 ) usia 21 hari	56
Gambar 5.7 Kurva Pertumbuhan Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada tanaman <i>Dioscorea sp</i> dalam media cair <i>Potato Dextrose</i>	57
Gambar 5.8 Profil kromatografi ekstrak etil asetat dari miselia fungi endofit pada tanaman <i>Dioscorea sp</i> dengan n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1 %, sebagai fase gerak	58

<b>Gambar 5.9</b>	<b>Densitogram ekstrak etil asetat Miselia Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman <i>Dioscorea sp</i> diamati dengan sinar UV pada <math>\lambda = 254 \text{ nm}</math></b>	<b>60</b>
<b>Gambar 5.10</b>	<b>Spektra noda 2 Ekstrak etil asetat miselia diamati dengan sinar UV pada <math>\lambda = 254 \text{ nm}</math></b>	<b>60</b>
<b>Gambar 5.11</b>	<b>Spektra noda 7 Ekstrak etil asetat miselia diamati dengan sinar UV pada <math>\lambda = 254 \text{ nm}</math></b>	<b>61</b>
<b>Gambar 5.12</b>	<b>Spektra noda 9 Ekstrak etil asetat miselia diamati dengan sinar UV pada <math>\lambda = 254 \text{ nm}</math></b>	<b>61</b>
<b>Gambar 5.13</b>	<b>Densitogram ekstrak etil asetat Miselia diamati dengan sinar UV pada <math>\lambda = 365 \text{ nm}</math></b>	<b>62</b>
<b>Gambar 5.14</b>	<b>Spektra noda 2 Ekstrak etil asetat miselia diamati dengan sinar UV pada <math>\lambda = 365 \text{ nm}</math></b>	<b>62</b>
<b>Gambar 5.15</b>	<b>Spektra noda 3 Ekstrak etil asetat miselia diamati dengan sinar UV pada <math>\lambda = 365 \text{ nm}</math></b>	<b>63</b>
<b>Gambar 5.16</b>	<b>Profil kromatografi ekstrak etil asetat dari media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada tanaman <i>Dioscorea sp</i> dengan etil asetat : n-heksan = 4 : 1 sebagai fase gerak</b>	<b>64</b>
<b>Gambar 5.17</b>	<b>Densitogram Ekstrak etil asetat Media dengan eluen Etil asetat : n-heksan = 4 : 1 %, diamati dengan sinar UV pada <math>\lambda = 254 \text{ nm}</math></b>	<b>67</b>
<b>Gambar 5.18</b>	<b>Spektra noda 3 Ekstrak etil asetat media diamati dengan sinar UV pada <math>\lambda = 254 \text{ nm}</math></b>	<b>67</b>
<b>Gambar 5.19</b>	<b>Spektra noda 6 Ekstrak etil asetat media diamati dengan sinar UV pada <math>\lambda = 254 \text{ nm}</math></b>	<b>68</b>
<b>Gambar 5.20</b>	<b>Spektra noda 7 Ekstrak etil asetat media diamati dengan sinar UV pada <math>\lambda = 254 \text{ nm}</math></b>	<b>68</b>
<b>Gambar 5.21</b>	<b>Spektra noda 8 Ekstrak etil asetat media diamati dengan sinar UV pada <math>\lambda = 254 \text{ nm}</math></b>	<b>69</b>
<b>Gambar 5.22</b>	<b>Densitogram Ekstrak etil asetat Media dengan eluen etil asetat : n-heksan = 4 : 1 %, diamati dengan sinar UV pada <math>\lambda = 365 \text{ nm}</math></b>	<b>69</b>
<b>Gambar 5.23</b>	<b>Spektra noda 3 Ekstrak etil asetat media diamati dengan sinar UV pada <math>\lambda = 254 \text{ nm}</math></b>	<b>70</b>

<b>Gambar 5.24</b> Densitogram Ekstrak etil asetat Media kontrol dengan eluen etil asetat : n-heksan = 4 : 1 %, diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 254 \text{ nm}$	70
<b>Gambar 5.25</b> Spektra noda 7 Ekstrak etil asetat media kontrol media diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 254 \text{ nm}$	71
<b>Gambar 5.26</b> Densitogram Ekstrak etil asetat Media kontrol dengan eluen etil asetat : n-heksan = 4 : 1 %, diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 365 \text{ nm}$	71
<b>Gambar 5.27</b> Spektra noda 3 Ekstrak etil asetat media diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 365 \text{ nm}$	72
<b>Gambar 5.28</b> Profil kromatografi ekstrak n-heksan miselia Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada tanaman <i>Dioscorea sp</i> dengan etil asetat : metanol = 9 : 1 %, sebagai fase gerak	73
<b>Gambar 5.29</b> Densitogram Ekstrak n-heksan Miselia dengan eluen etil asetat : metanol = 9 : 1 %, sebagai fase gerak diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 254 \text{ nm}$ .	75
<b>Gambar 5.30</b> Spektra noda 3 Ekstrak n-heksan miselia Jamur diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 254 \text{ nm}$	75
<b>Gambar 5.31</b> Spektra noda 4 Ekstrak n-heksan miselia Jamur diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 254 \text{ nm}$	76
<b>Gambar 5.32</b> Densitogram Ekstrak n-heksan Miselia dengan eluen etil asetat : metanol = 9 : 1 %, sebagai fase gerak diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 365 \text{ nm}$ .	76
<b>Gambar 5.33</b> Spektra noda 2 Ekstrak n-heksan miselia Jamur diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 365 \text{ nm}$	77
<b>Gambar 5.34</b> Profil kromatografi ekstrak metanol dari media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada tanaman <i>Dioscorea sp</i> dengan kloroform : metanol : air = 2 : 7 : 1/2 %, sebagai fase gerak	78
<b>Gambar 5.35</b> Densitogram Ekstrak metanol media dengan eluen Kloroform : metanol : air = 2 : 7 : 1/2 %, diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 254 \text{ nm}$	81
<b>Gambar 5.36</b> Spektra noda 3 Ekstrak metanol media diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 254 \text{ nm}$	81

Gambar 5.37 Spektra noda 4 Ekstrak metanol media diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 254 \text{ nm}$	82
Gambar 5.38 Densitogram Ekstrak metanol media dengan eluen Kloroform : metanol : air = 2 : 7 : $\frac{1}{2}$ %, diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 365 \text{ nm}$	82
Gambar 5.39 Spektra noda 3 Ekstrak metanol media diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 365 \text{ nm}$	83
Gambar 5.40 Densitogram Ekstrak metanol media kontrol dengan eluen kloroform : metanol : air = 2 : 7 : $\frac{1}{2}$ %, diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 254 \text{ nm}$	83
Gambar 5.41 Spektra noda 6 Ekstrak metanol media diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 365 \text{ nm}$	84
Gambar 5.42 Densitogram Ekstrak metanol media kontrol dengan eluen kloroform : metanol : air = 2 : 7 : $\frac{1}{2}$ %, diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 365 \text{ nm}$	84
Gambar 5.43 Spektra noda 2 Ekstrak metanol media kontrol diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 365 \text{ nm}$	85
Gambar 5.44 Profil kromatografi metanol dari miselia Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada tanaman <i>Dioscorea sp</i> dengan etil asetat : metanol : air = 7 : 2 : 1	86
Gambar 5.45 Densitogram Ekstrak metanol miselia dengan eluen etil asetat : metanol : air = 7 : 2 : 1 %, diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 254 \text{ nm}$	88
Gambar 5.46 Spektra noda 3 Ekstrak metanol miselia diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 254 \text{ nm}$	88
Gambar 5.47 Densitogram Ekstrak metanol miselia dengan eluen etil asetat : metanol : air = 7 : 2 : 1 %, diamati dengan sinar UV pada $\lambda = 365 \text{ nm}$	89

## PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang Masalah

Indonesia merupakan salah satu wilayah hutan hujan tropis terbesar di dunia yang sangat potensial sebagai penghasil mikroorganisme tanaman. Hutan di Indonesia memiliki kekayaan dan keragaman spesies tanaman yang beberapa diantaranya telah ditemukan mempunyai manfaat sebagai obat dan dapat digunakan sebagai bahan obat. Hutan sebagai sumber tanaman obat di Indonesia merupakan suatu berkah yang harus ditemukan dan diteliti manfaatnya. Pada kenyataannya, masih sangat sedikit mikroorganisme tanaman yang telah diteliti manfaatnya.

Diantara berbagai tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat dan bahan obat adalah *Dioscorea sp* dari suku *Dioscoreaceae* yang memiliki kandungan pati tinggi terutama amilopektin, vitamin A, vitamin C, protein, asam amino dan juga mengandung diosgenin ( Duke, 1997 ). Diosgenin merupakan senyawa sapogenin steroid dan digunakan sebagai bahan sintetik untuk pembuatan produk hormonal. Diosgenin dapat diubah menjadi ecdisone, pregnenolone dan progesterone dan juga merupakan komponen utama dalam pembuatan obat-obat kortison, progesterone dan obat-obat steroid ( Duke, 1997 ).

Khasiat *Dioscorea sp* telah banyak dimanfaatkan untuk berbagai pengobatan secara turun temurun antara lain sebagai antiinflamasi, rematik, kejang/kram, asma, liver, serta terapi untuk pengobatan hormone reproduksi wanita ( Duke, 1997 ).

Akhir-akhir ini, ditemukan fakta bahwa bahan berkhasiat dari tanaman dapat diproduksi oleh jamur endofit dari tanaman tersebut. Seorang ahli patologi tanaman yang berasal dari Jepang, Yabuta, menemukan bahwa gibberelinc dapat dihasilkan oleh fitopatogenik jamur *Gibberella fujikuroi*. Gibberelinc merupakan suatu hormon tumbuhan yang banyak ditemukan pada tumbuhan tinggi. Hal ini dimungkinkan oleh adanya suatu pertukaran intergenetik-genetik antara tanaman tinggi dan jamur ( Stierle *et al.* 1995 ). Melalui hasil penemuan tersebut, dapat disimpulkan bahwa untuk produksi zat berkhasiat pada suatu tanaman, dapat



memanfaatkan jamur yang diisolasi dari jaringan tanaman tersebut, dikenal dengan mikroba endofit, yang banyak ditemukan pada jaringan tumbuhan ( Faeth, 2004).

Mikroba endofit hidup menumpang dalam suatu jaringan tanaman seperti daun, bunga, ranting maupun akar tanaman ( Clay, 1988 ). Salah satu yang mudah dikembangbiakkan dari kelompok ini adalah jamur. Jamur endofit adalah jamur yang dapat menginfeksi tumbuhan sehat pada jaringan tertentu dari tanaman dan pada umumnya tidak menyebabkan efek yang merugikan bagi tanaman inangnya. ( Faeth, 2004 ). Jamur endofit dapat membantu proses penyerapan unsur hara yang dibutuhkan oleh tanaman inangnya yang digunakan untuk proses fotosintesis serta melindungi tumbuhan inangnya dari serangan penyakit. Hasil fotosintesis itu dapat digunakan untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya ( Bacon, 1991 ; Petrini *et al.*, 1992 ; Rao, 1994 ). Selain itu, jamur endofit juga dapat melindungi tanaman dari serangan insektisida dan menyebabkan tanaman tahan terhadap kekeringan ( Faeth, 2002 ).

Melalui mekanisme yang diduga adalah transfer genetik, kemungkinan senyawa bermanfaat yang terdapat pada tanaman inang juga dapat dihasilkan oleh endofitnya. Misalnya taksol yang merupakan senyawa antikanker yang telah terbukti khasiatnya. Taksol dapat diproduksi oleh *Taxomyces andreane* yang berasosiasi dengan kulit kayu dari tanaman *Taxus brevifolia* ( Stierle *et al.*, 1995 ). Mekanisme transfer genetik juga terbukti pada tanaman-tanaman obat yang telah digunakan secara turun temurun, dimana ditemukan endofit pada tanaman inangnya dan mampu menghasilkan antibiotik.

Isolasi endofit merupakan langkah awal untuk mendapatkan jamur yang dapat dimanfaatkan untuk bahan baku obat. Salah satu hal yang penting dalam isolasi endofit adalah memperoleh bahan tanaman yang segar. Selama penyimpanan, bahan tanaman yang segar harus dijaga agar tidak menjadi kering atau terjadi kontaminasi ( Bills, 1996 ). Adanya kontaminasi dapat dicegah dengan dilakukan beberapa tahap sterilisasi untuk menjamin bahwa yang diisolasi adalah jamur endofit, yaitu melakukan sterilisasi media, tanaman, maupun dengan pengerjaan secara aseptis. Endofit akan mengalami sporulasi ( pembentukan spora ) setelah beberapa minggu dan disimpan pada 15-21°C atau pada suhu kamar. Jamur endofit selanjutnya dikembangbiakkan pada media padat *Potato Dextrose*

Agar dan media cair *Potato Dextrose*. Tahapan awal proses untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder adalah : inokulasi dan ekstraksi. Ekstrak yang diperoleh pada proses tersebut dilakukan identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis dengan mengamati warna noda dan jarak migrasinya dengan lampu UV serta digunakan penampak noda untuk identifikasi dan analisis senyawa metabolit sekunder.

Mengkaji berbagai uraian diatas, endofit bisa dikatakan merupakan suatu temuan yang akan banyak berperan dalam pertanian, industri dan pengobatan di masa yang akan datang. Apabila jamur endofit bisa diisolasi, proses pengambilan senyawa berkhasiat dari tanaman akan lebih mudah, tanpa harus mengambil bahan baku dari alam. Selain itu, diketahui bahwa endofit dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder pada suatu jenis tanaman. Hal ini mendasari penelitian terhadap tanaman *Dioscorea sp.* yang merupakan tumbuhan tinggi yang diduga mengandung jamur endofit. Selanjutnya dapat menjadi langkah awal dilakukannya penelitian terhadap struktur kimia metabolit jamur endofit dari tanaman ini. Selain itu, dengan memanfaatkan jamur endofit untuk menghasilkan senyawa obat yang bermanfaat, diharapkan dapat mengurangi kepunahan spesies tanaman di Indonesia.

## 1.2 Rumusan Masalah

- Apakah jamur endofit dapat diisolasi dari tanaman *Dioscorea sp* ?
- Bagaimanakah cara mengisolasi dan mengidentifikasi jamur endofit dari tanaman *Dioscorea sp* ?
- Bagaimana profil kandungan metabolit jamur endofit dari *Dioscorea sp*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

- Melakukan isolasi dan pemurnian jamur endofit dari jaringan batang, daun dan akar tanaman *Dioscorea sp.*
- Melakukan identifikasi secara makroskopis dan mikroskopis jamur endofit yang telah di isolasi.
- Mengetahui profil kandungan metabolit jamur endofit dari *Dioscorea sp.*

#### **1.4 Manfaat penelitian**

- Memberikan sumbangan dalam ilmu pengetahuan tentang isolasi jamur endofit dan pemanfaatannya sebagai bahan baku obat.
- Mempermudah identifikasi struktur kimia metabolit yang dihasilkan jamur endofit
- Upaya pemanfaatan bahan alam lebih optimal, efektif dan efisien.



## TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang *Dioscorea* sp

## 2.1.1 Klasifikasi

Divisi	: Spennatophyta
Kelas	: Monocotyledonae
Bangsa	: Liliiflorae
Suku / Familia	: Dioscoreaceae
Marga	: <i>Dioscorea</i>
Jenis	: <i>Dioscorea</i> sp

( Bailey, 1953 )

## 2.1.2 Habitus dan Morfologi

Tumbuhan berupa semak atau perdu menahun, memanjat atau membelit, di dalam tanah dengan 1 umbi atau lebih yang cukup besar. kerap kali juga ditemukan umbi pada ketiak daun. Batang terpuntir ke kiri, bersayap 4, gundul. Daun tunggal, yang paling atas saling berhadapan, tangkai bersayap 5, 3 – 18 cm, hijau, atau helaian daun bulat telur, 6 – 27 kali 3 – 16 cm dengan pangkal daun berbentuk jantung dan ujung runcing panjang, bertulang daun 7 – 9. Bunga beraturan, selalu berkelamin 1, berumah 2, terletak dalam bulir. Bulir jantan rapat 1- 3 cm panjangnya, dalam berkas 2 – 8 atau dalam ketiak daun atau sepanjang sumbu malai atau tandan tak berdaun. Bulir betina tidak rapat, panjang 12 – 50 cm, 1 – 2 di dalam ketiak daun. Tenda bunga tinggi 2 mm, hijau atau kuning, tajuk yang terluar lebih besar, dengan yang ketiga yang terdalam. Buah kotak berbentuk buah peer, seperti bola lampu, tinggi 2 – 3 cm, ujung berpunah pendek dan berlekuk lancip serta bersayap 3, pada waktu masak akan pecah sepanjang tepi luar sayap dengan 3 katup. Biji pipih sekelilingnya bersayap, bulat telur terbalik. Tanaman ini tumbuh sepanjang Mei - Juni. Ditanam untuk hasil umbi yang dapat dimakan. Hidup pada ketinggian 1 – 800m. ( Van Steenis, 1987 )

### 2.1.3 Kandungan Kimia

Marga *Dioscorea* memiliki kandungan pati tinggi terutama amilopektin, pro-vitamin A, vitamin C, protein, asam amino. Kandungan utama dari *Dioscorea sp* yaitu diosgenin, yang merupakan sapogenin steroid yang dapat diisolasi dari berbagai spesies tanaman dari familia ini ( Duke, 1997 )

### 2.1.4 Kegunaan Tanaman

Khasiat *Dioscorea sp* yaitu sebagai obat tradisional untuk inflamasi, rematik, kejang/kram, asma, dan liver. Selain itu juga digunakan untuk terapi pengobatan hormone reproduksi wanita. Diosgenin digunakan sebagai bahan sintesis untuk pembuatan produk hormonal. Diosgenin dapat diubah menjadi cedisone, pregnenolone, dan progesterone. Selain itu, diosgenin merupakan komponen utama pembuatan obat-obat kortison, progesterone dan obat-obat steroid. ( Duke, 1997 )

## 2.2 Tinjauan Tentang Jamur

### 2.2.1 Pengertian dan Morfologi Jamur

Jamur merupakan salah satu bagian kelompok organisme eukariota. Organisme ini bereproduksi secara seksual dan aseksual. Jamur ada di lingkungan dan dapat sebagai pembusuk maupun hidup menumpang ( parasit ). Jamur yang parasit hidup menumpang pada hewan, manusia, dan mamalia lain dan ada pula jamur parasit yang menumpang pada tanaman, yang dapat menyebabkan penyakit.

Jamur tergolong tumbuhan Thallophyta yang tidak berklorofil, karenanya tidak mampu berfotosintesis, sehingga memperoleh nutrisi dari lingkungan maupun organisme lain. Tubuhnya terdiri dari filamen-filamen yang disebut hifa dan keseluruhan dari hifa disebut miselium.

Organisme ini terdiri dari tiga kelompok besar dari kingdom jamur yaitu *molds* ( kapang ), *yeast* ( khamir ) dan *mushrooms* ( Madigan., 2000 ).

Ketiga kelompok jamur diatas mempunyai perbedaan pada morfologinya. *Molds* atau kapang merupakan salah satu jamur yang terdiri dari benang-benang halus miselium dan biasanya bereproduksi secara aseksual, dan terkadang secara seksual dengan pembentukan spora. Beberapa hifa dari miselium ini dapat

menembus ke dalam medium untuk mendapatkan makanan ( Pelczar, 1986 ). Kapang dapat dijumpai pada kelas Zygomycotina, Deuteromycotina dan Ascomycotina.

*Yeast* atau khamir dikelompokkan dalam jamur uniseluler dan biasanya termasuk dalam kelas Ascomycotina ( Madigan, 2000 ). Khamir dapat berupa obligat aerob maupun fakultatif anaerob. Apabila tidak tersedia oksigen, khamir memproduksi energi dengan menguhah glukosa menjadi karbondioksida dan etanol ( alkohol ). Khamir bereproduksi secara asksual dan seksual dengan membentuk askospora (Alexopoulos *et al.*, 1996).

*Mushrooms* merupakan kelompok jamur yang mempunyai badan buah yang besar dan adakalanya dapat dikonsumsi. Terdiri dari filamen-filamen hifa yang membentuk miselium. Strukturnya unik, biasanya miselium bersembunyi di bawah kulit kayu, tanah, daun dsl. (Alexopoulos *et al.*, 1996).

### 2.2.2 Sifat Umum Jamur

Jamur mempunyai sifat umum tidak memiliki akar, batang, daun maupun jaringan pengangkut, tidak berklorofil sehingga tidak berfotosintesis, memproduksi spora, umumnya tumbuh pada pH asam hingga pH 6 dengan suhu optimum antara 20° C hingga 30° C. Jamur tidak memerlukan cahaya untuk hidupnya ( Pelczar, 1986 ). Meski tidak dapat memproduksi makanan karena tidak memiliki klorofil, apabila diberikan nutrisi karbohidrat seperti glukosa, sukrosa atau maltosa, beberapa jamur mampu melakukan sintesis protein untuk pertumbuhannya ( Alexopoulos, 1962 ).

### 2.2.3 Media Kultur Jamur

Saat ini telah dikenal beberapa macam media kultur untuk mengembangbiakkan jamur. Penggolongannya berdasarkan pada tujuan dan sifat jamur yang akan dibiakkan.

Media untuk mengkultur jamur mengandung beberapa konstituen yang berupa sumber karbon, sumber nitrogen dan vitamin. Sebagai contoh adalah digwakannya glukosa atau gliserol sebagai sumber karbon; garam ammonium atau nitrat sebagai sumber nitrogen ). Jamur memiliki defisiensi alami terhadap vitamin yang terjadi secara alami, yaitu thiamin dan biotin.

Beberapa media yang sering digunakan dalam media kultur jamur adalah :

- (1). *Water Agar ( WA )*, digunakan untuk mengisolasi jamur dari permukaan substrat steril.
- (2). *Antibiotik Agar ( AA )*, digunakan untuk mengisolasi jamur dari substrat yang permukaannya belum disterilisasi atau untuk membersihkan kultur dari kontaminasi.
- (3). *Acidified Cornmeal Agar ( ACMA )*, digunakan untuk mengisolasi jamur dari substrat yang seringkali terkontaminasi dengan bakteri. Media ini bukan merupakan media pengganti AA, tetapi adanya suasana asam akan menghambat bakteri dan mendukung pertumbuhan jamur.
- (4). *Cornmeal Agar ( CMA )*, digunakan untuk pertumbuhan jamur, terutama anggota jamur imperfikti, dimana jamur ini membutuhkan keseimbangan yang baik antara pertumbuhan miselia dan sporulasi.
- (5). *Potato Carrot Agar ( PCA )*, merupakan media yang relative lemah, biasanya dikombinasikan dengan CMA dan baik untuk beberapa jamur imperfikti.
- (6). *Malt Agar ( MA )*, merupakan media yang tidak mengandung peptone, biasanya untuk mengkultur species jamur yang pertumbuhannya dihambat oleh peptone.
- (7). *Malt Ekstract Agar ( MEA )*, merupakan media yang baik untuk pertumbuhan jamur tanah, jamur yang diisolasi dari kayu atau batang tanaman dll.
- (8). *Potato Dextrose Agar ( PDA )*, merupakan media kaya untuk pertumbuhan jamur.
- (9). *Potato Dextrose-Yeast Ekstract Agar ( PDYA )*, merupakan jenis media yang baik untuk menumbuhkan kultur yang berasal dari *mushroom*.

( Anonim, 2004 )

### 2.3 Tinjauan Tentang Jamur Endofit

Jamur endofit merupakan suatu mikroorganisme yang hidup menumpang pada jaringan tanaman seperti daun, bunga, ranting maupun akar tanaman ( Clay, 1988 ). Jamur ini dapat menginfeksi tumbuhan sehat pada jaringan tertentu dan mampu menghasilkan nikotoksin, enzim, serta antibiotika ( Carroll, 1988 ; Clay, 1988 ). Asosiasi beberapa jamur endofit dengan tumbuhan inangnya memungkinkan adanya suatu transfer genetik sehingga dapat diperkirakan senyawa bermanfaat yang dihasilkan oleh tanaman inangnya juga akan dihasilkan oleh endofitnya. Selain itu, pada asosiasi endofit dengan inangnya, jamur ini dapat membantu proses penyerapan unsur hara yang dihirup oleh tanaman inangnya untuk proses fotosintesis serta melindungi tumbuhan inangnya dari serangan penyakit. Hasil fotosintesis itu dapat digunakan untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya ( Bacon, 1991 ; Petrini *et al*, 1992 ; Rao, 1994 ).

Asosiasi fungi endofit dengan tumbuhan inangnya, oleh Carroll (1988) digolongkan dalam dua kelompok, yaitu mutualisme konstitutif dan induktif. Mutualisme konstitutif merupakan asosiasi yang erat antara fungi dengan tumbuhan terutama rumput-rumputan. Pada kelompok ini fungi endofit menginfeksi ovula (benih) inang, dan penyebarannya melalui benih serta organ penyerbukan inang. Mutualisme induktif adalah asosiasi antara fungi dengan tumbuhan inang, yang penyebarannya terjadi secara bebas melalui air dan udara. Jenis ini hanya menginfeksi bagian vegetatif inang dan seringkali berada dalam keadaan metabolisme inaktif pada periode yang cukup lama.

### 2.4. Tinjauan Tentang Isolasi Jamur Endofit

Isolasi endofit merupakan langkah awal untuk mendapatkan jamur yang dapat dimanfaatkan untuk bahan baku obat. Salah satu hal yang penting dalam isolasi endofit adalah memperoleh bahan tanaman yang segar. Selama penyimpanan, bahan tanaman yang segar harus dijaga agar tidak menjadi kering atau terjadi kontaminasi dengan bakteri lain ( Bills, 1996 ). Dalam mengisolasi endofit, digunakan etanol yang bertindak sebagai surfaktan dan NaOCl sebagai bahan pensteril. Dilusi dan waktu pencelupan dalam NaOCl berbeda-beda untuk tiap-tiap jaringan. Namun penggunaan larutan Sodium hypochlorit secara spontan



akan menurun kadarnya pada penyimpanan, sehingga dapat digunakan 0,05%-1% asam perasetik dalam 30% Etanol sebagai alternatif pengganti Sodium hypochlorite ( Dreyfuss, in Bills, 1996 ). Pencelupan dalam Etanol yang diikuti dengan pemanasan akan memberikan hasil yang lebih bagus, terutama digunakan untuk "canker forming fungus". Kepingan kayu dan kulit kayu di sterilkan lebih dahulu dalam etanol kemudian dilakukan pemanasan sebelum ditempatkan dalam plate agar.

Endofit akan mengalami sporulasi (pembentukan spora) setelah beberapa minggu dan disimpan pada 15-21°C dalam keadaan gelap, atau pencahayaan pada 1% *malt extract* agar (MEA). Pencahayaan dibawah flouresensi pada suhu 8° C atau dengan sinar UV dekat atau diinkubasi pada suhu 4°C di kegelapan mungkin dapat menumbuhkan spora. Pemindahan ke media alami seperti *corn meal* agar, *V8* agar, *potato carrot* agar dll juga akan dapat menumbuhkan spora (Bills, 1996). Pada proses isolasi ini, digunakan 2 macam media *malt extract* agar (MEA), dimana salah satunya dengan menggunakan air hasil rebusan tanaman ( 60 g/L ) sebagai pelarut media dan berfungsi untuk memacu pertumbuhan endofit. Air hasil rebusan tanaman ini bisa disebut sebagai infus tanaman, yang mempunyai definisi sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati dengan air pada suhu 90° C selama 15 menit ( Anonim, 1995 )

Metode lain untuk mengisolasi endofit adalah seperti yang dilaporkan oleh Bacon pada tahun 1988. Tanaman segar dikumpulkan, kemudian di potong-potong bagian pelepah daunnya. Bagian daun yang mengganggu dihilangkan, kemudian pelepah dibersihkan dan dipotong = 3 cm. Pelepah tersebut ditempatkan pada wadah steril yang berisi 30 ml pemutih yang mengandung 5-25 % hypoklorit, direndam selama 5 menit. Selanjutnya pemutih dibuang dan pelepah dibilas dengan air destilasi satu kali.

Bagian pelepah daun tersebut diletakkan secara aseptis pada cawan petri steril dan dipotong 0,5 cm dari pangkal pelepah daun. Selanjutnya pelepah tersebut dipotong lagi menjadi 2 bagian. 1 bagian ditanam dan sedikit ditekan sehingga potongan tersebut terbenam dalam media. Sedangkan bagian yang lain ditanam biasa dalam media dan digunakan sebagai kontrol. Untuk bagian batang diperlakukan sama dengan pelepah daun, tetapi batangnya dipotong secara longitudinal.

Jaringan tumbuhan tersebut diletakkan dalam sebuah Erlenmeyer berukuran 125ml yang mengandung 50 ml medium cair ( yang terdiri dari *sucrose* 30 gram, *malt extract* 20 gram, *peptone, Detroit*, *mitch* 2 gram, *yeast extract* 1 gram,  $MgSO_4$  0.5 gram,  $KCl$  0.5 gram,  $KH_2PO_4$  1 gram, kloramfenikol 0.05 gram, ditambah air distilasi 1000ml). Medium di sesuaikan pH nya dengan 10N NaOH hingga pH 6. Jamur induk diinokulasikan dalam erlenmeyer , kemudian ditutup dengan sumbat sterofom, dan ditempatkan dalam *shaker gyrotory* dengan kecepatan 1200 rpm. Jamur akan menginfeksi jaringan tumbuhan dalam Petri atau Erlenmeyer setelah diinkubasi pada 24° C. dalam cahaya gelap yang konstan dan setelah 4 minggu miseliumnya akan terlihat jelas.

**Tabel II.1. Waktu Sterilisasi dan Konsentrasi NaOCl yang Digunakan untuk Isolasi Endofit**

Spesies tanaman	Waktu pencelupan dalam NaOCl	Pengenceran NaOCl	Pustaka
Bangsa Lumut	1 menit	1:5	Petrini ( 1986 )
Lumut	1 menit	1:5	Petrini ( 1986 )
Paku/pakis	3 menit	1:5	Dreyfuss & Petrini ( 1984 )
Pohon jarum	5 menit	1:2	Carrol & Carrol ( 1978 )
Ranting pohon	7 menit	1:2	Carrol & Carrol ( 1978 )
Daun monokotil pada <i>Triticum</i>	3 menit	1:5	Petrini ( 1986 )
Dikotil	3 menit	1:5	Petrini ( 1986 )
Daun <i>Erica</i>	3 menit	1:5	Petrini ( 1986 )
Batang <i>Erica</i>	5 menit	1:5	Petrini ( 1986 )
<i>Rhododendron</i>	3 menit	1:5	Petrini ( 1985 )
<i>Vaccinium</i>	3 menit	1:5	Petrini ( 1985 )

Sumber : Bills, 1996

Tabel II.2. Contoh prosedur isolasi untuk endofit dari tanaman

Jaringan	Pemotongan jaringan	Sterilisasi	Media
Batang <i>Ulex</i>	2cm bagian daun dan batang	1 menit Etanol : 3 menit NaOCl 25% ; 0,5 menit Etanol 96%	<i>Malt extract agar</i>
Kulit kayu <i>Fagus</i>	2mm bagian kulit kayu	Dalam propane atau tidak dilakukan sterilisasi	<i>Bark extract, glucose yeast extract, benomyl Malt extract agar</i>
Xilem dan kulit kayu <i>Abies</i>	1cm bagian batang, kulit kayu dan xilem	Asam Parasetik 35%	<i>Malt extract</i> yang mengandung 10mg/l cyclosporin A
Kulit kayu <i>Castanea</i> dan <i>Quercus</i>	5 mm potongan kulit kayu	10 menit 0,525 % NaOCl	<i>Glucose yeast extract</i>
Batang <i>Picea</i>	Bagian batang ditusuk-tusuk, kemudian dikeruk	Alat untuk ekstraksi di sterilkan	<i>Malt agar miring</i>
Akar <i>Picea</i>	1cm bagian akar	Direndam,diultrasonik, dicuci berturut-turut	<i>Malt extract agar</i>
Ranting <i>Fraxinus, Quercus</i> dan <i>Fagus</i>	2 cm kulit kayu dan xylem	Dipanaskan dan Etanol	<i>Malt extract agar</i>
Kulit kayu <i>Carpinus</i>	1cm bagian kulit kayu	3 menit 0,525 % NaOCl	<i>Malt extract agar + benomyl dan surfaktan</i>
Semaian <i>Rhizopora</i>	1,1 cm potongan radikal	Disterilkan dengan air laut yang telah dicuci dgn 0,1 % HgCl <sub>2</sub> dalam etanol 5%	<i>Mangrove</i> dari air laut
Daun <i>Licuala</i>	3 mm jaringan pengangkutan daun	1 menit Etanol 96%, 10 menit NaOCl 3.25%, 0,5 menit Etanol 96%	<i>Cornmeal dextrose agar, Malt extract agar</i>
Daun <i>Euterpe</i>	3 mm jaringan pengangkutan daun	1 menit Etanol 75%, 10 menit NaOCl 3.25%, 0,5 menit Etanol 75%	<i>Cornmeal dextrose agar</i> yang mengandung 5mg/l cyclosporin A

Sumber : Bills, 1996

## 2.5. Tinjauan Tentang Identifikasi Jamur Secara Umum

Berikut ini merupakan beberapa teknik yang digunakan dalam klasifikasi dan identifikasi jamur.

- **Klasifikasi dan identifikasi**

Sebelum melakukan identifikasi terhadap suatu jamur yang ditemukan, maka tahap awal adalah melakukan klasifikasi terhadap jamur tersebut. Klasifikasi digunakan untuk menjawab apakah satu jamur mempunyai hubungan dengan jamur yang lain? Hal ini untuk mengetahui aspek-aspek yang berbeda dari struktur jamur baik secara mikroskopik maupun makroskopik. Perbedaan yang timbul dapat dijadikan suatu bukti apakah kedua jamur saling berhubungan atau tidak. Sedangkan identifikasi digunakan untuk menjawab pertanyaan apakah nama jamur yang ditemukan itu. Teknik klasifikasi sangat membantu dalam proses identifikasi suatu jamur.

Saat ini, klasifikasi sudah menjadi hal yang tidak terlalu penting dalam proses identifikasi. Hal ini dikarenakan ada teknik analisis menggunakan DNA yang secara luas telah digunakan untuk memeriksa adanya hubungan antara 2 organisme yang berbeda. Apabila jamur yang diperiksa mempunyai kesesuaian DNA dengan jamur pembandingnya, maka dapat dipastikan bahwa jamur tersebut memiliki hubungan yang dekat dengan pembandingnya tersebut. Pemeriksaan DNA pada analisis ini menggunakan metode PCR ( Polimerase Chain Reaction ) dan RFLP ( Restriction Fragment Length Polimorfism ).

- **Identifikasi secara makroskopis**

Identifikasi secara makroskopis dilakukan untuk menjelaskan dan mengilustrasikan jenis jamur yang ditemukan secara visual. Dalam hal ini dilakukan pengamatan dengan menggunakan mata untuk membandingkan antara jamur yang baru ditemukan dengan jamur lain yang telah diketahui jenisnya. Apabila mengalami kesulitan, dapat digunakan media foto untuk membandingkan jamur tersebut.

- Identifikasi secara mikroskopis

Identifikasi secara mikroskopis dilakukan untuk memperkuat dugaan kebenaran mengenai identitas jamur yang baru ditemukan, yaitu dengan menggunakan bantuan mikroskop. Untuk dapat melakukan identifikasi ini, ada beberapa contoh yang perlu dipersiapkan, diantaranya adalah :

- Kultur dari 3 kelas besar jamur yaitu Basidiomycetes ( misalnya : *Agaricus*), Ascomycetes ( misalnya : *Penicillium*, *Sacharomycetes*) dan Zygomycetes ( misalnya : *Rhizopus*, *Pilobolus* ), diletakkan dalam kaca mikroskop.
- Media yang mengandung glukosa, sukrosa atau laktosa
- Kultur jamur yang akan diidentifikasi
- *Lactophenol cotton blue*
- Kaca mikroskop dan pisau

Adapun tahap identifikasinya adalah :

- Jamur diletakkan pada kaca mikroskop, kemudian diberi pewarna *lactophenol cotton blue* dan diperiksa dengan mikroskop pada pembesaran 10 dan 40x
- Diidentifikasi kelas dari jamur, dengan membandingkan struktur jamur pada mikroskop, untuk identifikasi selanjutnya digunakan tahapan untuk tiap-tiap genus.

#### *Agaricus*

- Biakan jamur dibasahi dalam kaca mikroskop dengan sedikit *lactophenol cotton blue*
- Diperiksa dengan mikroskop pada pembesaran 10 dan 40x, diamati basidia dan basidiosporanya

#### *Penicillium*

- Diperiksa dengan mikroskop pada pembesaran 10 dan 40x, diamati hifa, konidia dan konidiospora

*Sacharomyces*

- Biakan jamur dibasahi dalam kaca mikroskop dengan sedikit *lactophenol cotton blue*
- Diinokulasikan dalam media yang mengandung glukosa, sukrosa atau laktosa. Diamati produksi CO<sub>2</sub> pada ketiga media.

*Rhizopus*

- Dilakukan pengamatan pada pembesaran 10x dan 40x. Diamati perbedaan hifa, spora, sporangiospora, zygospora dan sporangiospora.

( Lepp, 2005 )

## 2.6. Tinjauan Tentang Metabolit

Mikroorganisme mempunyai kemampuan untuk memproduksi metabolit primer dan sekunder. Metabolit primer adalah metabolit yang dihasilkan oleh tumbuhan yang diperlukan untuk proses kehidupannya dan reproduksi sel ( *Crueger et al., 1982* ). Gula, asam amino, asam lemak, nukleotida merupakan beberapa contoh metabolit primer ( *Mann, 1978* ).

Metabolit sekunder adalah senyawa yang dibentuk oleh tanaman dalam bentuk tertentu dan hanya organisme tertentu pula yang dapat menghasilkannya ( *Crueger et al., 1982* ). Metabolit sekunder yang dihasilkan digunakan untuk mempertahankan diri dari lingkungan sekitar, misalnya dalam menghadapi spesies lain seperti jamur dan mikroba, tanaman mengeluarkan zat yang disebut fitoleksin ( *Manitto, 1982* ). Namun, metabolit sekunder ini tidak mempunyai peranan penting dalam proses pertumbuhan dan reproduksi ( *Crueger et al., 1982* ).

Pada system *in vitro* dari sel tanaman, belum tentu suatu tanaman dapat melakukan biosintesis yang identik dengan tanaman *in vivo*nya. Hal ini merupakan pengaruh dari faktor-faktor lingkungan, seperti nutrisi dan cahaya, yang dapat menstimulasi atau menghambat ekspresi gen-gen tertentu.

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder antara lain komposisi dan konstituen media yang digunakan, pH media, suhu, kecepatan agitasi pada kultur suspensi dan cahaya ( *Indrayanto, 1988* ).

## 2.7 Tinjauan Tentang Ekstraksi

Ekstrak merupakan sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia hewani atau nabati dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan masa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan ( Anonim, 1995 )

Pelarut yang digunakan dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang optimal untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat terpisahkan dari bahan dan kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung sebagian besar dari senyawa kandungan yang diinginkan. Pada ekstraksi total, pelarut yang digunakan adalah yang dapat melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung. Faktor utama dalam pertimbangan pemilihan pelarut adalah selektivitas, kemudahan bekerja dengan pelarut tersebut, ekonomis, ramah lingkungan dan keamanan.

Proses setelah ekstraksi adalah separasi dan pemurnian yang merupakan proses untuk menghilangkan senyawa yang tidak dikehendaki sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni. Proses ini meliputi pengendapan, pemisahan dua cairan tidak campur, sentrifugasi, dekantasi dan filtrasi. Ekstrak yang telah dimurnikan selanjutnya dipekatkan dengan tujuan untuk mendapatkan jumlah senyawa terlarut secara penguapan pelarut tanpa sampai menjadi kondisi setengah kering atau ekstrak menjadi lebih kental ( Anonim, 2000 ).

### 2.7.1 Metode Ekstraksi

Beberapa macam metode ekstraksi secara umum adalah maserasi, perkolasi, sokhlet, dan ekstraksi cair-cair. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan.

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang pada umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri tahapan pengembangan bahan, maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya, terus menerus sampai diperoleh ekstrak yang jumlahnya  $1\frac{1}{2}$  kali bahan.

Soklet adalah ekstraksi dengan menggunakan yang umumnya dilakukan dengan suatu alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dan dengan adanya pendingin balik ( Anonim, 2000 ).

Ekstraksi cair-cair digunakan untuk ekstraksi bahan-bahan dalam larutan yang homogen. Selain itu dapat pula diartikan bahwa pelarut kedua tidak saling campur dengan pelarut pertama dan komponen-komponennya dapat terdistribusi dalam campuran kedua fase tersebut ( Hanson, 1971 ).

## 2.8 Tinjauan Tentang Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran zat yang didasarkan atas perbedaan kecepatan migrasi dari masing-masing komponennya pada fase diam di bawah pengaruh fase gerak. Dipakai suatu lapis tipis absorbans yang ditaburkan pada bahan yang inert seperti kaca, plastik, aluminium atau logam metal sebagai fase diam ( Helfman, 1975 ).

### 2.8.1 Kromatografi Lapis Tipis

Mekanisme pemisahan pada KLT ada beberapa macam yaitu adsorpsi, partisi, pertukaran ion, dan elektroforesis. Namun, metode yang sering dipakai adalah adsorpsi dan partisi. Keuntungan metode ini dibandingkan metode lain adalah memerlukan jumlah sample yang relatif sedikit dan waktu yang lebih singkat, serta memberikan hasil yang cukup baik ( Stahl, 1985 ).

Prinsip dasar kromatografi adalah mengubah keadaan distribusi statis menjadi system keseimbangan yang dinamis pada fase diam dan fase gerak, dalam hal ini pemisahan senyawa akan terjadi berdasarkan perbedaan laju migrasi senyawa tersebut pada fase diam yang berada di bawah pengaruh pergerakan fase gerak. Pada KLT, proses mengalminya fase gerak adalah berdasarkan asas kapiler. Fase diam KLT berupa lapis tipis ( tebal lapisan 0,1-0,2 mm ), terdiri dari bahan plat ( misalnya silica gel, selulosa, poliamida dan alumina ) yang dilepiskan pada permukaan penyangga dasar ( misalnya kaca, pelat polimer atau logam ). Pada tehnik ini, sampel berupa larutan yang ditotolkan pada pelat atau kempeng kromatografi kemudian dieluasi dengan eluen yang sesuai sehingga terjadi pemisahan yang baik dari campuran zat tersebut. Pada proses penotolan, dapat digunakan mikropipet. KLT dapat digunakan untuk analisis kualitatif, kuantitatif



maupun preparative. Analisis kualitatif dideteksi dengan membandingkan warna noda dan harga  $R_f$  ( Retardation Factor ) sample dengan harga  $R_f$  pembanding ( Stahl, 1985 ).

$$R_f = \frac{S_0}{S}$$

Keterangan :  $S_0$  = jarak noda dari titik awal

$S$  = jarak noda yang ditempuh pelarut

Suatu senyawa yang bermigrasi hingga ke tepi muka pelarut mempunyai harga  $R_f = 1,0$ , sebaliknya, senyawa yang tetap tinggal pada titik awal mempunyai harga  $R_f = 0$ , artinya, tidak terjadi pemisahan senyawa. Harga  $R_f$  untuk senyawa yang terpisah selalu lebih kecil dari satu dan secara teoritik tidak tergantung dari panjang pelat tipis. Harga  $R_f$  tergantung dari faktor-faktor seperti pelarut, kelembapan udara, konsentrasi dan komposisi larutan yang diperiksa panjang trayek migrasi serta senyawa asing.

Reproduksibel atau tidaknya harga suatu  $R_f$  tergantung dari mutu dan sifat yang tetap, lapisan penjerap, jumlah senyawa yang ditotolkan, suhu ruang dan derajat kejenuhan bejana pemisah ( Stahl, 1985 ).

### 2.8.2 Tinjauan Tentang Densitometri

Densitometri merupakan tehnik analisis yang mengukur absorbansi ultraviolet sinar tampak, fluoresensi atau pemadaman fluoresensi secara langsung melalui pelat KLT ( Fried and Sherma, 1994 )

Penggunaan *scanner* pada KLT-Densitometer bertujuan untuk mengubah noda pelat KLT menjadi suatu spectrum kromatogram yang terdiri dari puncak-puncak yang menyerupai kromatogram yang dihasilkan oleh kromatografi gas maupun HPLC.

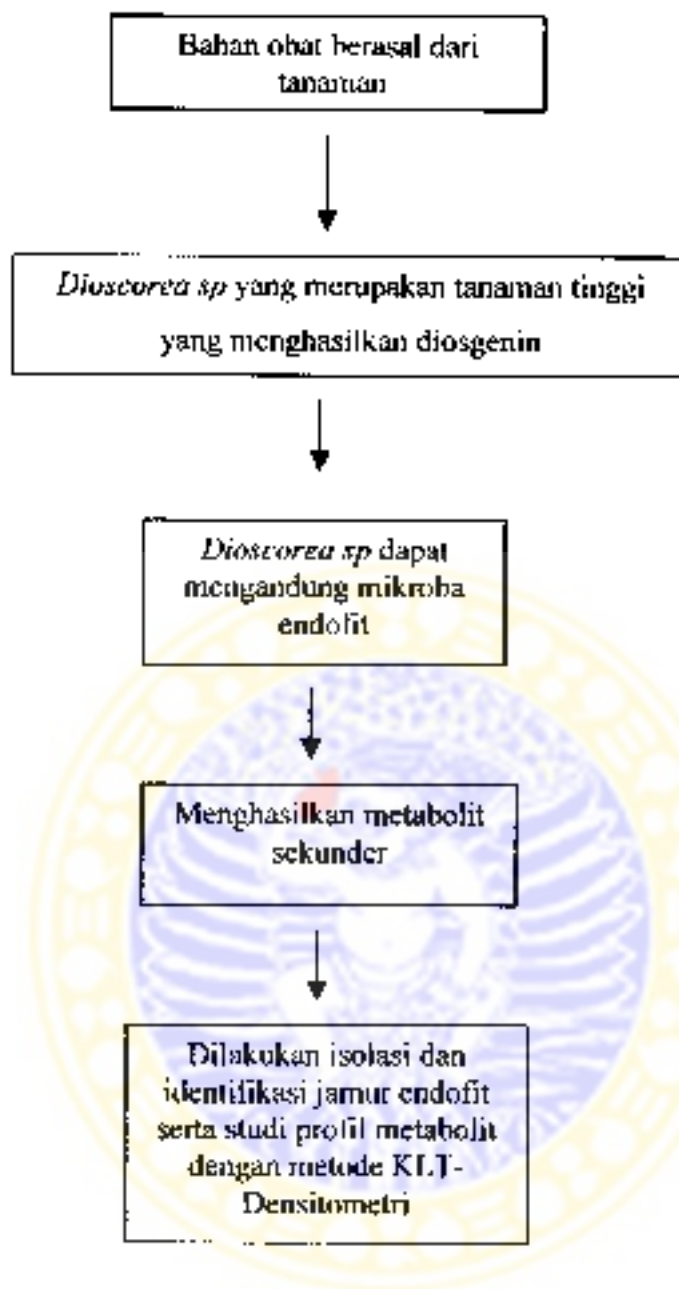
Metode densitometri dipilih karena mempunyai spesifisitas yang tinggi dan dapat memberikan hasil yang relatif cepat dan akurat. Metode ini juga dapat digunakan untuk analisa campuran senyawa tanpa saling mengganggu ( Fried, 1994; Poolc, 1991 ).

**KERANGKA KONSEPTUAL**

Jamur endofit merupakan organisme mikro yang hidup menumpang dalam suatu jaringan tanaman seperti daun, bunga, ranting maupun akar tanaman. Asosiasi jamur endofit dengan tumbuhan inangnya memungkinkan adanya transfer genetik sehingga diperkirakan senyawa bermanfaat yang dihasilkan oleh tanaman inangnya juga akan dihasilkan oleh endofitnya.

*Dioscorea sp* termasuk tumbuhan tinggi sehingga diduga dapat menghasilkan endofit yang dapat berupa jamur maupun bakteri.

Apabila jamur endofit bisa diisolasi, proses pengambilan senyawa berkhasiat dari tanaman akan lebih mudah, tanpa harus mengambil bahan baku dari alam. Selain itu, dugaan terjadinya transfer genetik menunjukkan bahwa fungi endofit dapat melindungi dan mempengaruhi produksi metabolit sekunder pada tanaman inangnya. Untuk mengetahui macam metabolit sekunder yang dihasilkan, maka dilakukan analisis secara KLT-Dasitometri. Hal ini yang mendasari penelitian terhadap endofit dari *Dioscorea sp* habitat Kebun Raya Purwodadi.



**Gambar 3.1** Skema Kerangka Konseptual

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Bahan Penelitian

##### 4.1.1 Bahan tumbuhan

Dalam penelitian ini digunakan semua bagian tumbuhan dari *Dioscorea sp* yang meliputi akar, batang dan daun. Adapun tumbuhan *Dioscorea sp* diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur yang belum teridentifikasi. Tanaman ini diambil pada tanggal 15 Mei 2005 dan 19 September 2005.

##### 4.1.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Air suling
- Natrium hipoklorida  
( NaOCl / khlorox ; Sunclin )
- Alkohol 70 %
- *Malt extract agar* ( Difco <sup>TM</sup>  
*Malt Extract Broth* )
- Agar ( teknis )
- Kloramfenikol
- *Potato Dextrase Agar*  
( Merck Darmstad, Jerman )
- *Sabouroud Dextrose Agar*
- Dextrose
- Fe sulfat
- Mg sulfat
- KCl
- Fosfat dipotassium
- Sodium nitrat
- Methanol p.a (Merck Darmstad,  
Jerman )
- N-Heksan p.a (Merck  
Darmstad, Jerman )
- Etil asetat p.a (Merck  
Darmstad, Jerman )
- Methanol teknis redestilata
- N-Heksan teknis redestilata
- Etil asetat teknis redestilata
- Anisaldehyd-asam sulfat
- Dragendorf
- Vanilin-asam sulfat

## 4.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- *Laminair Air Flow Cabinet* ( Dalton type PCV-750-APG )
- Autoclave ( Huxley HL-340 Speedy )
- Timbangan analitik ( Alsep )
- Oven Venticell MMM Medocenter Type 111 dan 222
- Lempong *Kieselgel F-254* ( Merek Darmstadt )
- Vakum rotavapour ( Laborota 4000 Heidolph )
- Bejana kromatografi
- Seperangkat alat densitometer Camag TLC Scanner Lampu UV
- Mikroskop elektronik ( Triukuler BX 41 TF Olympus tahun 2003, Japan )
- JAU ultrasonic ( 2010 Jinwoo-Alex )
- Osc
- Pembakar spirtus
- Kapas
- Parafin film
- Berbagai alat gelas

## 4.3 Prosedur Penelitian

### 4.3.1 Penyiapan alat

Semua alat yang digunakan untuk proses pembuatan media padat seperti alat gelas dll dicuci bersih dan dibilas dengan air suling. Setelah kering, cawan petri dan beker gelas dibungkus rapat dengan kertas perkamen, sedangkan Erlenmeyer diisi dengan air suling dan ditutup dengan kapas serta aluminium foil. Semua alat disterilkan menggunakan autoclave pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 20$  menit.

## 4.3.2 Pembuatan Media

### 4.3.2.1 Pembuatan Media Padat ( awal )

Ditimbang sebanyak 15 gram *malt extract*, 15 gram agar, dan 0,2 gram kloramfenikol kemudian dimasukkan ke dalam beker gelas dan ditambahkan air suling hingga 1 liter. Campuran dipanaskan hingga semua bahan terlarut. Campuran dituang kedalam tiap tabung reaksi sebanyak  $\pm 8$  ml dan ditutup dengan kapas steril kemudian dilakukan proses sterilisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 20$  menit.

### 4.3.2.2 Pembuatan Media Padat ( tahap 2 )

Ditimbang 60 gram tanaman *Dioscorea sp* kemudian ditambah air suling 1,5 L dan dipanaskan selama 15 menit dan diambil airnya. Ditimbang sebanyak 15 gram *malt extract*, 15 gram agar, dan 0,2 gram kloramfenikol kemudian dimasukkan ke dalam beker gelas dan ditambahkan air yang mengandung serbuk tanaman hingga 1 liter. Campuran dipanaskan hingga semua bahan terlarut. Campuran dituang kedalam tiap tabung reaksi sebanyak  $\pm 8$  ml dan ditutup dengan kapas kemudian dilakukan proses sterilisasi dengan menggunakan autoclave pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 20$  menit.

### 4.3.2.3 Pembuatan Media Padat dalam Cawan Petri

Larutan media dalam tabung reaksi ( baik yang dilarutkan menggunakan air suling maupun air tanaman ) yang telah cair dan disterilkan dituang ke dalam cawan Petri. Semua kegiatan dilakukan di dalam *Laminair Air Flow Cabinet*. Selama proses penuangan, hendaknya dilakukan di dekat api spiritus dan semua alat sebelum dan setelah digunakan ( seperti mulut tabung dan cawan Petri ) dipijar di atas api dengan tujuan untuk meminimalkan kontaminasi. Setelah dituang, cawan Petri yang berisi larutan media didiamkan sebentar dan setelah padat ditutup dengan parafin film. Media ini baru dapat digunakan setelah 3 hari dari waktu pembuatan untuk menjamin sterilitasnya.

#### 4.3.2.4 Pembuatan Media Agar Miring

Larutan media dalam labung reaksi yang telah cair dan disterilkan, diletakkan dalam posisi miring serta ditinggikan pada suhu kamar. Media ini baru dapat digunakan setelah 3 hari dari waktu pembuatan untuk menjamin sterilitasnya.

#### 4.3.3 Penyiapan Tanaman

Bagian tanaman *Dioscorea sp* yang terdiri dari akar, batang dan daun dicuci bersih dan dibilas dengan air suling untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang menempel, kemudian dipotong-potong dan disimpan dalam lemari pendingin hingga waktu penanaman.

#### 4.3.4 Proses Penanaman Bagian Tumbuhan

Bagian tanaman *Dioscorea sp* yang terdiri dari akar, batang dan daun dicuci bersih dan dibilas dengan air suling. Bagian ujung akar, batang dan bagian daun dimana terdapat tulang daun dipotong-potong  $\pm 3 - 4$  cm dan dimasukkan ke dalam beker gelas yang berisi air suling steril kemudian direndam beberapa saat. Potongan tanaman diambil dengan menggunakan pinset steril, pindah dan rendam dalam alkohol 70% (dilakukan optimasi waktu lama perendaman, seperti 3, 5, 7, 10 menit dst). Kemudian ambil tanaman dengan pinset, pindah dan rendam dalam beker yang berisi larutan khlorox (dilakukan optimasi konsentrasi khlorox seperti 50%, 60%, atau 70% dan optimasi lama perendaman seperti 50, 60 atau 70 menit). Potongan tanaman dipindahkan pada beker yang berisi etanol 70% (lakukan optimasi waktu lama perendaman, seperti 3, 5, 7, 10 menit dst). Proses terakhir, potongan tanaman dibilas dengan air suling steril 3 kali, ditiriskan dari air dan siap untuk ditanam pada media.

Untuk proses penanaman, diambil potongan tanaman, diletakkan pada Petri yang berisi media steril. Bagian pinggir Petri dipanaskan untuk mengurangi kontaminasi, kemudian ditutup dengan parafin film.

### **4.3.5 Proses Pemiudaban Tanaman Dari Media Awal**

Setelah proses penanaman potongan tanaman pada media awal selesai, Petri didiamkan selama 4 minggu. Apabila tidak ada pertumbuhan endofit, maka potongan tanaman tersebut dipindahkan ke media yang mengandung air tanaman. Selanjutnya ditanam dan ditutup dengan parafin film.

### **4.3.6 Proses Pemotongan Bagian Tanaman**

Petri yang berisi tanaman dibuka dan diambil potongan dengan pinset steril, kemudian potongan tanaman tersebut di potong-potong menjadi bagian yang lebih kecil = 2 cm, ditutup dengan parafin film.

### **4.3.7 Proses Pemurnian Jamur Endofit**

Jamur yang diduga endofit, diinokulasikan ke dalam media miring, kemudian diinkubasi pada suhu kamar. Hasilnya ditunggu selama beberapa hari untuk pertumbuhan. Apabila belum didapatkan jamur yang murni, maka dipisahkan berdasarkan pengamatan visual terhadap bentuk dan warna koloni jamur.

### **4.3.8 Penyiapan Studi Profil Metabolit**

#### **4.3.8.1 Penyiapan Alat**

Alat-alat yang akan digunakan dalam proses pembuatan kultur induk disterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama  $\pm 20$  menit dan dengan alkohol 70 %. Ruang *Laminair Air Flow Cabinet* dibersihkan dengan alkohol 70 % kemudian dilakukan penyinaran dengan lampu UV selama 15-30 menit. Tangan terlebih dahulu didisinfeksi dengan alkohol 70 % saat akan bekerja dalam ruang *Laminair Air Flow Cabinet*.

#### **4.3.8.2 Pembuatan Media Cair**

Ditimbang 300 gram kentang segar yang telah dicuci bersih kemudian ditambahkan air suling hingga 1 liter dan dilakukan pemanasan selama = 15 menit ( infus kentang ). Apabila air menyusut akibat penguapan, maka dapat ditambahkan air suling hingga tepat 1 liter. Infus kentang kemudian disaring dan ditambahkan dekstrosa sebanyak 20 gram pada filtratnya. Media yang telah larut



dan homogen dituang ke dalam botol masing-masing dengan volume  $\pm$  50 ml kemudian ditutup dengan kapas bersih dan aluminium. Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 ° C selama  $\pm$  20 menit. Media yang telah steril kemudian diinkubasi selama  $\pm$  3 hari untuk jaminan sterilitas media.

#### 4.3.8.3 Pembuatan Kultur Induk

Dilakukan persiapan seperti poin 4.3.8.1. Kemudian disiapkan media padat agar miring yang akan digunakan untuk inokulasi jamur. Tutup tabung reaksi tempat inokulum jamur dibuka dan bagian mulut tabung dipijar terlebih dahulu sebelum melakukan inokulasi jamur. Tutup tabung reaksi yang berisi media agar miring yang baru juga dibuka dan dipijar terlebih dahulu. Jamur endofit dari media agar padat diinokulasikan pada media padat agar miring yang baru dengan menggunakan ose steril pada kondisi aseptis. Mulut tabung kembali dipijar setelah dilakukan inokulasi jamur dan kemudian ditutup dengan kapas. Setelah dilakukan inokulasi jamur, tabung diberi label dan disimpan pada tempat yang bersih bersuhu ruang. Lama penyimpanan untuk kultur induk maksimal 30 hari dan lama penyimpanan untuk proses pemindahan ke media cair maksimal 7 hari.

#### 4.3.8.4 Proses Inokulasi Jamur pada Media Cair

Dilakukan persiapan seperti poin 4.3.8.1. Kemudian disiapkan media padat agar miring yang akan digunakan untuk inokulasi jamur. Tutup tabung reaksi tempat penyimpanan kultur jamur induk dibuka dan dipijar pada bagian mulut tabung sebelum dilakukan inokulasi kultur ( kultur induk berumur 3-7 hari ). Tutup botol yang berisi media cair dibuka dan bagian mulut botol dipijar sebelum dilakukan inokulasi jamur. Jamur endofit pada media padat diinokulasikan pada media cair dengan menggunakan ose steril dan pada kondisi aseptis. Mulut botol kembali dipijar dan ditutup dengan sumbat kapas serta aluminium foil. Setelah itu, tabung diberi label dan disimpan pada tempat yang bersih. Lama penyimpanan untuk penumbuhan jamur pada media cair adalah selama 28-30 hari.

### **4.3.9 Pengamatan terhadap Jamur Endofit**

#### **4.3.9.1 Pengamatan Mikroskopis Jamur**

Dilakukan persiapan seperti poin 4.3.8.1. Media yang berupa *Malt extract agar*, *Sabouraud Dextrosa agar*, *Czapek Dox-agar*, dan *Potato Dextrosa agar* steril dicairkan diatas penangas air hingga cair. Cawan petri dibuka dan dipijar terlebih dahulu pada bagian tepinya. Letakkan obyek gelas steril diatas pipa U steril di dalam cawan petri. Dituangkan sedikit air steril ke dalam cawan petri. Kemudian dituang sedikit media *Malt extract* cair ke atas obyek gelas.. Media dibiarkan dingin dan memadat. Kemudian tabung tempat inokulum jamur dibuka dan dipijar bagian mulut tabung, diambil sebanyak 1 ose kemudian diletakkan pada bagian tengah media diatas obyek gelas. Bagian tepi petri dipijar dan ditutup rapat dengan parafin film. Cawan petri diinkubasi selama 3-7 hari dan dilihat profil mikroskopi jamur setelah berumur 3-7 hari. Dilakukan perlakuan yang sama pada media *Sabouraud Dextrosa*, *Czapek Dox*, dan *Potato Dextrosa*.

#### **4.3.9.2 Pengamatan Makroskopis Jamur**

Dilakukan persiapan seperti poin 4.3.8.1. Media yang berupa *Malt extract agar*, media *Sabouraud Dextrosa agar*, media *Czapek Dox-agar*, dan media *Potato Dextrosa agar* yang telah steril dicairkan diatas penangas air. Cawan petri dibuka dan dipijar terlebih dahulu pada bagian tepinya. Tutup tabung wadah media dipijar dan media dituang dalam petri. Media dibiarkan dingin dan memadat. Kemudian tabung tempat inokulum jamur dibuka dan dipijar bagian mulut tabung, diambil sebanyak 1 ose kemudian diletakkan pada bagian tengah media dalam petri. Bagian tepi petri dipijar dan ditutup rapat dengan parafin film. Cawan petri diinkubasi selama 7-28 hari dan dilihat profil makroskopi jamur.

#### **4.3.9.3 Pengamatan Pertumbuhan Jamur**

Ditimbang 300 gram kentang segar yang telah dicuci bersih kemudian ditambahkan air suling hingga 1 liter dan dilakukan pemanasan selama + 15 menit. Apabila air menyusut akibat penguapan, maka dapat ditambahkan air suling hingga tepat 1 liter. Intus kentang kemudian disaring dan ditambahkan dekstrosa sebanyak 20 gram pada filtratnya. Media yang telah larut dan homogen

dituang ke dalam botol masing-masing dengan volume + 50 ml kemudian ditutup dengan kapas bersih dan aluminium. Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama + 20 menit. Media yang telah steril kemudian diinkubasi selama  $\pm$  3 hari untuk jaminan sterilitas media. Inokulasikan jamur ke media secara aseptis. Dilakukan pertumbuhan jamur selama 7, 14, 21, 28 hari. Dilakukan penimbangan miselia jamur yang berusia 7, 14, 21, 28 hari masing-masing 2-3 botol dengan cara miselia jamur dipisahkan dari mediana. Cawan petri dan kertas saring sebagai wadah miselia terlebih dahulu ditimbang kemudian miselia diletakkan di atasnya dan di keringkan pada oven suhu  $50^{\circ}\text{C}$  selama  $2 \times 24$  jam. Miselia dalam wadah yang telah dioven didinginkan dan kemudian ditimbang seluruhnya, dikurangkan dengan wadah dan didapatkan berat miselia kering. Proses ini dilakukan untuk masing-masing usia pertumbuhan jamur. Dihitung rata-rata berat kering miselia jamur usia 7, 14, 21, 28 hari dan dibuat kurva pertumbuhannya.

#### **4.3.10 Studi Profil Senyawa Metabolit**

##### **4.3.10.1 Persiapan Sampel ( Pemanenan Jamur )**

Sebanyak 45 botol yang berisi filtrat media ( *Potato Dextrose* ) dan jamur yang telah ditumbuhkan selama 28-30 hari disiapkan untuk proses pemanenan sesuai dengan tanggal penanaman. Botol yang akan digunakan sebagai tempat untuk wadah penampungan miselia jamur, filtrat media, dan bilasan air suling disiapkan terlebih dahulu. Filtrat media dipisahkan dari miselia jamur dengan cara dekantasi atau penyaringan dengan corong buchner yang dilapisi kertas saring yang telah ditimbang terlebih dahulu. Filtrat ditampung pada wadah penampungan media. Miselia jamur dibilas dengan air suling sebanyak 2 kali dan hasil bilasan ditampung untuk diekstraksi. Miselia yang telah dibilas kemudian di keringkan pada oven pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  selama  $2 \times 24$  jam dan selanjutnya disimpan pada suhu kamar. Filtrat media dan bilasan airnya disimpan di lemari es sebelum diekstraksi lebih lanjut.

#### 4.3.10.2 Proses Pengekstraksian

##### A. Filtrat Media ( *Potato Dextrose* )

Filtrat media ( *Potato Dextrose* ) yang telah diukur volumenya diekstraksi dengan etil asetat teknis redestilata dengan volume  $\frac{1}{2}$  dari volume filtrat media ( Findlay *et al.*, 1995 ) dan digojok selama 1 jam dengan rotary shaker. Ekstraksi ini diulang sebanyak sebanyak 3 kali. Ekstrak dipekatkan dengan menggunakan vakum rotavapor pada suhu  $35^{\circ}$  C sampai agak kering ( Findlay *et al.*, 1995 ). Ekstrak etil asetat diuapkan di lemari asam sampai kering dan ditimbang beratnya, kemudian disimpan di lemari es untuk analisa lebih lanjut.

Sisa media dilakukan pemekatan dengan menggunakan vakum rotavapour pada suhu  $35^{\circ}$  C hingga didapatkan cairan kental. Cairan kental tersebut ditambahkan metanol 80 % teknis redestilata secukupnya, kemudian diultrasonik selama 15 menit dan digojok selama 5 menit dengan rotary shaker. Selanjutnya dilakukan penyaringan dan pengulangan ekstraksi sebanyak 3 kali. Residu dipekatkan dengan menggunakan vakum rotavapour pada suhu  $35^{\circ}$  C.

Secara keseluruhan tahap pengeksraksian pada media, didapatkan ekstrak etil asetat dan ekstrak methanol.

##### B. Miselia Jamur

Miselial jamur yang telah kering dan diketahui beratnya kemudian dipotong kecil-kecil, kemudian diekstraksi dengan menggunakan n-heksan teknis redestilata. Proses pengeksraksian jamur diawali dengan ultrasonik selama  $\pm 15$  menit untuk memecah dinding sel miselia kemudian digojok selama 5 menit dengan rotary shaker. Ekstrak n-heksan dipekatkan dengan menggunakan vakum rotavapor pada suhu  $50^{\circ}$  C sampai agak kering kemudian diuapkan di lemari asam sampai kering dan ditimbang beratnya. Ekstarak disimpan di lemari es untuk analisa lebih lanjut.

Residu miselia diuapkan terlebih dahulu untuk menghitungkan sisa n-Heksan. Miselia yang sudah bebas n-Heksan diekstraksi lagi dengan menggunakan etil asetat teknis redestilata dengan diultrasonic selama  $\pm 15$

menit kemudian digojok selama 5 menit. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali. Larutan ekstrak disaring untuk memisahkan dari residunya. Ekstrak etil asetat dipekatan dengan menggunakan vakum rotavapor pada suhu 35 °C sampai agak kering kemudian diuapkan di lemari asam sampai kering dan ditimbang beratnya. Ekstrak disimpan di lemari es untuk analisa lebih lanjut.

Residu miselia diuapkan terlebih dahulu untuk menghilangkan sisa etil asetat. Miselia yang sudah bebas etil asetat diekstraksi lagi dengan menggunakan methanol 100 % dengan diultrasonic selama ± 15 menit kemudian digojok selama 5 menit. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali. Larutan ekstrak disaring untuk memisahkan dari residunya. Ekstrak metanol dipekatan dengan menggunakan vakum rotavapor pada suhu 35 °C sampai agak kering. Ekstrak metanol diuapkan di lemari asam sampai kering dan ditimbang beratnya, kemudian disimpan di lemari es untuk analisa lebih lanjut. Secara keseluruhan tahap pengekstraksian pada miselia, didapatkan ekstrak etil asetat, ekstrak methanol, dan ekstrak n-heksan.

#### **4.3.11 Preparasi Ekstrak secara KLT-Densitometri**

##### **4.3.11.1 Persiapan Untuk KLT-Densitometri**

Ekstrak dilarutkan sesuai dengan pelarutnya dan diultrasonic 5 menit untuk menghomogenkan dan selanjutnya ditotolkan pada pelat KLT ( Silika gel Merck F<sub>254</sub> ). Sebelum dilakukan eluasi, hasil penotolan dilihat pada lampu UV untuk melihat kejelasan totolan. Selanjutnya lempeng KLT dieluasi dengan fase gerak yang sesuai. Masing-masing hasil eluasi dipayar dengan menggunakan Densitometer pada panjang gelombang 200-400 nm. Dicari profil kromatogram dan gambar spektra noda yang aktif UV. Dihitung pula harga R<sub>f</sub> masing-masing noda yang tampak dengan melihat jarak migrasi masing-masing noda. Hasil eluasi selanjutnya disemprot dengan penampak noda Anisaldehyd-asam sulfat dan diamati terjadinya perubahan warna noda. Dihitung jarak migrasinya untuk melihat adanya perbedaan warna yang terjadi dengan sewaktu sebelum direaksikan dengan penampak noda. Dilakukan proses yang sama untuk

penampak noda yang berbeda yaitu sitrat borat, Vanillin-asam sulfat, Dragendorff dan Ninhidrin.

#### 4.3.11.2 Ekstrak etil asetat

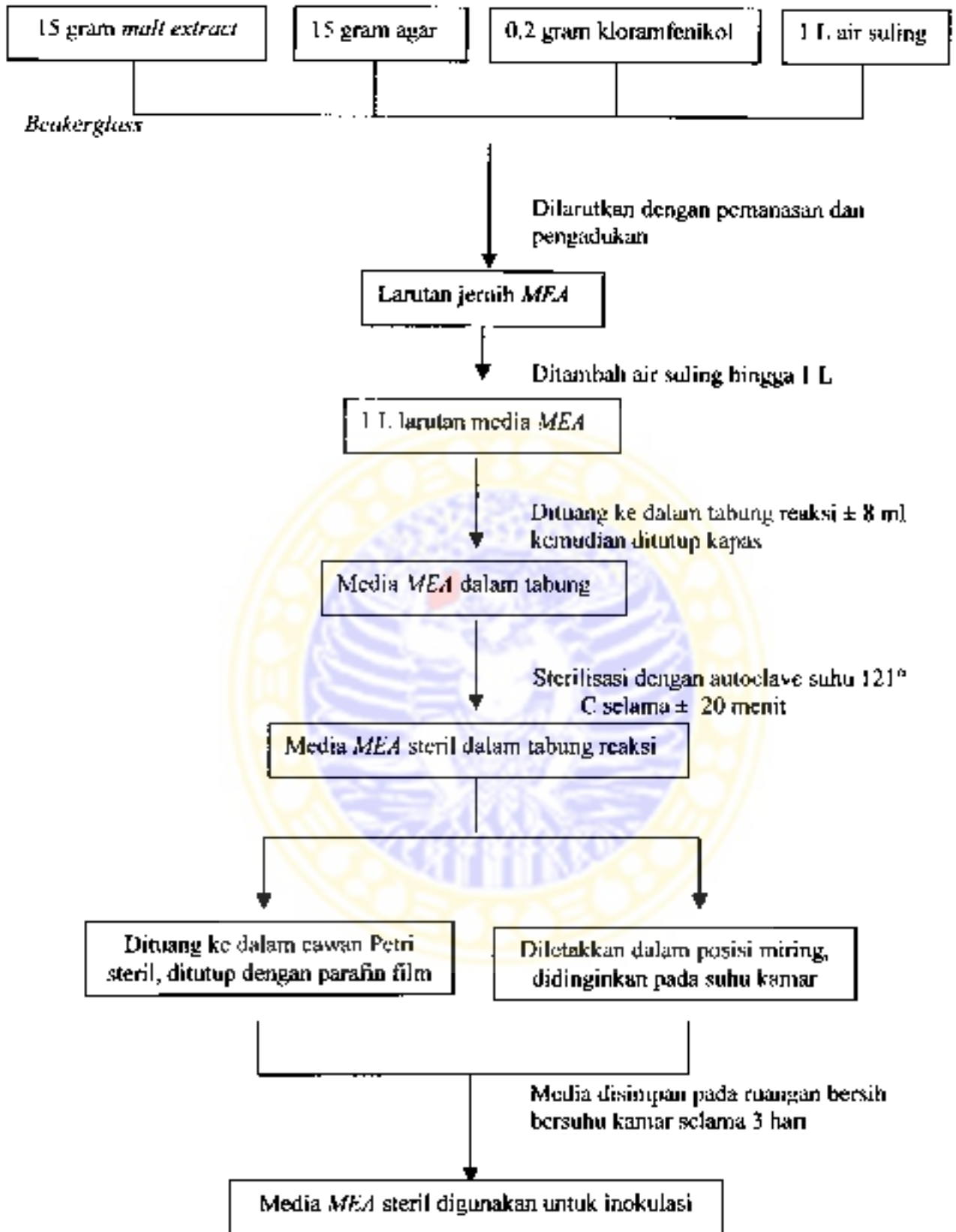
Dilakukan perlakuan pada poin 4.3.11.1. Ekstrak etil asetat yang berasal dari miselia dieluasi dengan menggunakan fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1 dan untuk ekstrak etil asetat yang berasal dari media dieluasi dengan fase gerak etil asetat : n-heksan = 4 : 1.

#### 4.3.11.3 Ekstrak metanol

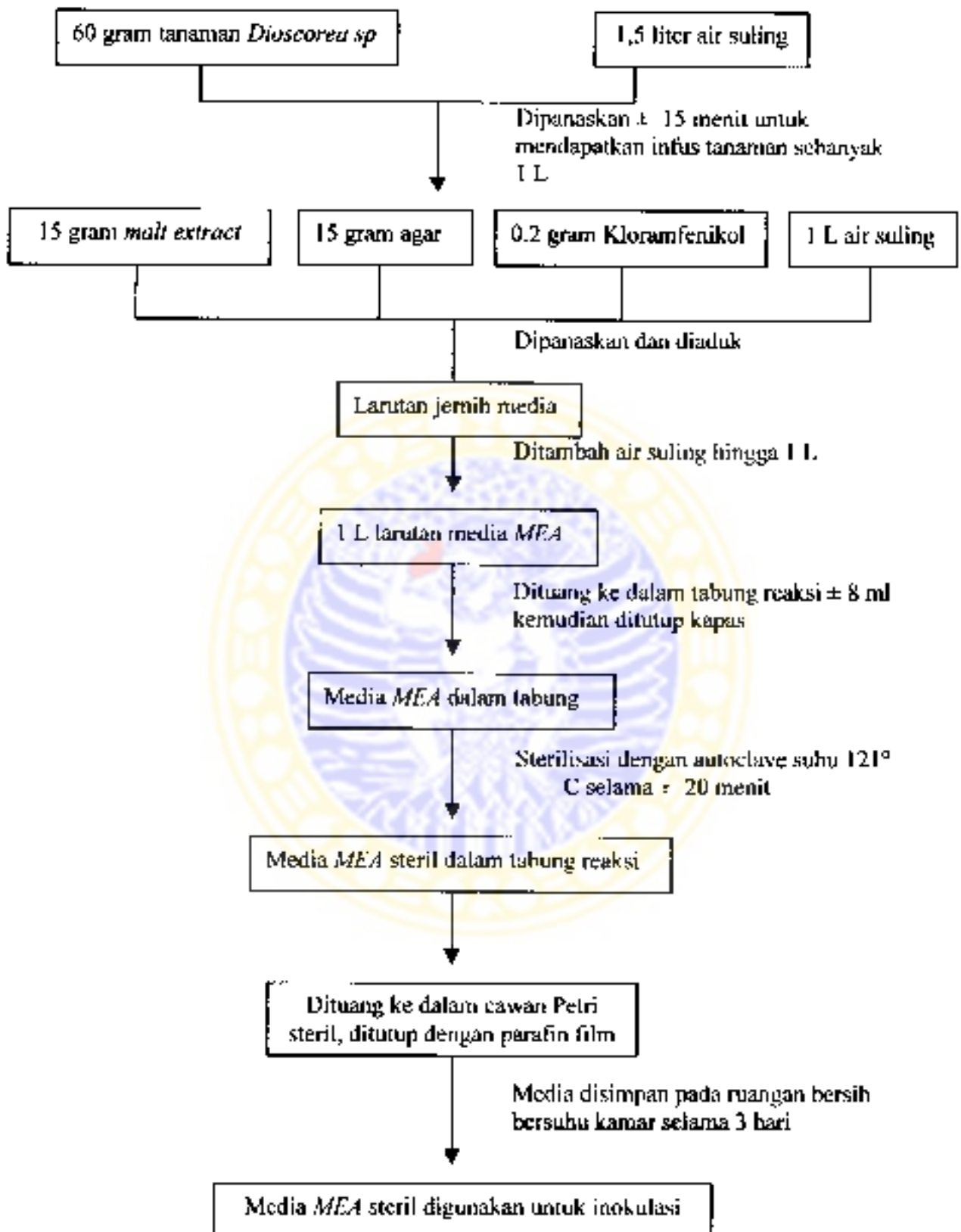
Dilakukan perlakuan pada poin 4.3.11.1. Ekstrak metanol yang berasal dari miselia dieluasi dengan menggunakan fase gerak Etil asetat : Metanol : air = 7 : 2 : 1 dan untuk ekstrak metanol yang berasal dari media dieluasi dengan fase gerak kloroform : metanol : air = 2 : 7 : 1.

#### 4.3.11.4 Ekstrak n-heksan

Dilakukan perlakuan pada poin 4.3.11.1. Ekstrak n-heksan dieluasi dengan menggunakan fase gerak etil asetat : metanol = 9 : 1.

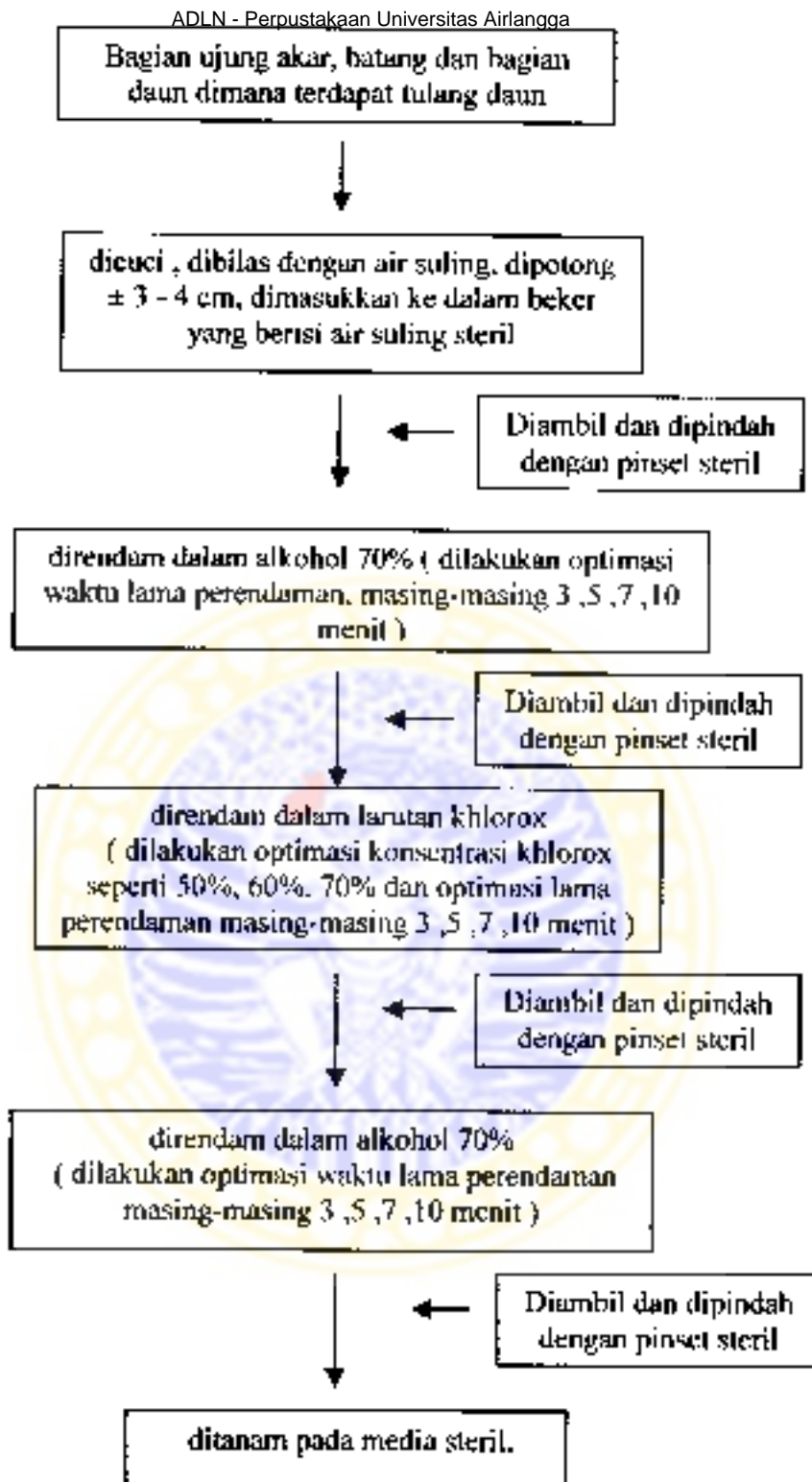


**Gambar 4.1** Skema Pembuatan Media Padat ( tahap awal )

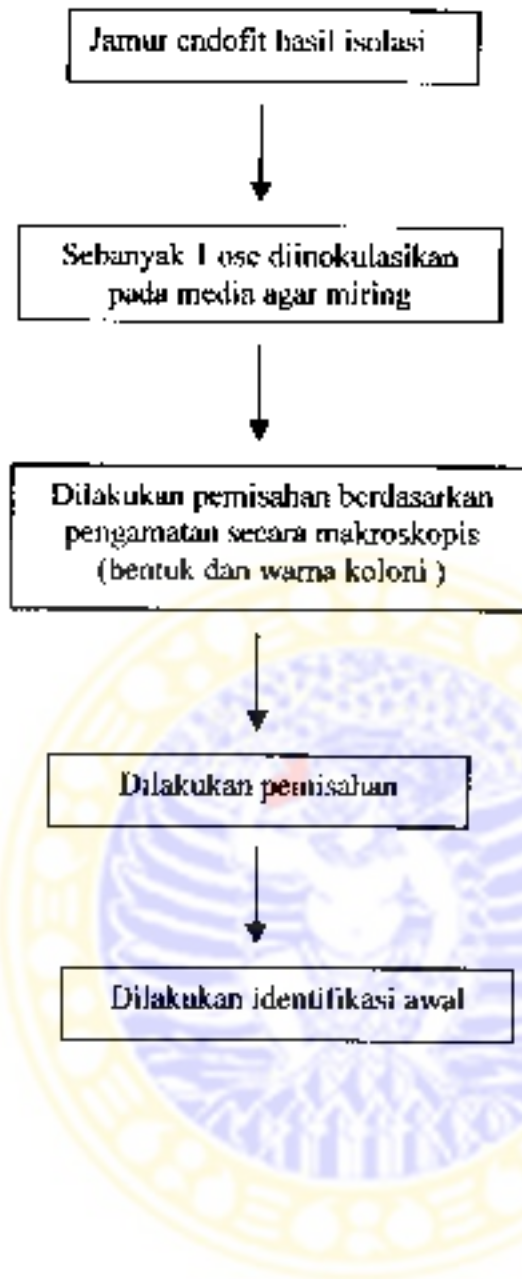


**Gambar 4.2** Skema Pembuatan Media Padat ( Tahap 2 )

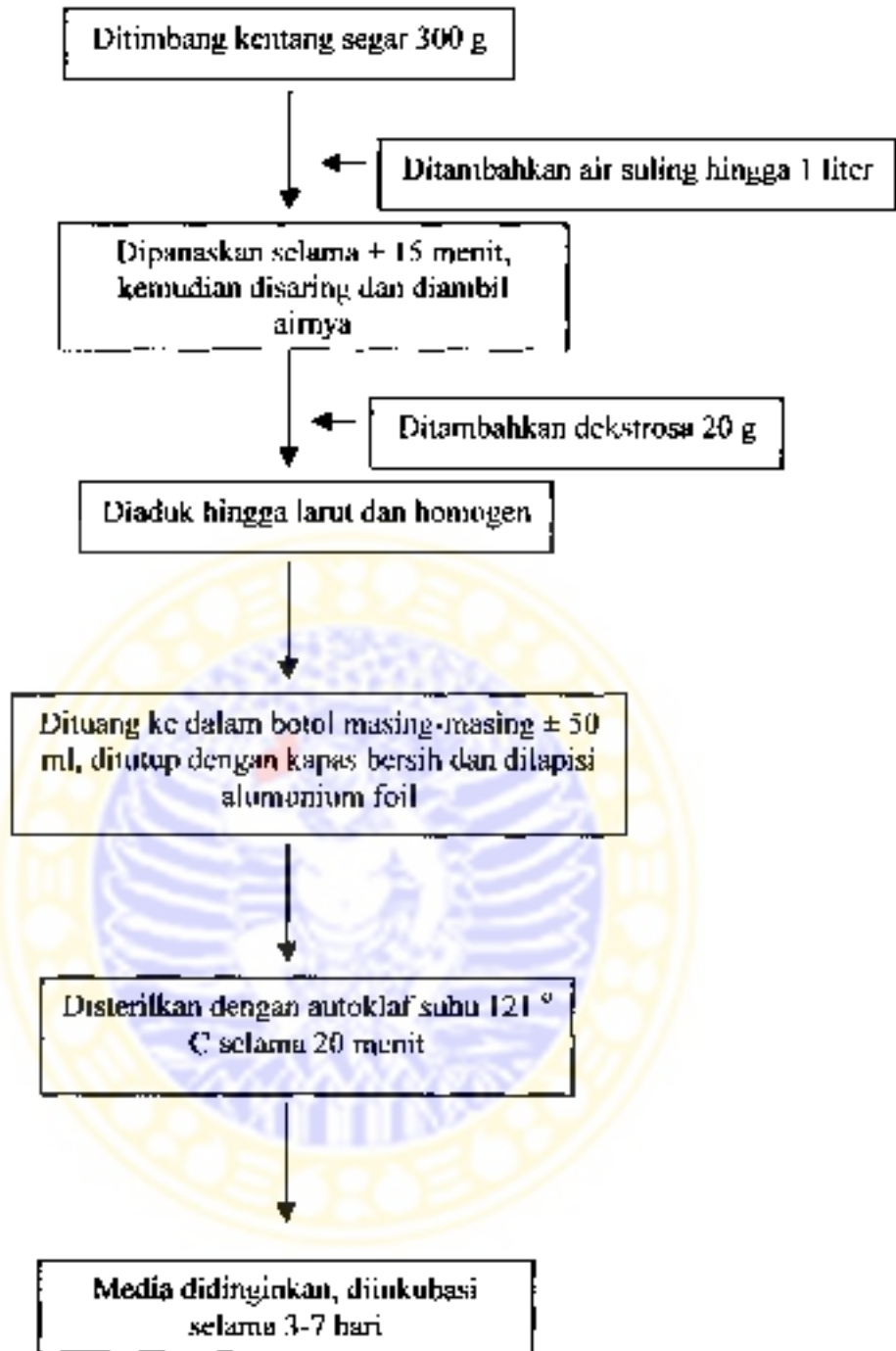




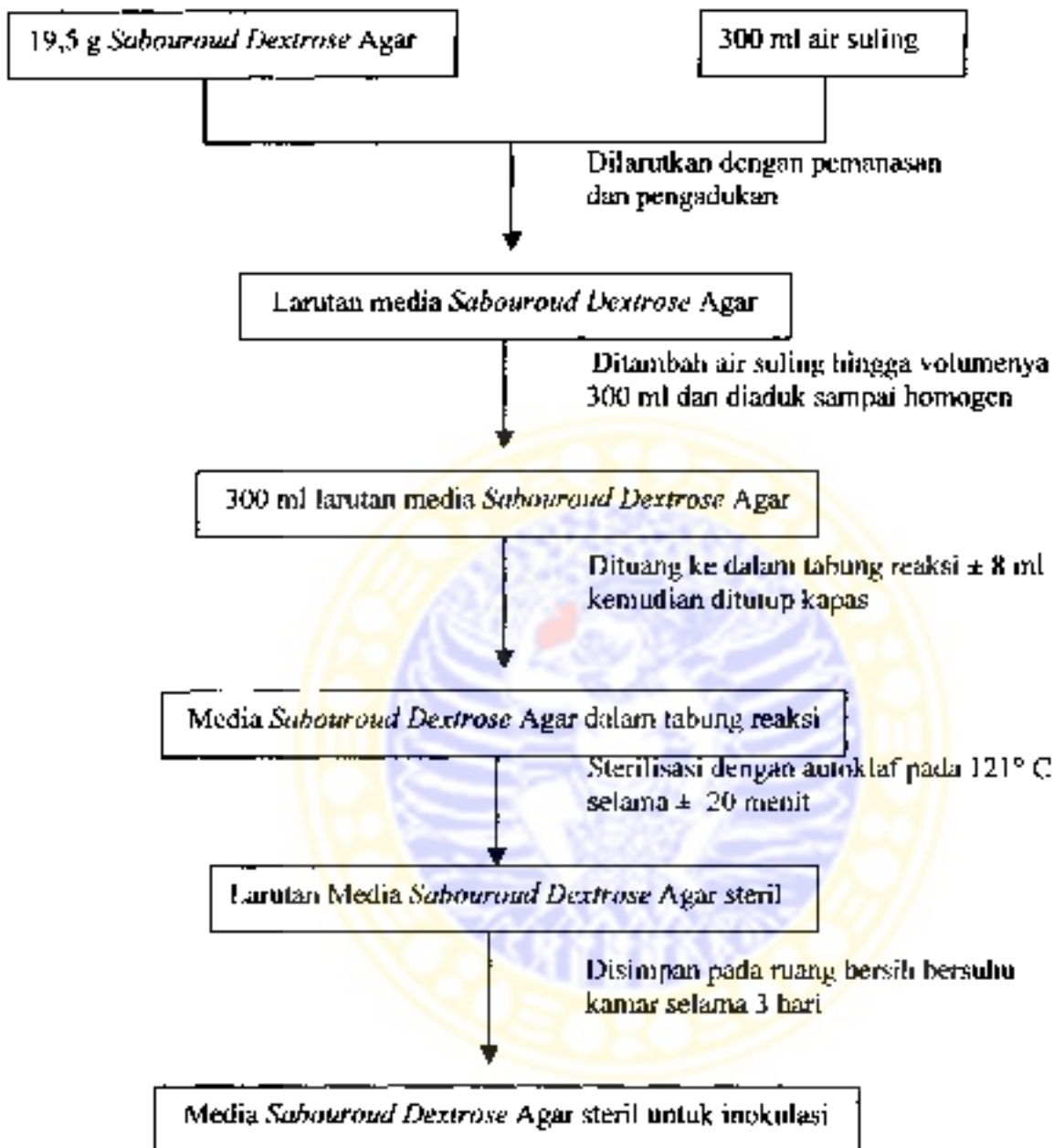
**Gambar 4.3** Skema Proses Penanaman Bagian Tanaman



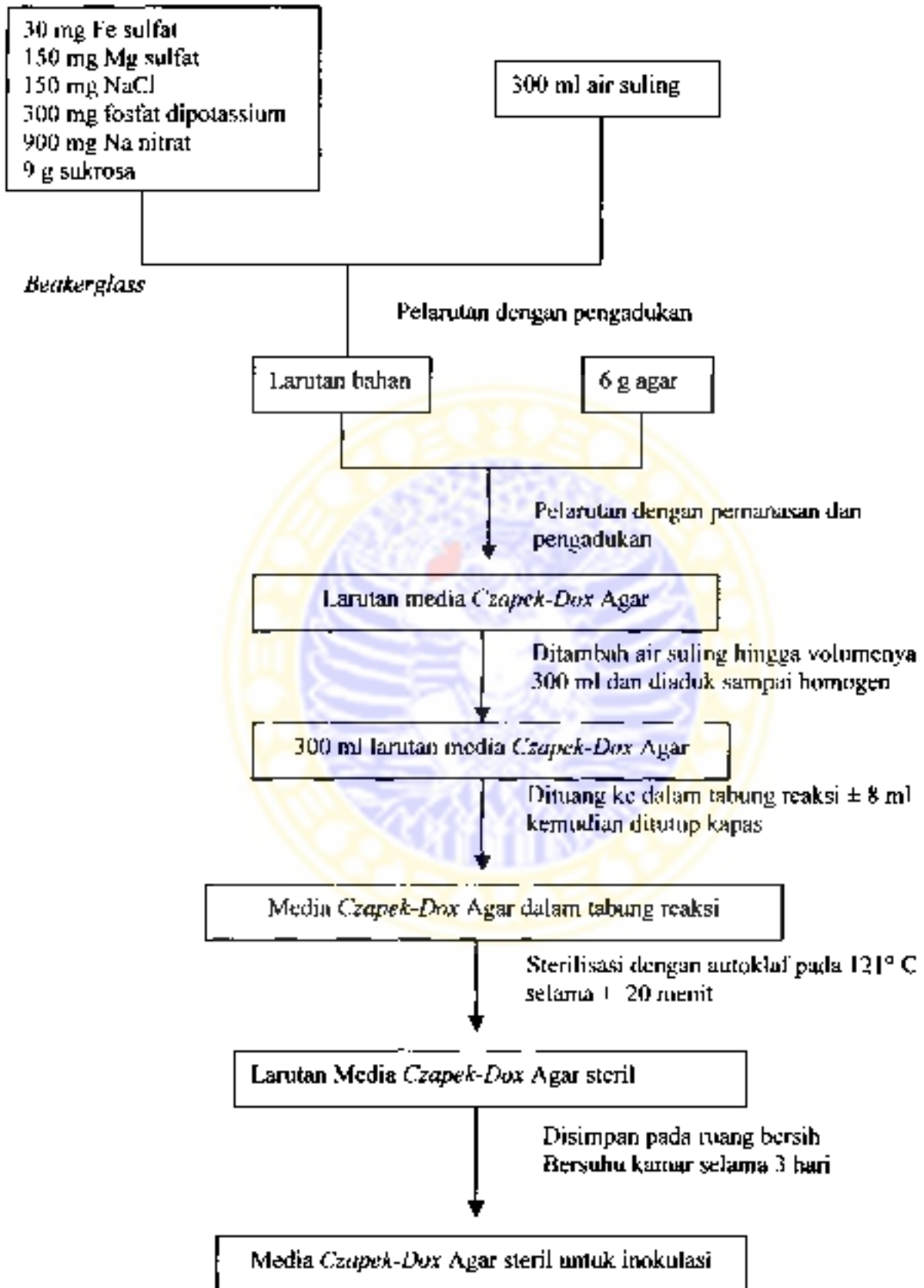
**Gambar 4.4** Skema Proses Pemurnian dan Identifikasi



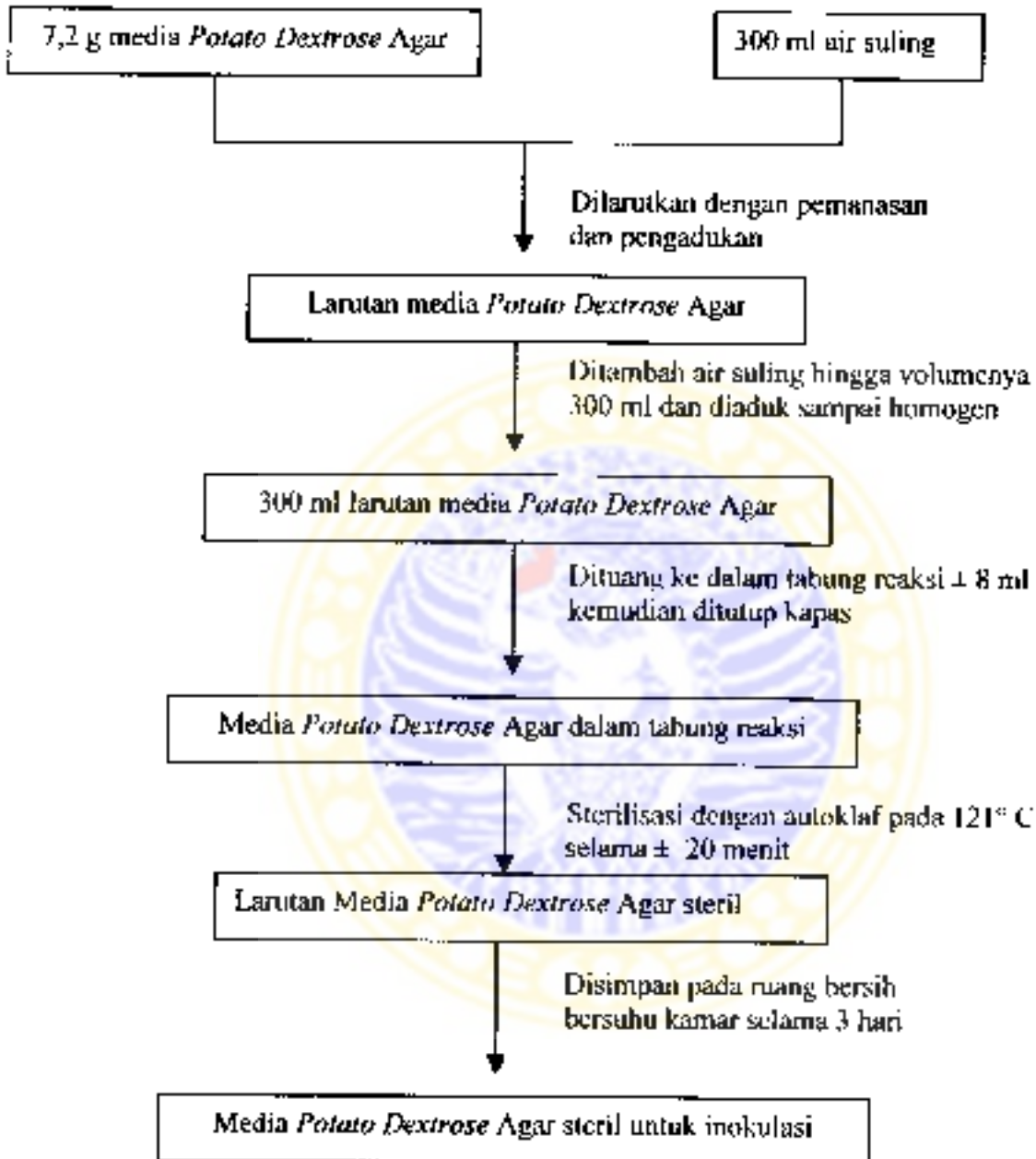
**Gambar 4.5** Skema Pembuatan Media Cair



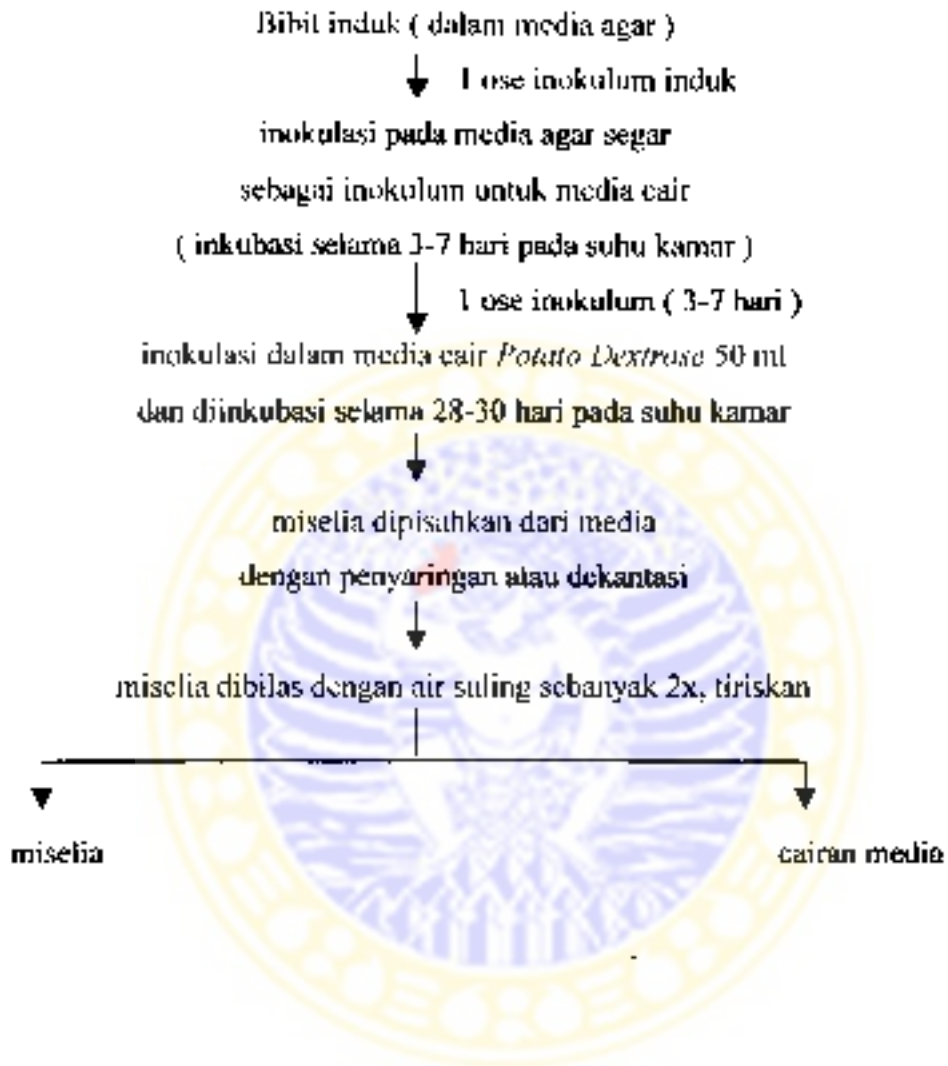
**Gambar 4.6** Skema Pembuatan media padat *Sabouraud Dextrose Agar*



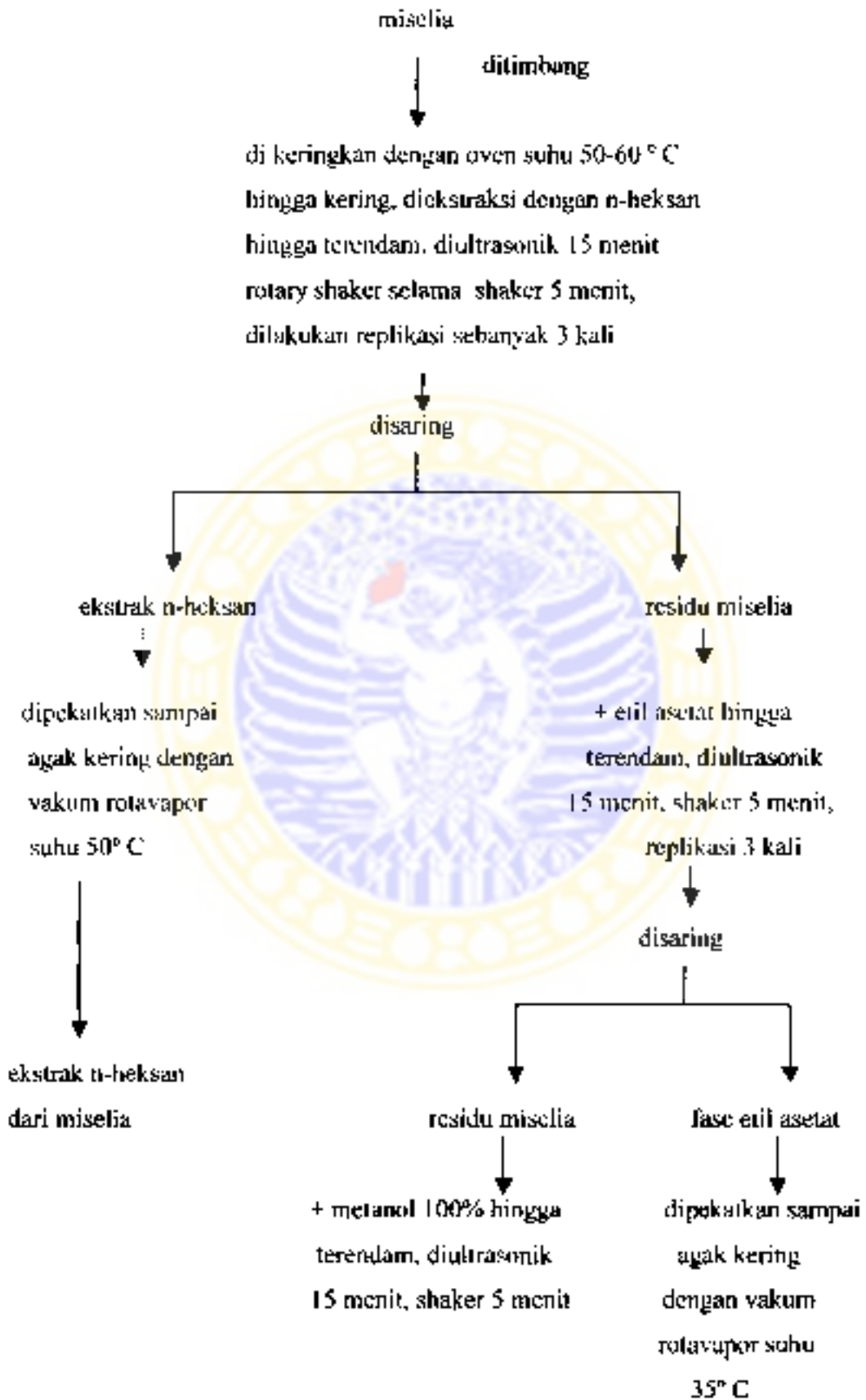
**Gambar 4.7** Skema Pembuatan media padat *Czapek-Dox Agar*



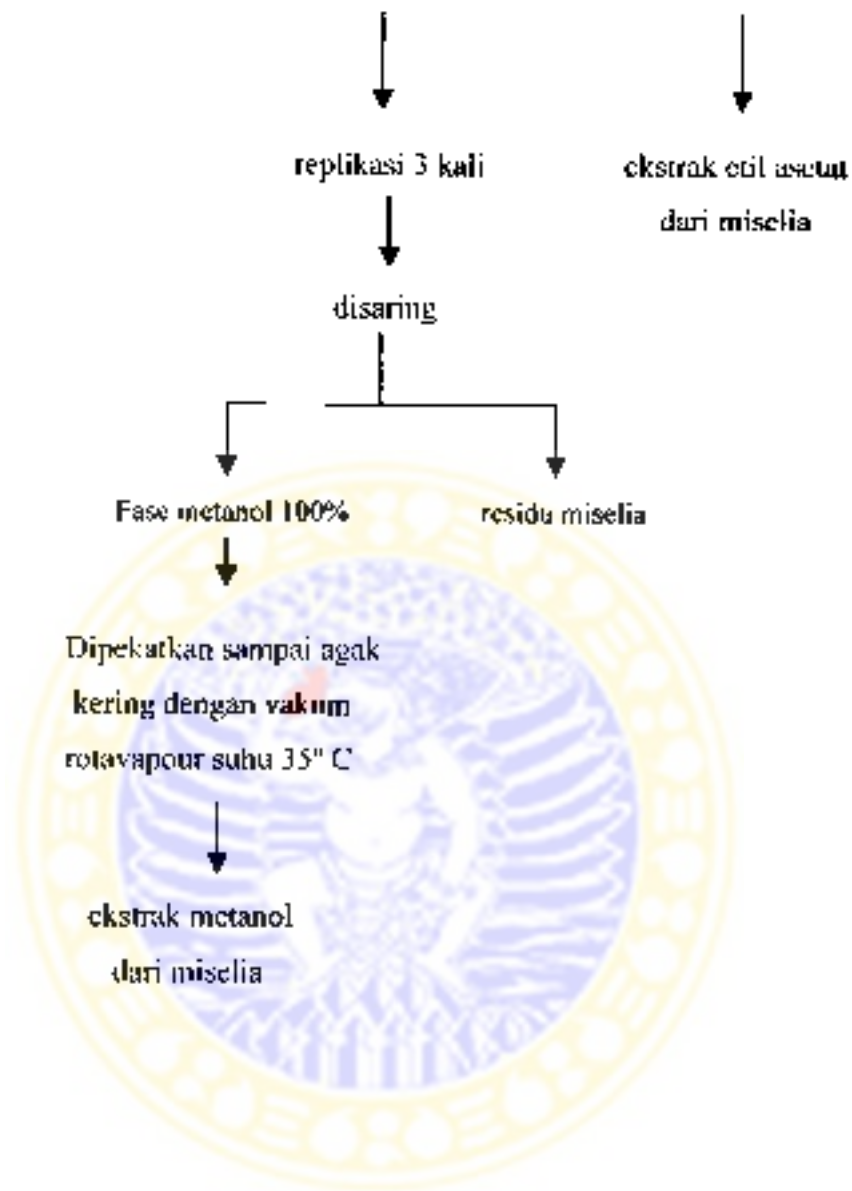
**Gambar 4.8** Skema Pembuatan media pada *Potato Dextrose Agar*



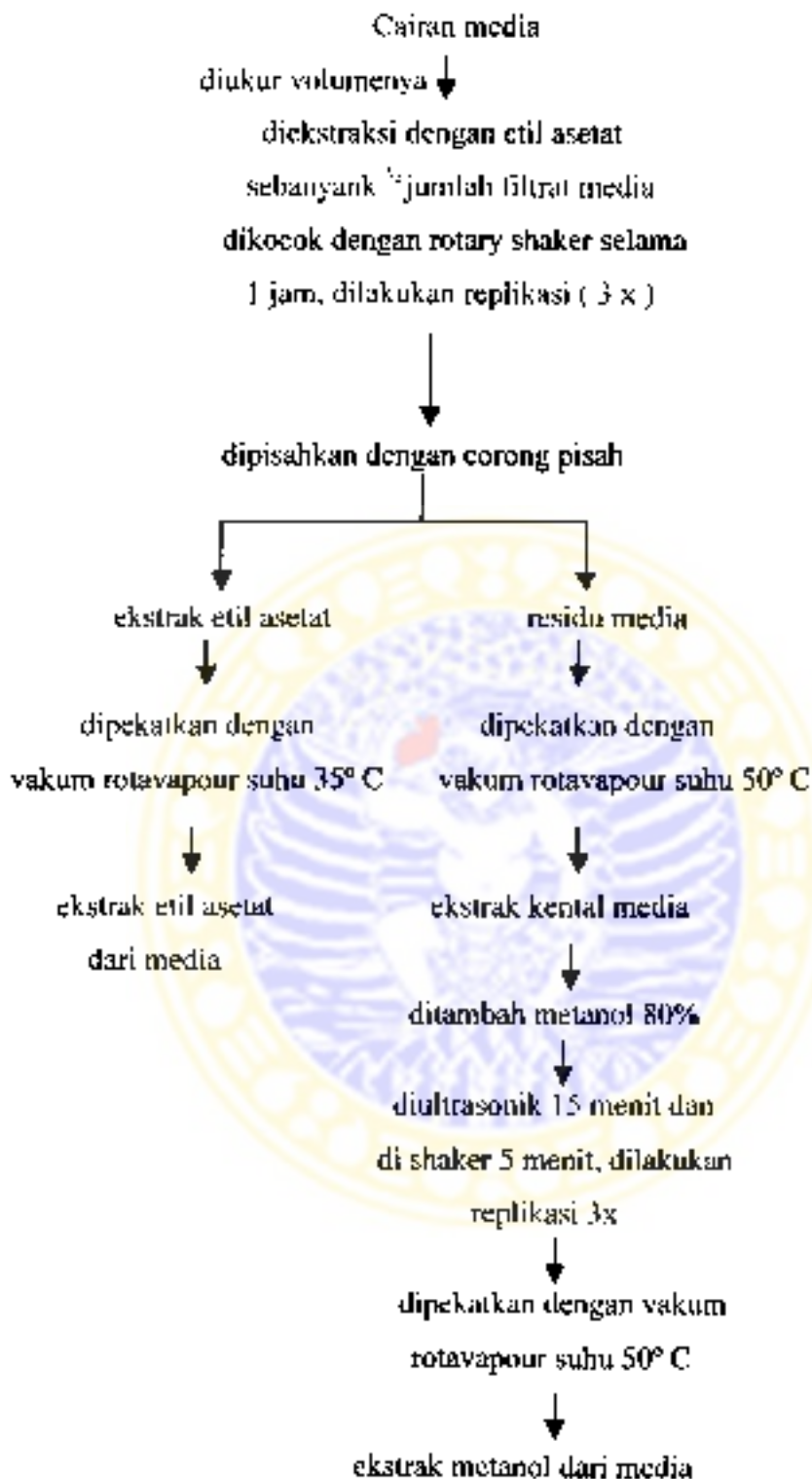
**Gambar 4.9** Skema Kerja Proses Ekstraksi Jamur



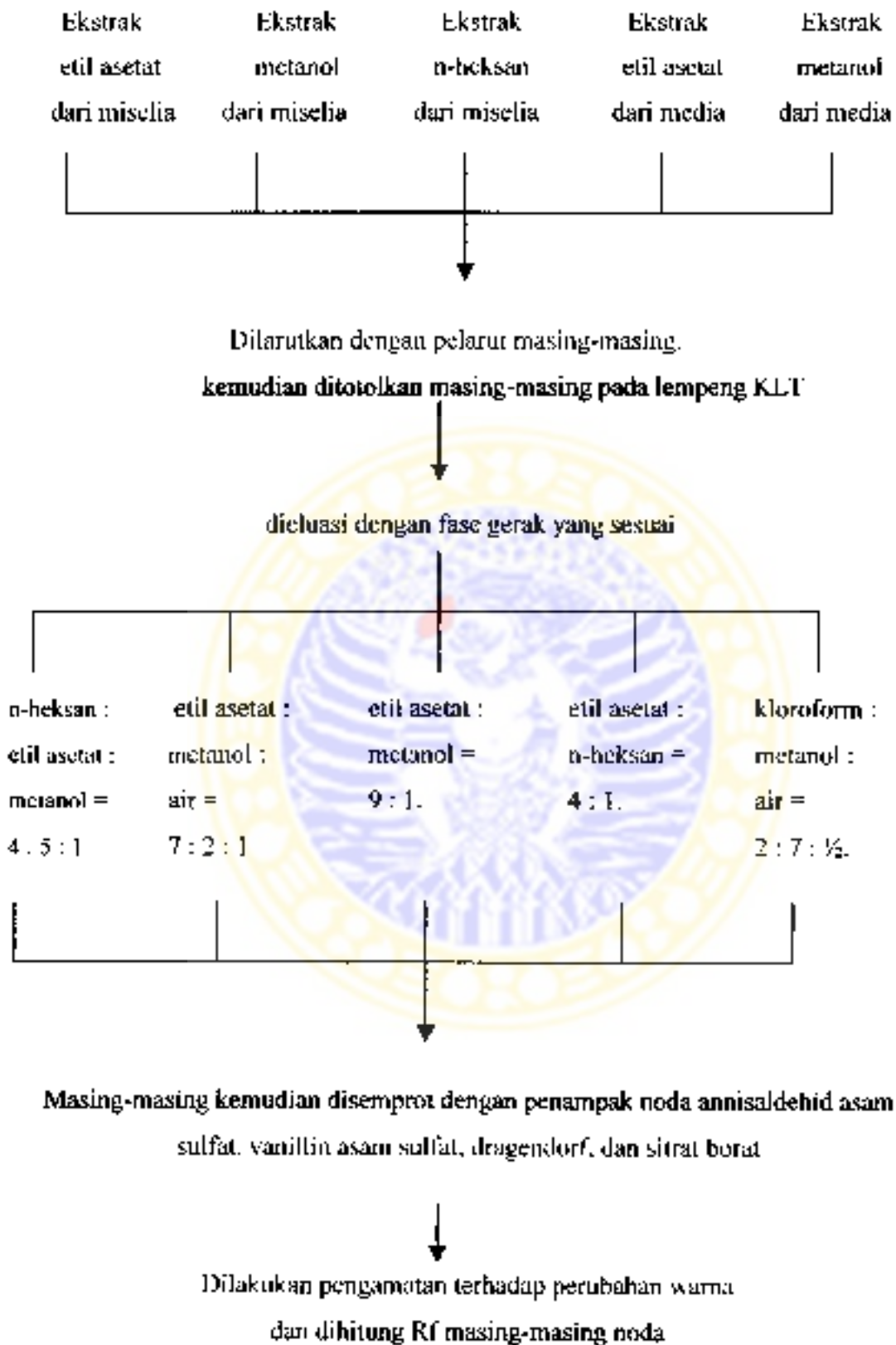




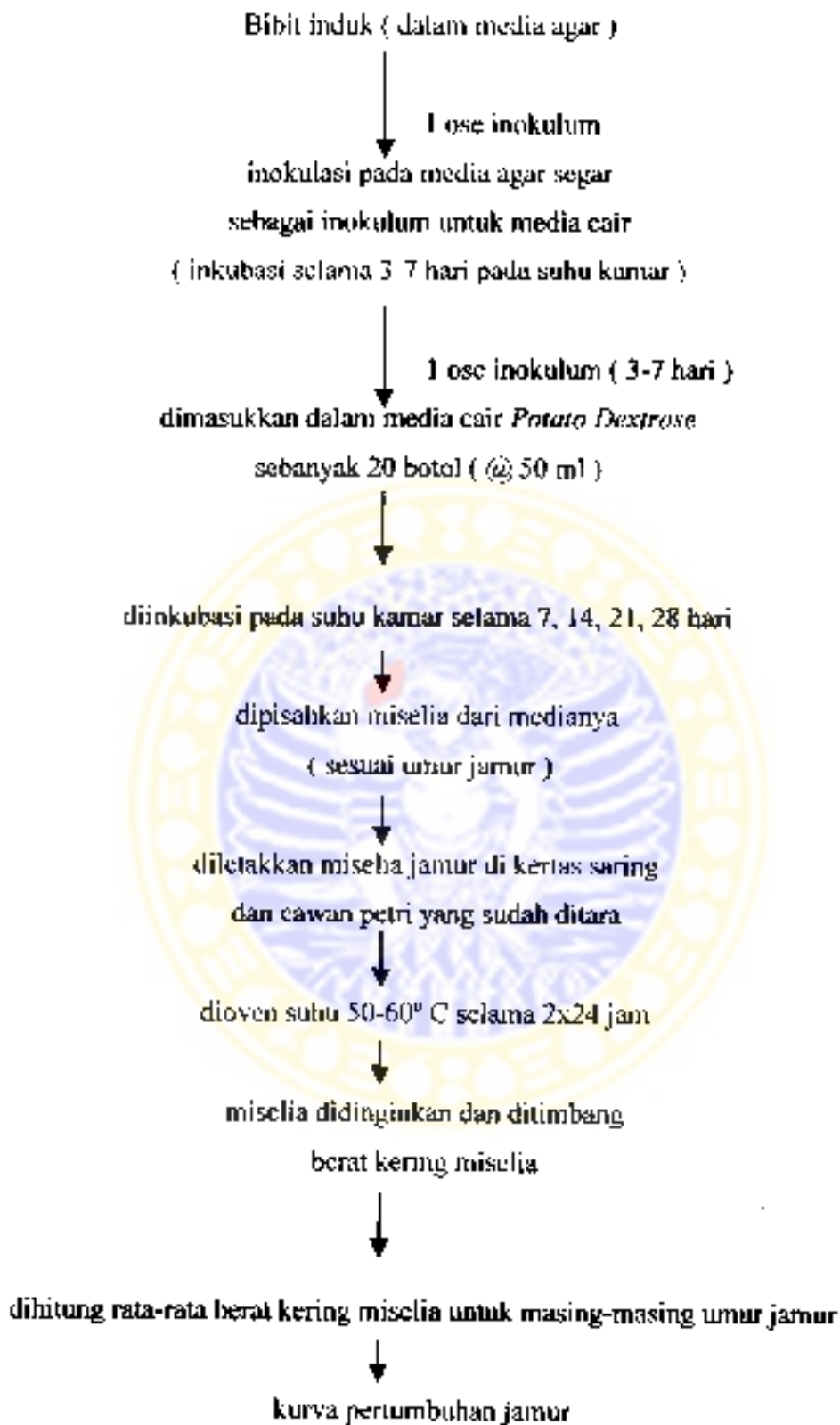
**Gambar 4.10** Skema Kerja pada Miselia Jamur



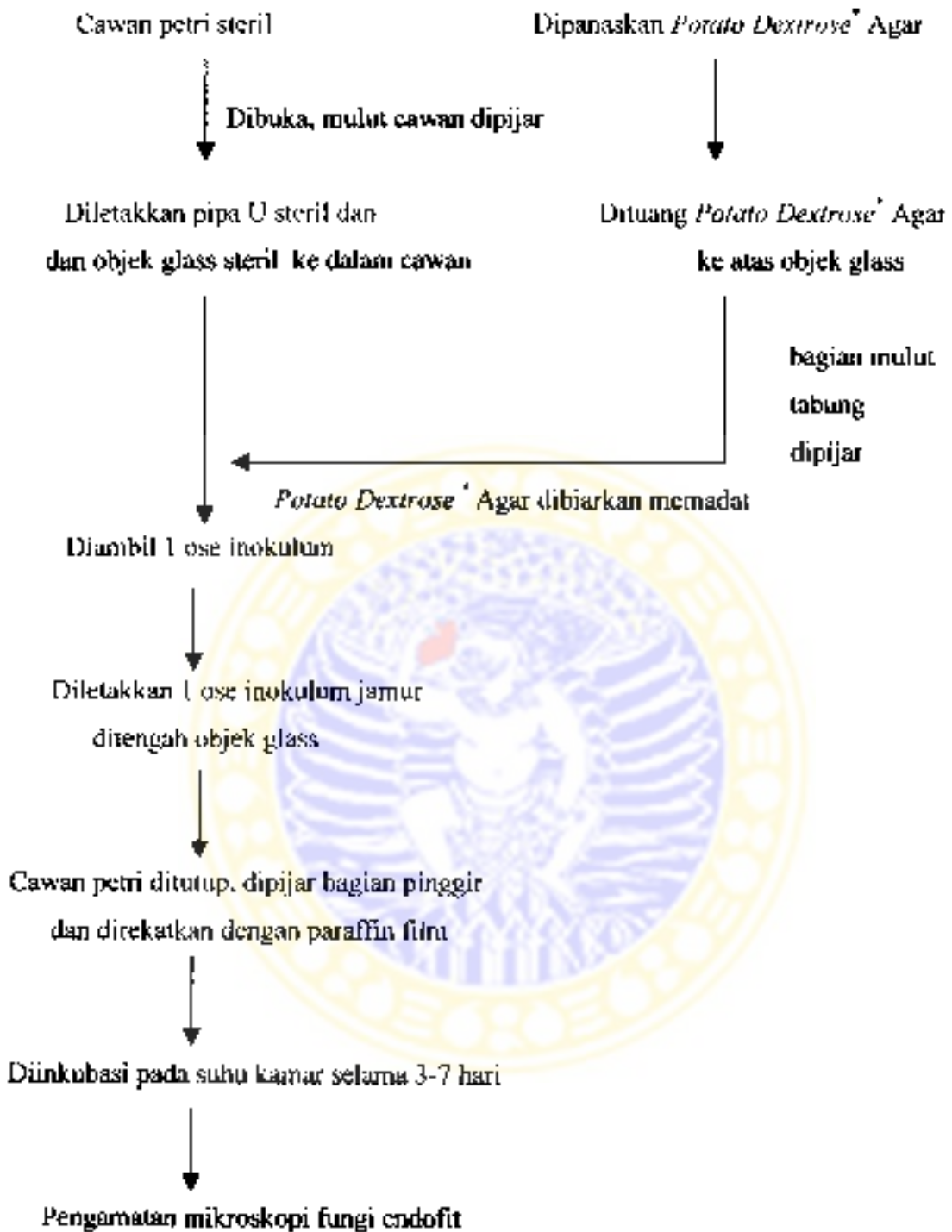
**Gambar 4.11** Skema Kerja pada Cairan Media Jamur



**Gambar 4.12** Preparasi Ekstrak untuk KLT

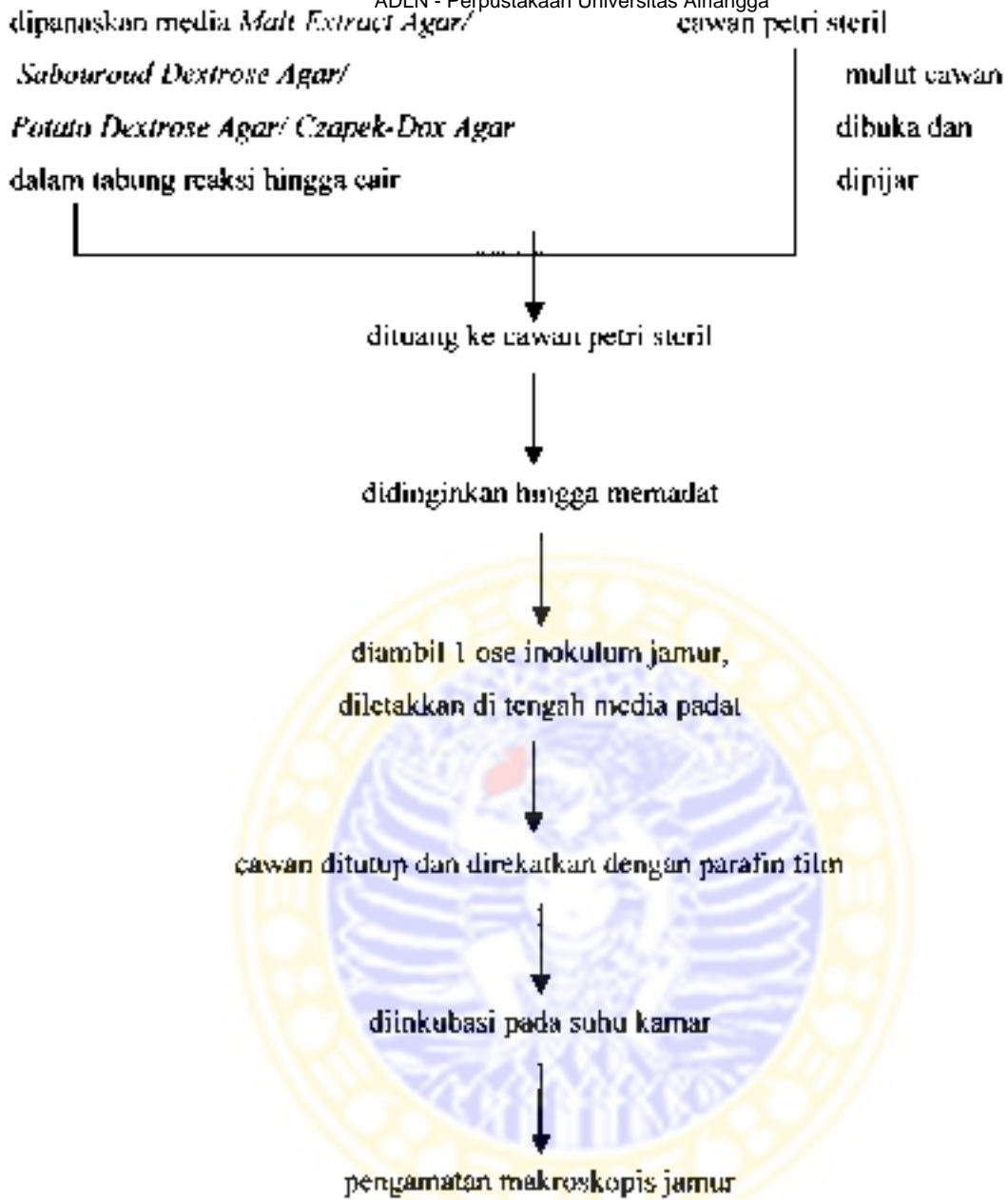


**Gambar 4.13** Skema Pengamatan Pertumbuhan Jamur



Keterangan \* : pengamatan mikroskopi fungi endofit juga dilakukan pada media *MEA*, *Sabouroud Dextrose Agar* dan *Czapek-Dox Agar*

**Gambar 4.14** Skema pengamatan mikroskopik fungi endofit



**Gambar 4.15** Skema pengamatan makroskopik fungi endofit

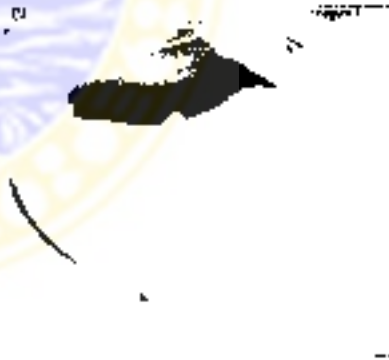
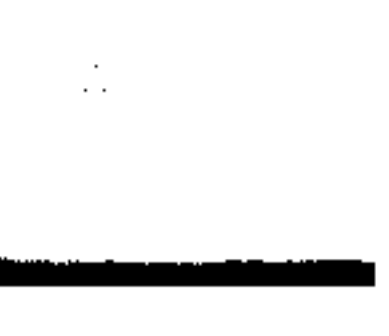
## BAB V





### HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Isolasi fungi endofit dari tanaman *Dioscorea sp*





Tanaman *Dioscorea sp* diisolasi adalah pada bagian batang, akar, daun dengan menggunakan alkohol dan Na hipoklorid sebagai larutan pensteril. Dilakukan optimasi kadar komposisi larutan pensteril dan waktu perendaman sehingga didapat kadar dan waktu yang optimum untuk menumbuhkan fungi endofit pada bagian tanaman tersebut.

**Tabel V.1** Data Optimasi Kadar dan Waktu Perendaman Larutan Pensteril ( alkohol- Na hipoklorit-alkohol ) pada bagian tanaman *Dioscorea sp*

Jaringan	Optimasi Kadar dan Waktu Perendaman Larutan Pensteril	Keterangan	Gambar
Akar	7 menit alkohol 70%, 40 menit Na hipoklorit 70%, 7 menit alkohol 70%	Kontaminasi	
	10 menit alkohol 70%, 60 menit Na hipoklorit 70%, 10 menit alkohol 70 %	Tidak tumbuh	

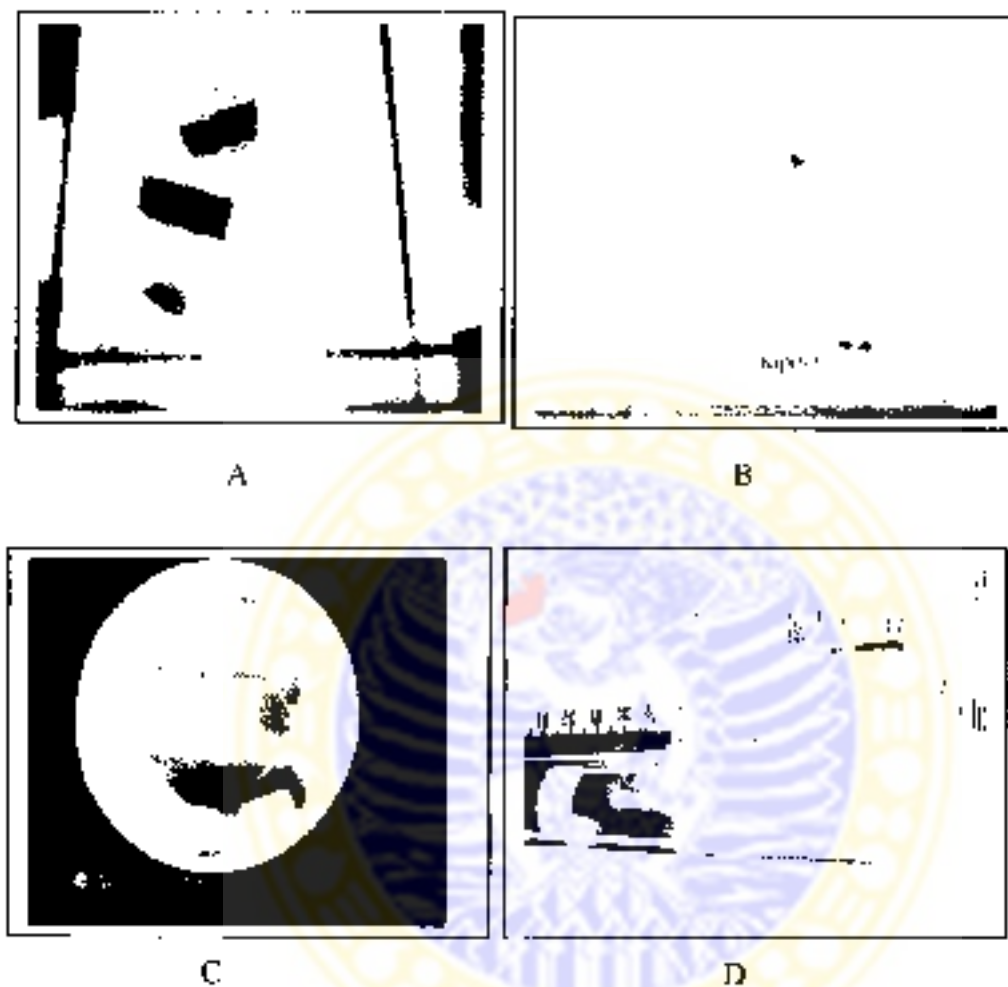
	<p>10 menit alkohol 70%, 60 menit Na hipoklorit 70%, 10 menit alkohol 70 %</p>	<p>Tumbuh jamur endofit</p>	
Daun	<p>7 menit alkohol 70%, 60 menit Na hipoklorit 70%, 7menit alkohol 70 %</p>	<p>Tidak tumbuh</p>	
	<p>10 menit alkohol 70%, 50 menit Na hipoklorit 50%, 10 menit alkohol 70 %</p>	<p>Kontaminasi</p>	
	<p>10 menit alkohol 70%, 60 menit Na hipoklorit 60%, 10 menit alkohol 70 %</p>	<p>Kontaminasi</p>	



Batang	10 menit alkohol 70%, 60 menit Na hipoklorit 70%.10 menit alkohol 70 %	Tidak tumbuh	
	10 menit alkohol 70%, 50 menit Na hipoklorit 50%,10 menit alkohol 70 %	Kontaminasi	
	7 menit alkohol 60%, 60 menit Na hipoklorit 60%,7 menit alkohol 60 %	Kontaminasi	
	7 menit alkohol 60%, 50 menit Na hipoklorit 60%.7 menit alkohol 60 %	Kontaminasi	

## 5.2 Pengamatan Hasil Isolasi Bagian Daun Tanaman *Dioscorea sp.*

Isolasi dari bagian daun tanaman *Dioscorea sp* menghasilkan jamur endofit yang selanjutnya dipisahkan sehingga didapatkan jamur yang murni. Gambar 5.1 menunjukkan hasil isolasi daun pada jangka waktu tertentu yang diamati secara visual.

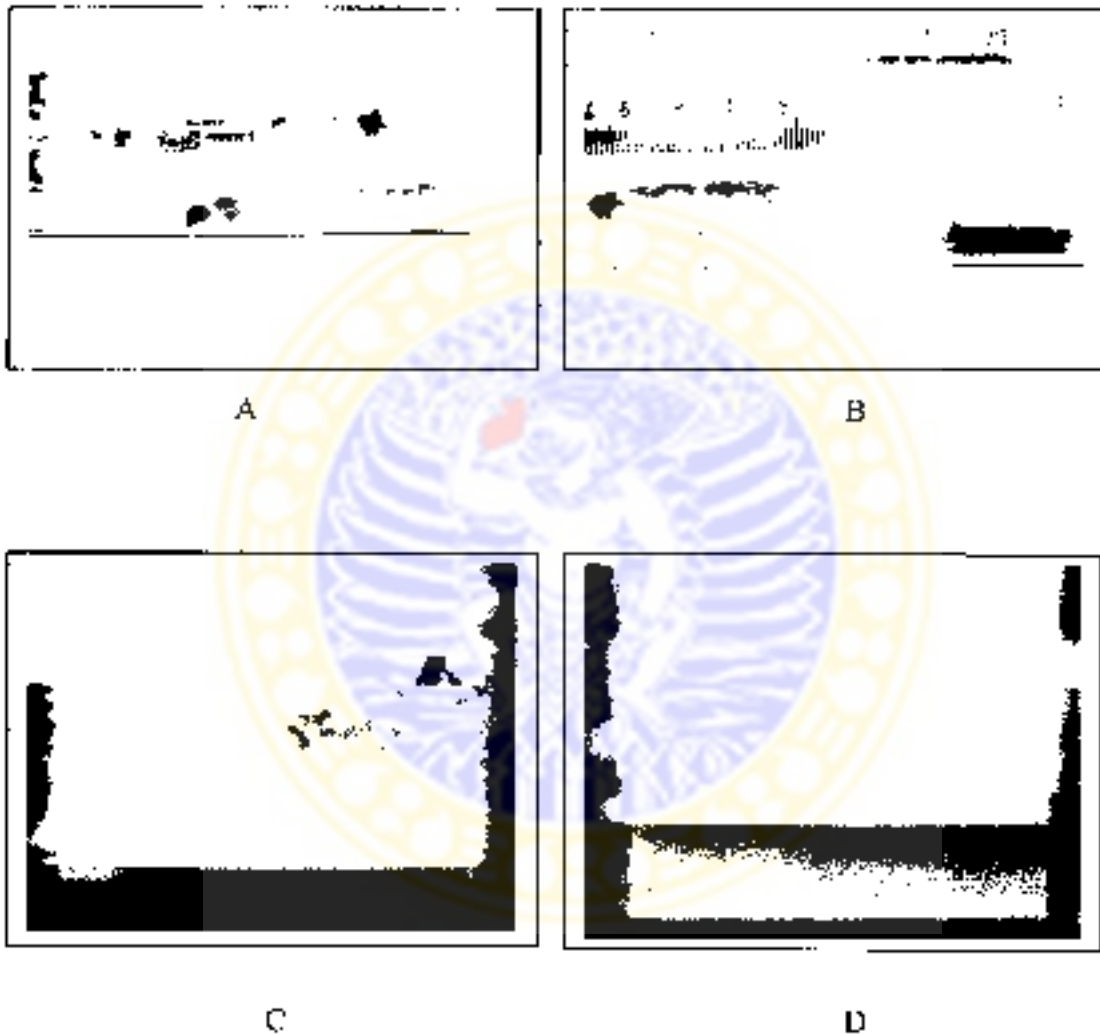


**Gambar 5.1.** Hasil isolasi jamur endofit dari *Dioscorea sp.* ( A ) Potongan daun pada kondisi steril ( usia 14 hari ) dalam media *Malt Extract Agar* dengan perlakuan sterilisasi menggunakan alkohol 70% selama 10 menit-klorox 60% selama 60 menit alkohol 70% selama 10 menit,( B ) Potongan bagian A setelah berumur 14 hari dan terbukti steril,( C ) Pertumbuhan jamur di bagian pinggir daun yang telah dipotong secara aseptis, ( D ) Jamur endofit dipindahkan ke media miring *Malt Extract Agar*

### 5.3 Pengamatan Hasil Pemisahan Jamur Endofit dari Bagian Daun Tanaman

#### *Dioscorea sp.*

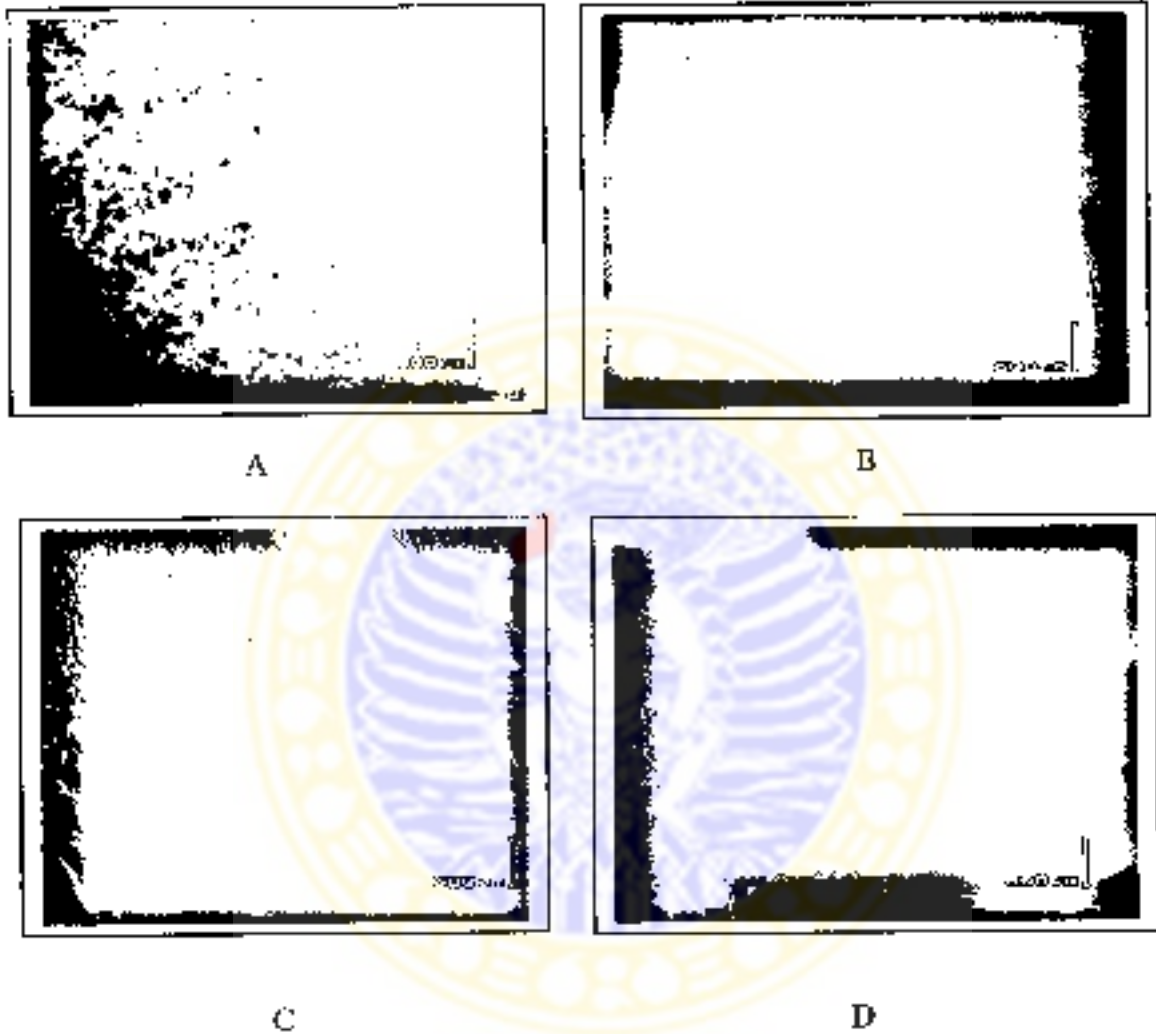
Bagian daun yang menunjukkan tanda-tanda pertumbuhan jamur selanjutnya dipisahkan secara aseptis ke media agar miring hingga didapatkan jamur yang murni. Gambar 5.2 menunjukkan hasil pemisahan jamur dalam beberapa waktu tertentu dan diamati secara visual.



**Gambar 5.2.** Hasil pemisahan jamur dalam beberapa waktu tertentu dan diamati secara visual. ( A ) Pemisahan awal jamur endofit pada media *Potato Dextrose Agar*; ( B ) Hasil pemisahan yang menunjukkan 2 warna koloni jamur yang berbeda; ( C ) Koloni jamur endofit yang berwarna kecoklatan dengan kode Dsp1; ( D ) Koloni jamur endofit yang berwarna kuning gading dengan kode Dsp 2

#### 5.4 Pengamatan Miselia Jamur Endofit secara Mikroskopis

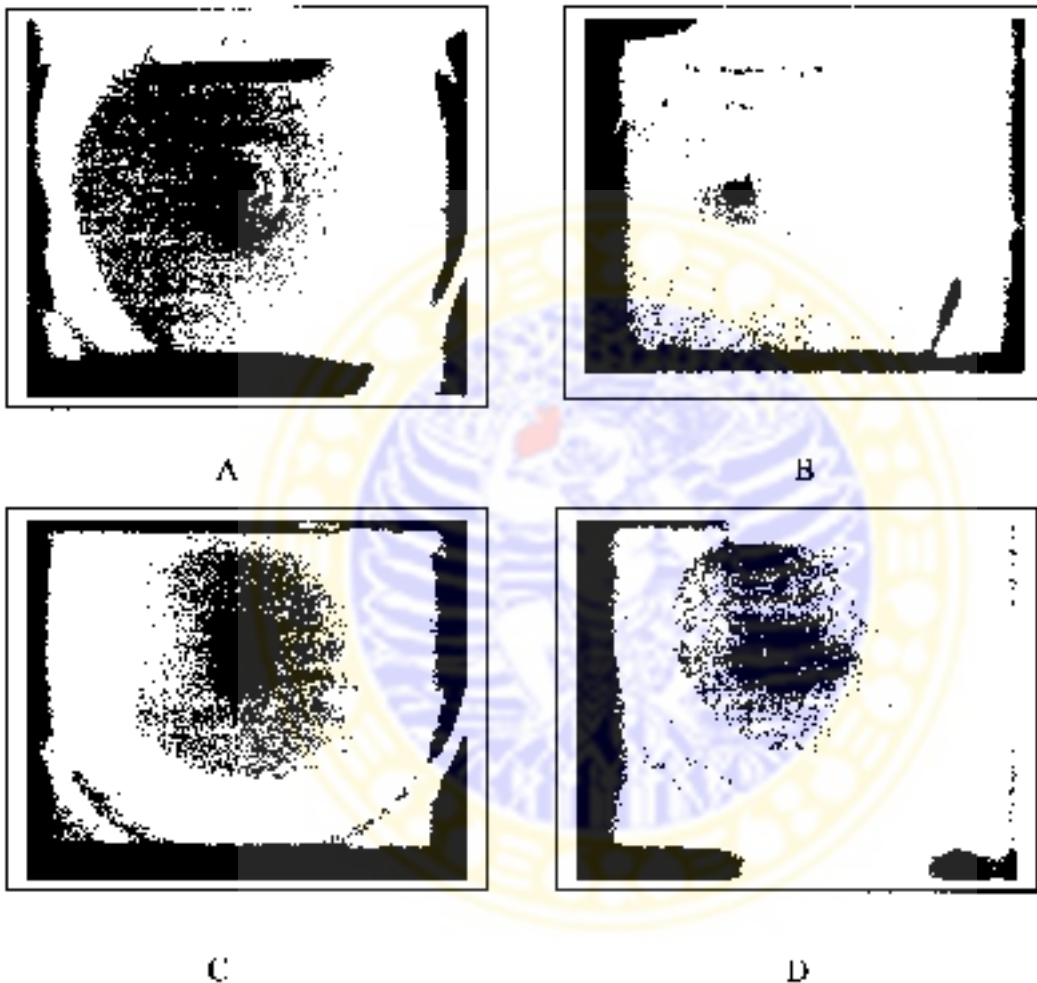
Miselial jamur ( kode Dsp 2 ) yang sudah diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi media *Malt Extract Agar*, *Potato Dextrose Agar*, *Czapek-Dox Agar* dan *Sabouraud Dextrose Agar* setelah diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari diamati dengan mikroskop.



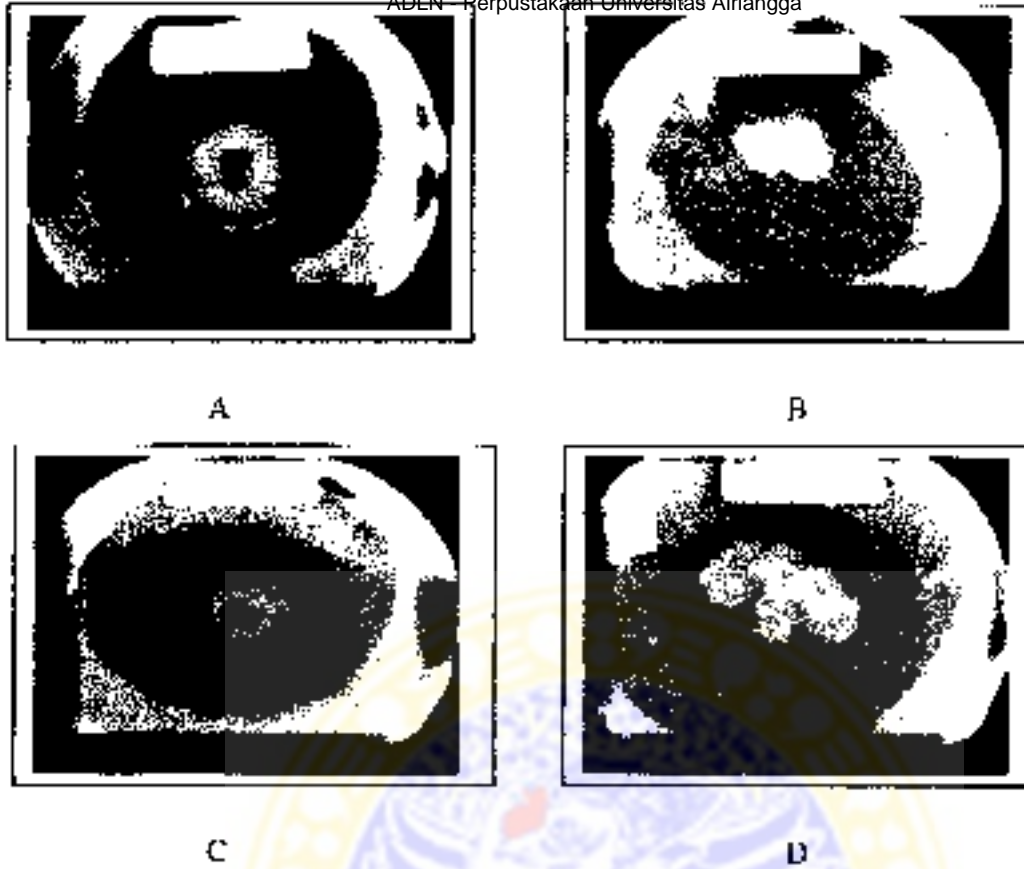
**Gambar 5.3** Profil Mikroskopi jamur endofit dari tanaman *Dioscorea sp* ( kode Dsp 2 ) dalam media ( A ) *Malt Extract Agar* ( B ) *Potato Dextrose Agar* ( C ) *Czapek-Dox Agar*, ( D ) *Sabouraud Dextrose Agar*

### 5.5 Pengamatan Miselia Jamur Endofit secara Makroskopis

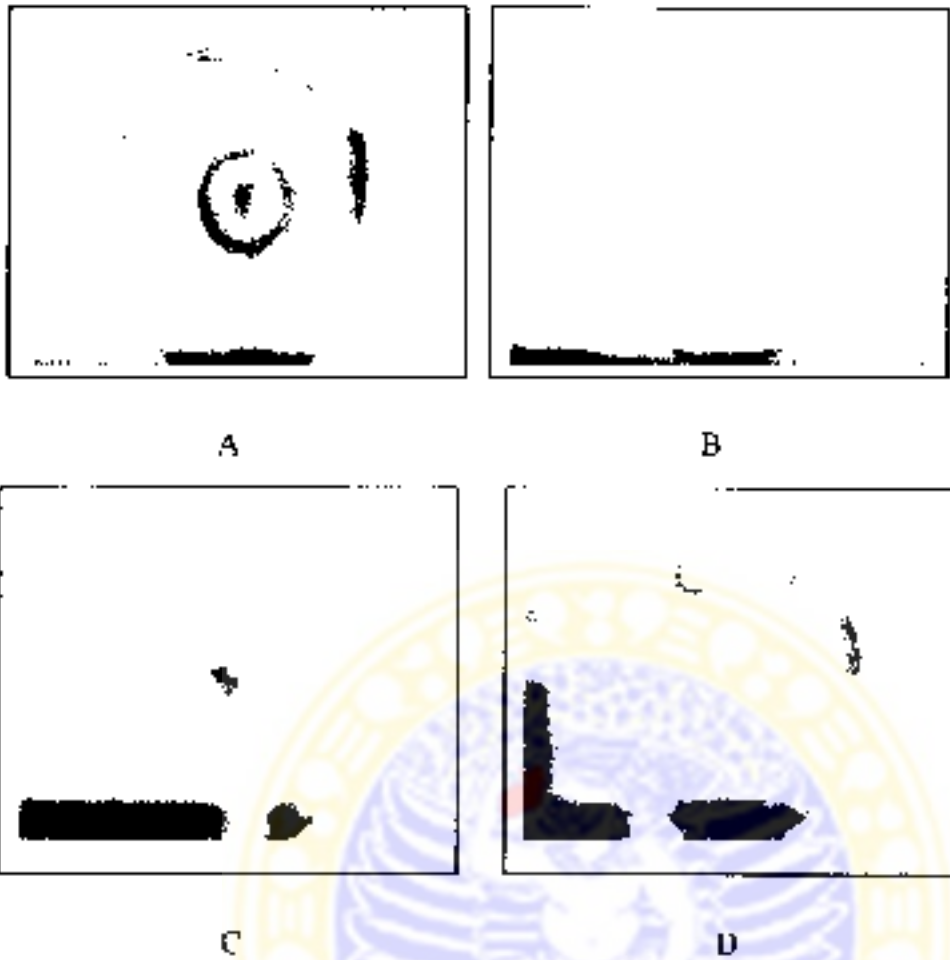
Miselial jamur ( kode Dsp 2 ) yang sudah diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi media *Malt Extract Agar*, *Potato Dextrose Agar*, *Sabouroud Dextrose Agar* dan *Czapek-Dox Agar* setelah diinkubasi pada suhu kamar selama 7-28 hari. Gambar 5.3 menunjukkan pertumbuhan jamur endofit dalam waktu tertentu diamati secara visual.



**Gambar 5.4** Profil makroskopis jamur endofit ( kode Dsp 2 ) usia 7 hari dalam media ( A ) *Potato Dextrose Agar*, ( B ) *Czapek-Dox Agar*, ( C ) *Malt Extract Agar*, ( D ) *Sabouroud Dextrose Agar*



**Gambar 5.5** Profil makroskopi jamur endofit ( kode Dsp 2 ) usia 14 hari dalam media ( A ) *Potato Dextrose Agar*, ( B ) *Czapek-Dox Agar*, ( C ) *Mult Extract Agar*, ( D ) *Sabouraud Dextrose Agar*



**Gambar 5.6** Profil jamur endofit ( kode Dsp 2 ) usia 21 hari dalam media ( A ) *Potato Dextrose Agar*, ( B ) *Czapek-Dox Agar*, ( C ) *Malt Extract Agar*, ( D ) *Sabouraud Dextrose Agar*

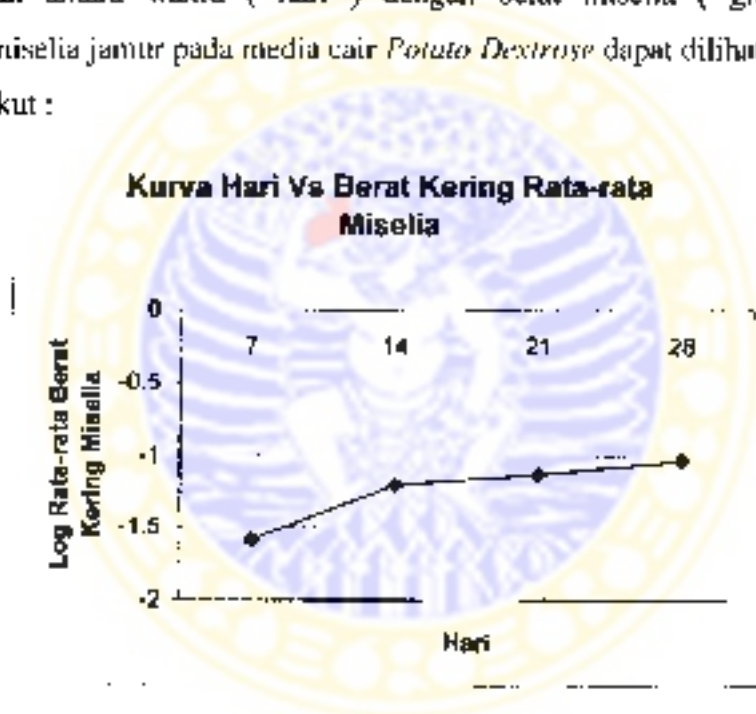
### 5.6 Pertumbuhan Miselia Jamur pada Media cair *Potato Dextrose*

Miselia jamur ( kode Dsp 2 ) yang sudah diinokulasikan dalam media pertumbuhan *Potato Dextrose* cair, selanjutnya dilakukan pengamatan pertumbuhan miselia selama 7, 14, 21 dan 28 har. Dilakukan perhitungan rata-rata berat kering miselia jamur dari 2 botol untuk masing-masing usia jamur. Data pertumbuhan miselia jamur dapat dilihat pada tabel V.2 berikut :

**Tabel V.2. Data Pengamatan Berat Kering Miselia Jamur ( kode Dsp 2 ) pada Media Cair *Potato Dextrose***

Replikasi	Berat miselia kering ( dalam gram ) pada hari ke-			
	H <sub>7</sub>	H <sub>14</sub>	H <sub>21</sub>	H <sub>28</sub>
1	0.011	0.047	0.070	0.096
2	0.041	0.061	0.078	0.088
Rata-rata	0.026	0.0625	0.074	0.092

Dari data pengamatan di atas kemudian dibuat kurva pertumbuhan, yaitu kurva yang menghubungkan antara waktu ( hari ) dengan berat miselia ( gram ). Kurva pertumbuhan miselia jamur pada media cair *Potato Dextrose* dapat dilihat pada gambar 5. sebagai berikut :

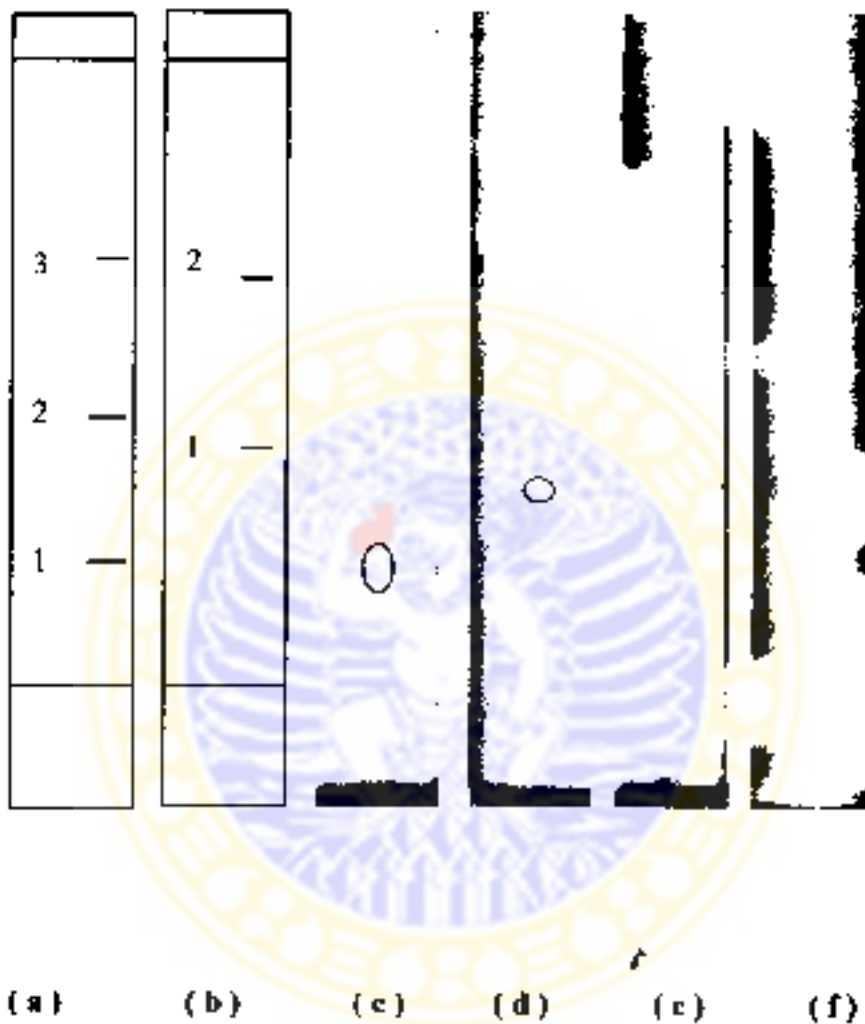


**Gambar 5.7** Kurva pertumbuhan jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada tanaman *Dioscorea sp* dalam media cair *Potato Dextrose*



## 5.7 Hasil Studi Profil Senyawa Metabolit Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) Tanaman *Dioscorea sp*

### 5.7.1 Ekstrak etil asetat miselia dengan fase gerak n-Heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1



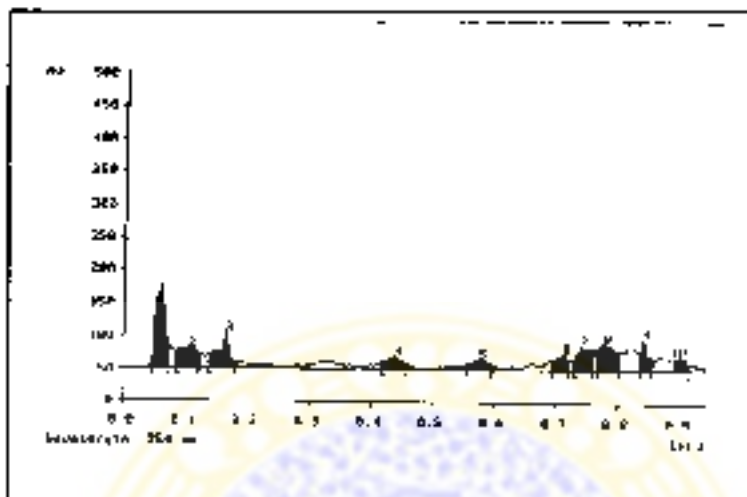
**Gambar 5.8** Profil kromatografi ekstrak etil asetat dari miselia fungi endofit pada tanaman *Dioscorea sp*. Kondisi KLT : silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam dan n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1 V<sub>v</sub> sebagai fase gerak. Noda diamati dengan penampak noda ( a ) sinar UV 254; ( b ) sinar 365 nm; ( c ) Anisaldehyd asam sulfat; ( d ) Vanilin asam sulfat; ( e ) Dragendorff; ( f ) Sitrat borat

**Tabel V.3 Data Profil KLT-Densitometri Ekstrak Etil Asetat Miselia Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan Eluen n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1 % dan Berbagai Penampak Noda**

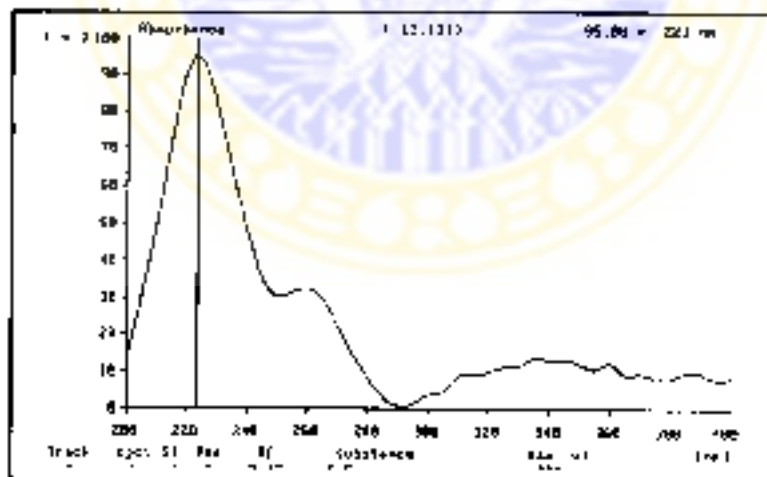
Penampak noda	Kromatogram			
	Noda		Rf	$\lambda_{maks}$ pengamatan spektra noda ( nm )
	+/- ( Jumlah )	Warna		
Sinar UV $\lambda = 254 \text{ nm}$	+	Ungu	0,17	223
	( 3 )	Ungu	0,74	287
		Ungu	0,84	272
Sinar UV $\lambda = 365 \text{ nm}$	+	Hijau	0,48	290
	( 2 )	kebiruan		
		Hijau kebiruan	0,75	288
Anisaldehyd asam sulfat	- ( 1 )	Kuning	0,14	-
Vanillin asam sulfat	+	Coklat	0,17	-
	( 3 )	Biru	0,71	-
		Biru	0,86	-
Dragendorf	-	-	-	-
Sitrat borat	-	-	-	-

Keterangan : tanda ( - ) menunjukkan bahwa penampak noda tidak menimbulkan perubahan warna.

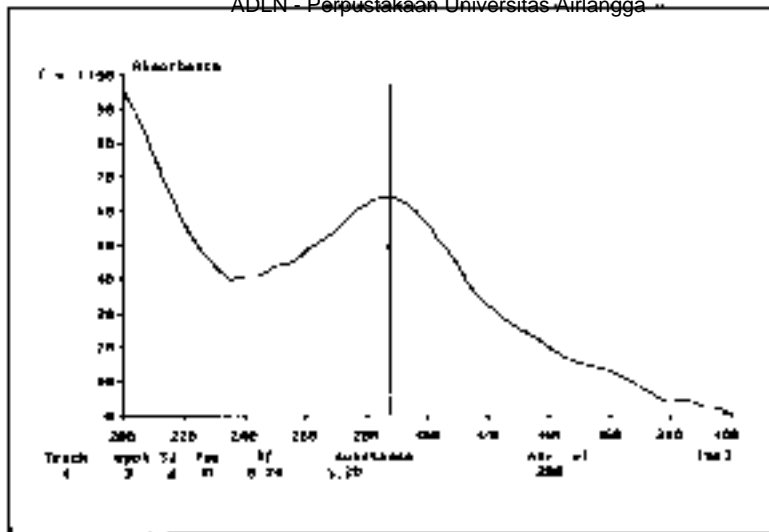
**Gambar Densitogram dan spectra hasil KLT ekstrak etil asetat Miselia Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan Eluen n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1  $\frac{v}{v}$  yang diamati dengan sinar UV**



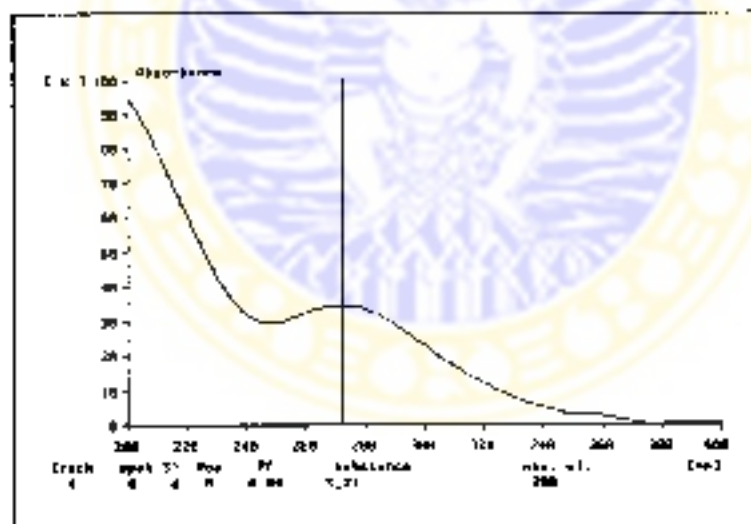
**Gambar 5.9 Densitogram ekstrak etil asetat Miselia Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1  $\frac{v}{v}$  sebagai fase gerak dan silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam. Noda diamati dengan sinar UV pada  $\lambda = 254$  nm**



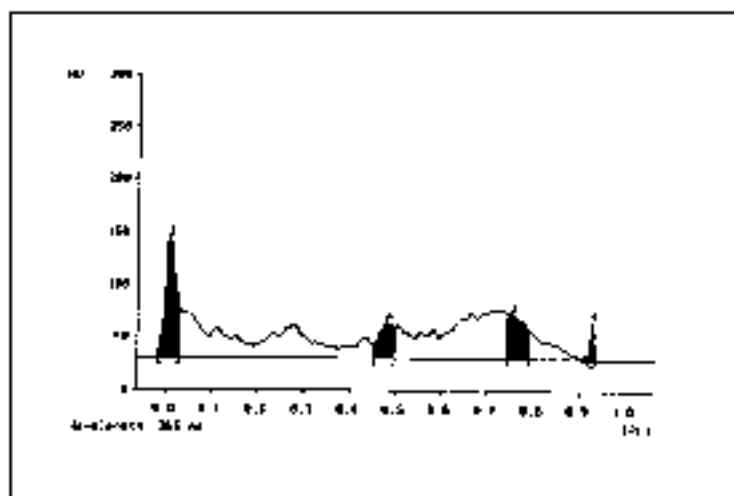
**Gambar 5.10 Spektra noda 2 Ekstrak etil asetat miselia Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm.  $\lambda$  maksimum = 223 nm, kondisi KLT : lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1  $\frac{v}{v}$ . Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 254$  nm**



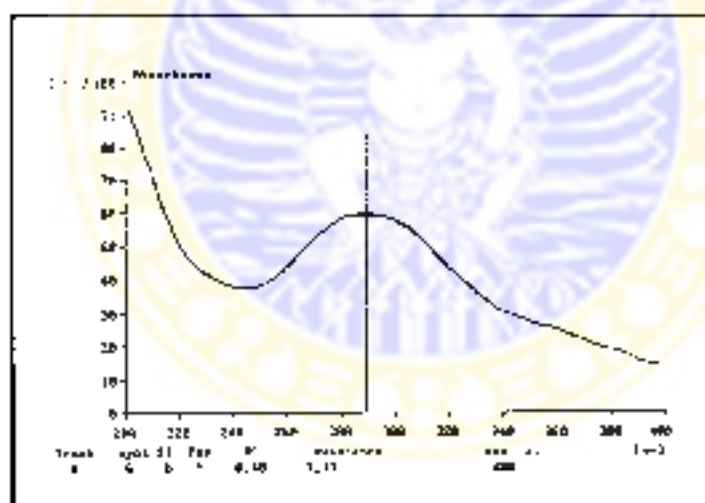
**Gambar 5.11** Spektra node 7 Ekstrak etil asetat miselia Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm.  $\lambda$  maksimum = 287 nm. kondisi KLT : lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1 %. Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 254$  nm



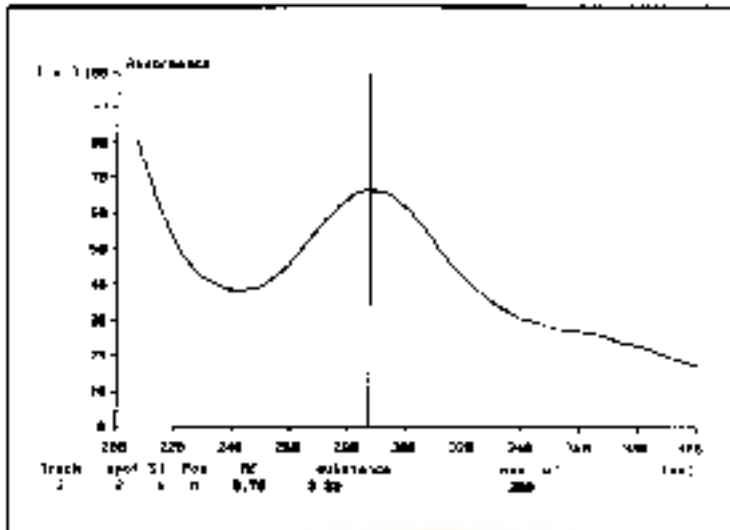
**Gambar 5.12** Spektra node 9 Ekstrak etil asetat miselia Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm.  $\lambda$  maksimum = 272 nm. kondisi KLT : lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1 %. Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 254$  nm



**Gambar 5.13** Densitogram ekstrak etil asetat Miselia Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1 %, sebagai fase gerak dan silika gel  $F_{254}$  sebagai fase diam. Noda diamati dengan sinar UV pada  $\lambda = 365 \text{ nm}$

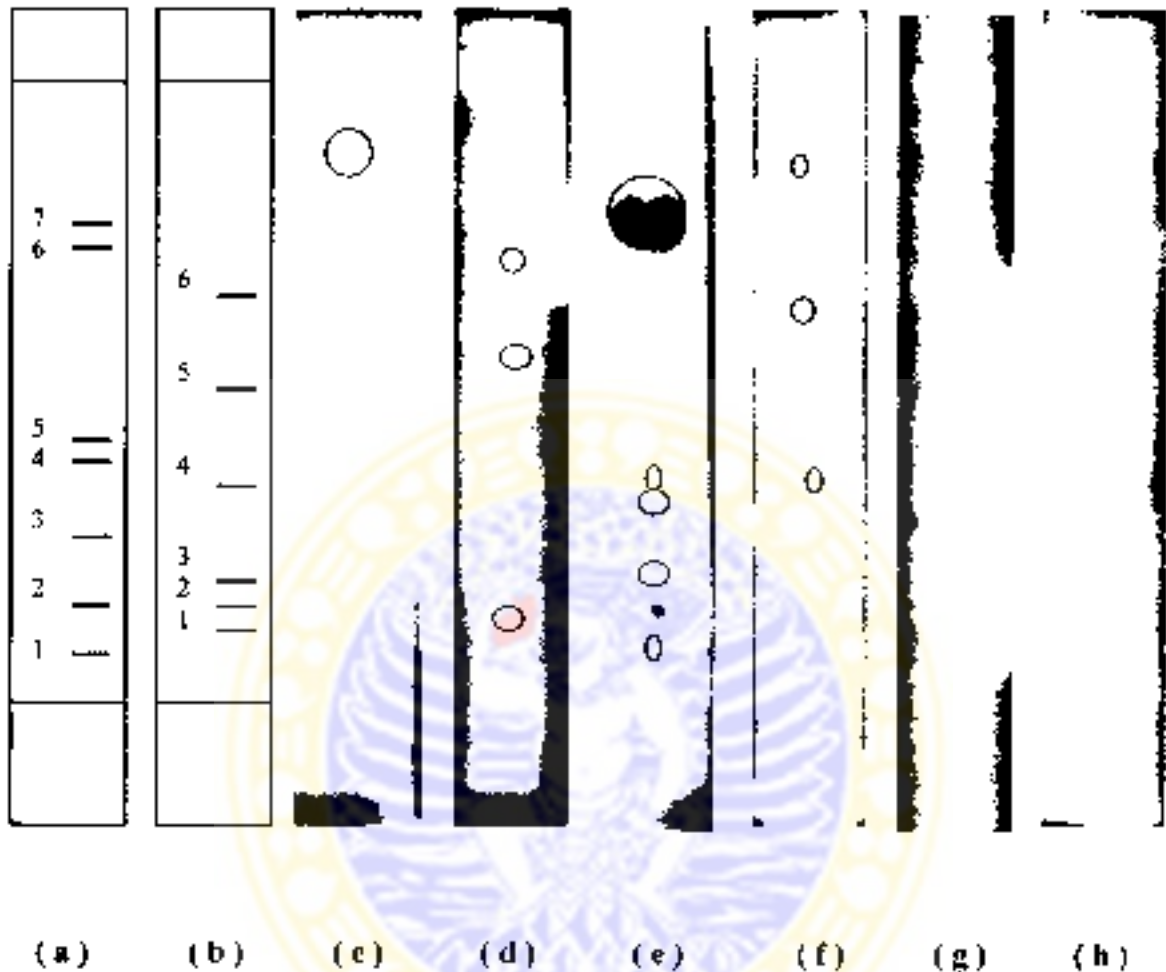


**Gambar 5.14** Spektra noda 2 Ekstrak etil asetat miselia Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200\text{--}400 \text{ nm}$ .  $\lambda$  maksimum = 290 nm. kondisi KLT : lempeng silika gel  $F_{254}$  sebagai fase diam. dan fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1 %. Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 365 \text{ nm}$



**Gambar 5.15** Spektre noda 3 Ekstrak etil asetat miselia Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm.  $\lambda$  maksimum = 288 nm. kondisi KLT = lempeng silika gel  $F_{254}$  sebagai fase diam, dan fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1  $v/v$ . Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 365$  nm

### 5.7.2 Ekstrak etil asetat media dengan fase gerak etil asetat : n-heksan = 4 : 1



**Gambar 5.16** Profil kromatografi ekstrak etil asetat dari media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada tanaman *Dioscorea sp.* Kondisi KLT : silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam dan etil asetat : n-heksan = 4 : 1 sebagai fase gerak. Noda diamati dengan penampak noda ( a ) sinar UV 254; ( b ) sinar UV 254 kontrol; ( c ) Anisaldehyd asam sulfat ; ( d ) Anisaldehyd asam sulfat ( kontrol ) ; ( e ) Vanilin asam sulfat ; ( f ) Vanilin asam sulfat ( kontrol ) ; ( g ) Dragendorff ; ( h ) Sitrat borat

**Tabel V.4 Data Profil KLT-Densitometri Ekstrak etil asetat Media Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan etil asetat : n-heksan = 4 : 1 % dan Berbagai Penampak Noda**

Penampak noda	Kromatogram				
	Noda		Rf	$\lambda_{maks}$ pengamatan spectra noda ( nm )	
	+/- ( Jumlah )	Warna			
Sinar UV $\lambda = 254 \text{ nm}$	+	( 4 )	Ungu terang	0,05	-
			Ungu terang	0,1	-
			Ungu terang	0,29	309
			Ungu terang	0,3	-
			Ungu terang	0,39	-
			Ungu terang	0,44	255
			Ungu terang	0,74	294
			Ungu terang	0,77	282
Sinar UV $\lambda = 365 \text{ nm}$	+	( 1 )	Hijau kebiruan	0,61	295
Anisaldehyd asam sulfat	+	( 1 )	Ungu	0,84	-
Vanillin asam sulfat	+	( 6 )	Biru	0,11	-
			Kuning	0,19	-
			Kuning	0,29	-
			Biru	0,44	-
			Biru	0,65	-
			Biru	0,77	-
Dragendorf	-	-	-	-	-
Sitrat berat	-	-	-	-	-

Keterangan : tanda ( - ) menunjukkan bahwa penampak noda tidak menimbulkan perubahan warna.

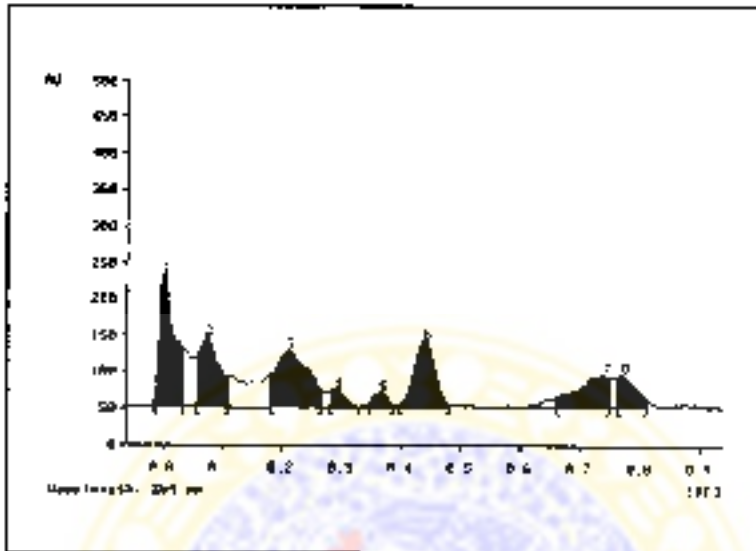


**Tabel V.5 Data Profil KLT-Densitometri Ekstrak etil asetat media kontrol Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan Eluen etil asetat : n- heksan = 4 : 1  $\frac{1}{v}$  dan Berbagai Penampak Noda**

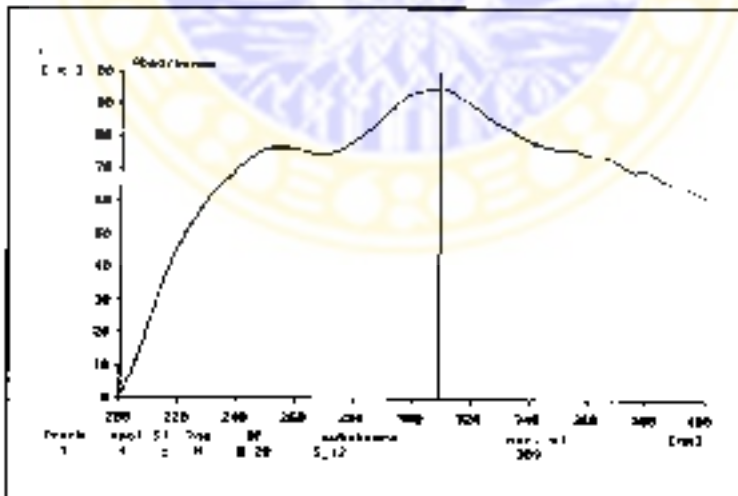
Penampak noda	Kromatogram			
	Noda		Rf	$\lambda_{maks}$ pengamatan spectra noda ( nm )
	+/- ( Jumlah )	Warna		
Sinar UV $\lambda = 254 \text{ nm}$	+	Ungu	0,05	-
		Ungu	0,1	-
		Ungu	0,3	-
		Ungu	0,15	298
		Ungu	0,41	295
Sinar UV $\lambda = 365 \text{ nm}$	+	Ungu	0,79	288
		Hijau	0,28	282
Anisaldehyd asam sulfat	+	Kuning	0,57	-
		Kuning	0,71	-
Vanillin asam sulfat	+	Biru muda	0,28	-
		Biru muda	0,84	-
		Kuning	0,73	-
Dragendorff	-	-	-	-
Sitrat borat	-	-	-	-

Keterangan : tanda ( - ) menunjukkan bahwa penampak noda tidak menimbulkan perubahan warna.

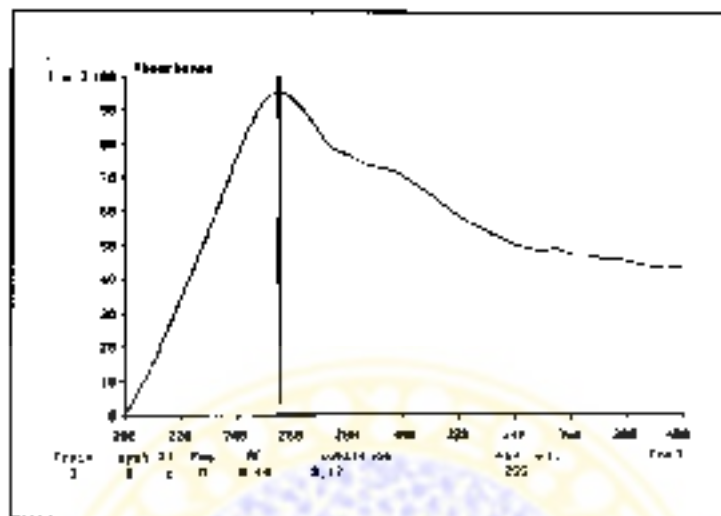
**Gambar Densitogram dan spectra hasil KLT Ekstrak etil asetat Media Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan eluen Eluen etil asetat : n-heksan = 4 : 1 %, yang diamati dengan sinar UV**



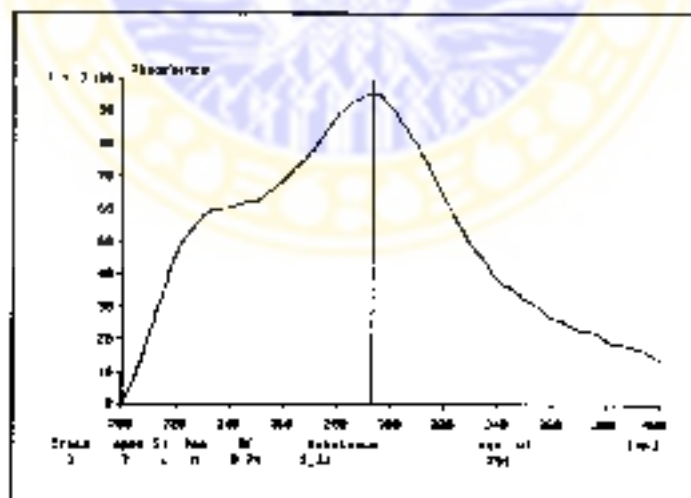
**Gambar 5.17** Densitogram Ekstrak etil asetat Media Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan eluen etil asetat : n-heksan = 4 : 1 %, sebagai fase gerak dan silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam. Noda diamati dengan sinar UV pada  $\lambda = 254 \text{ nm}$



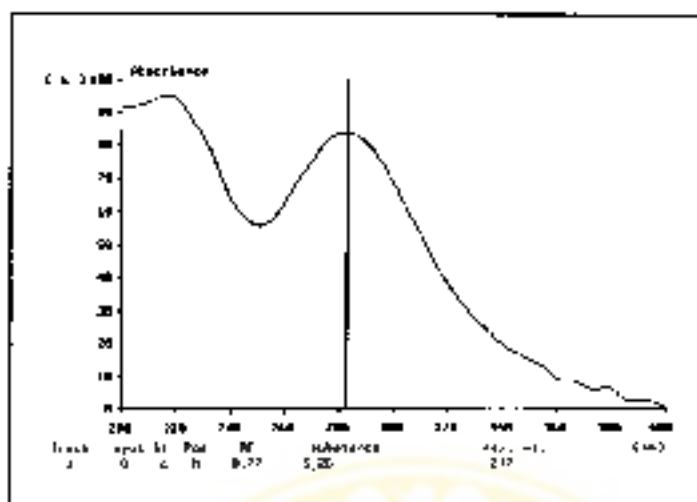
**Gambar 5.18** Spektira noda 3 Ekstrak etil asetat media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200\text{--}400 \text{ nm}$ .  $\lambda_{\text{maksimum}} = 309 \text{ nm}$ . kondisi KLT = lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak etil asetat: n-heksan = 4 : 1 %. Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 254 \text{ nm}$



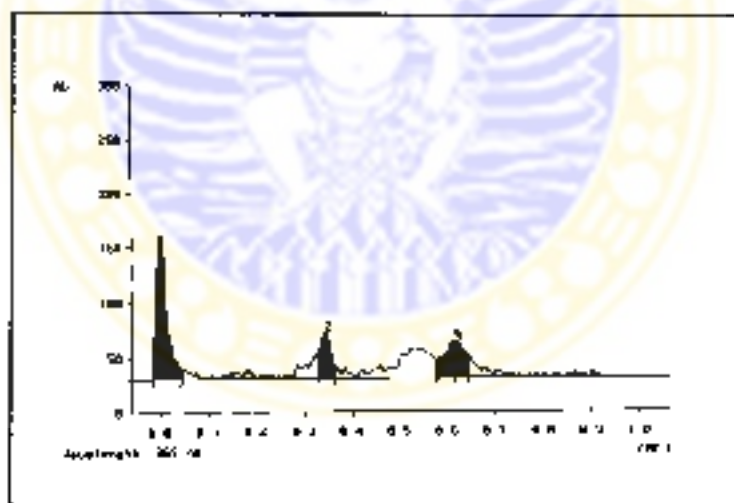
**Gambar 5.19** Spektra noda 6 Ekstrak etil asetat media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm.  $\lambda$  maksimum = 255 nm. kondisi KLT = lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak etil asetat: n-heksan = 4 : 1  
 %<sub>v</sub>. Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 254$  nm



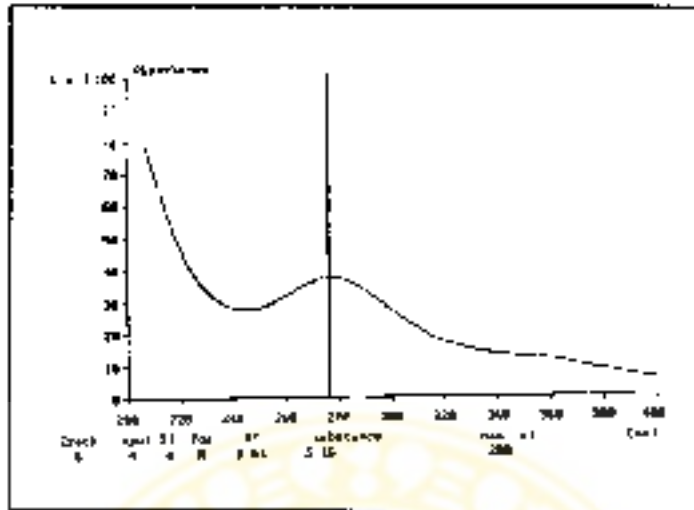
**Gambar 5.20** Spektra noda 7 Ekstrak etil asetat media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm.  $\lambda$  maksimum = 294 nm. kondisi KLT = lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak etil asetat: n-heksan = 4 : 1  
 %<sub>v</sub>. Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 254$  nm



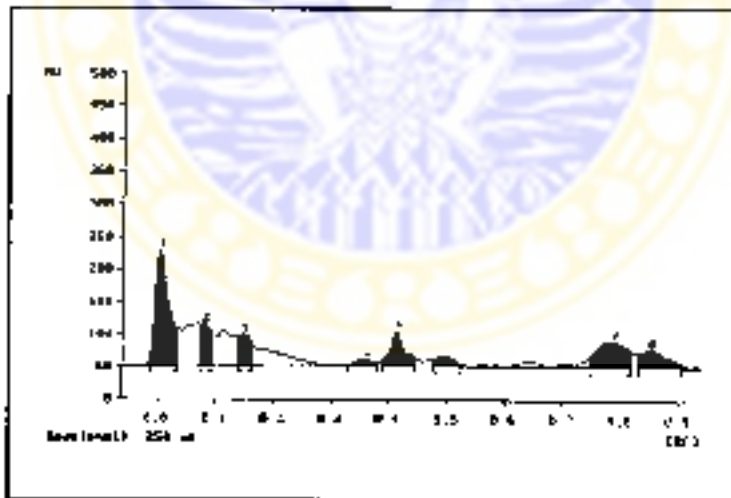
**Gambar 5.21** Spektra nada 8 Ekstrak etil asetat media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda$  200-400 nm.  $\lambda$  maksimum = 217 nm. kondisi KLT – lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak etil asetat: n-heksan = 4 : 1 %<sub>v</sub>. Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda$  = 254 nm



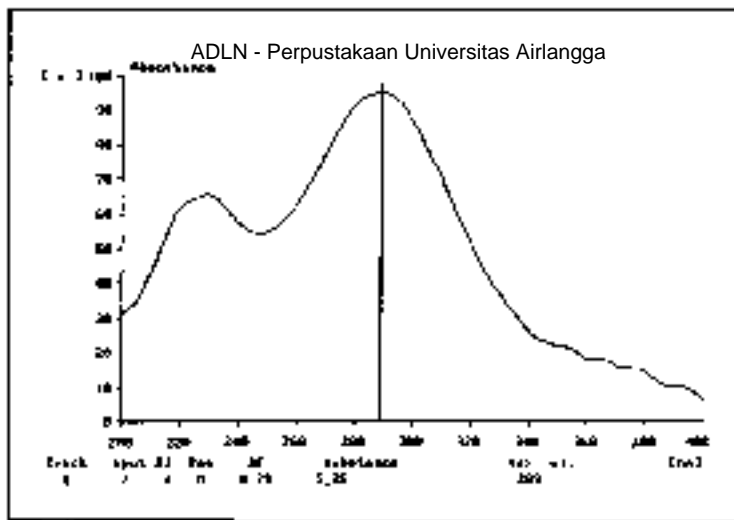
**Gambar 5.22** Densitogram Ekstrak etil asetat Media Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan eluen etil asetat: n-heksan = 4 : 1 %<sub>v</sub> sebagai fase gerak dan silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam. Noda diamati dengan sinar UV pada  $\lambda$  = 365 nm



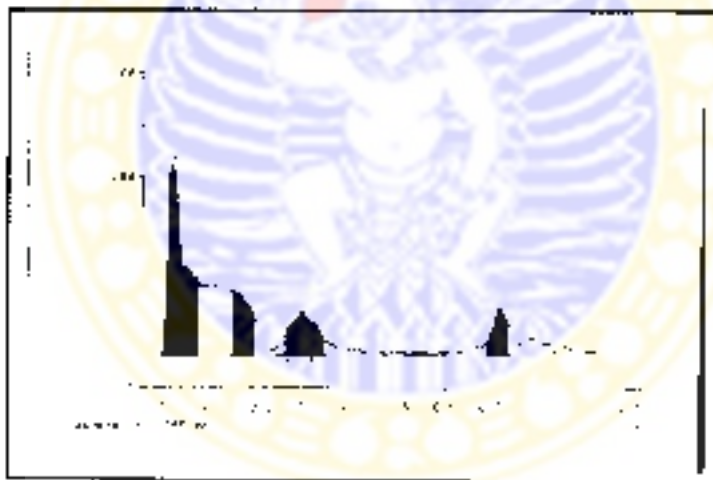
**Gambar 5.23** Spektra noda 3 Ekstrak etil asetat media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm.  $\lambda$  maksimum = 217 nm. kondisi KLT = lempong silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak etil asetat : n-heksan = 4 : 1 %<sub>v</sub>, pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 365$  nm



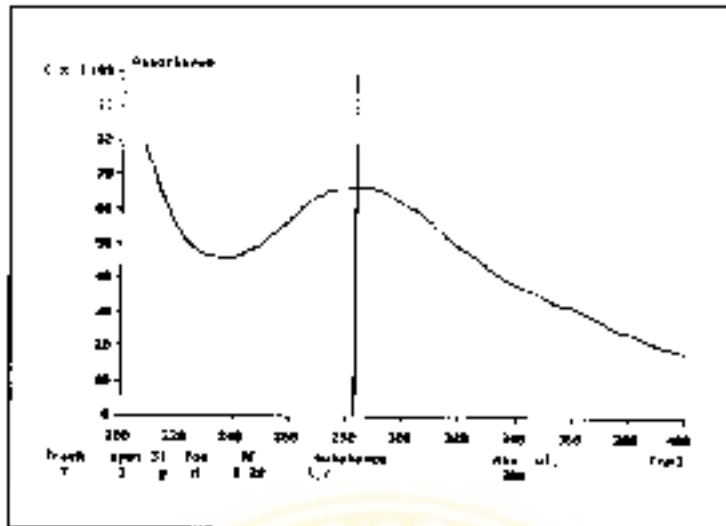
**Gambar 5.24** Densitogram Ekstrak etil Asetat Media kontrol Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan eluen etil asetat : n-heksan = 4 : 1 %<sub>v</sub> sebagai fase gerak dan silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam. Noda diamati dengan sinar UV pada  $\lambda = 254$  nm



**Gambar 5.25** Spektra noda 7 Ekstrak etil asetat media kontrol Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm,  $\lambda$  maksimum = 288 nm, kondisi KLT = tempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak etil asetat : n-heksan = 4 : 1 %. Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 254$  nm

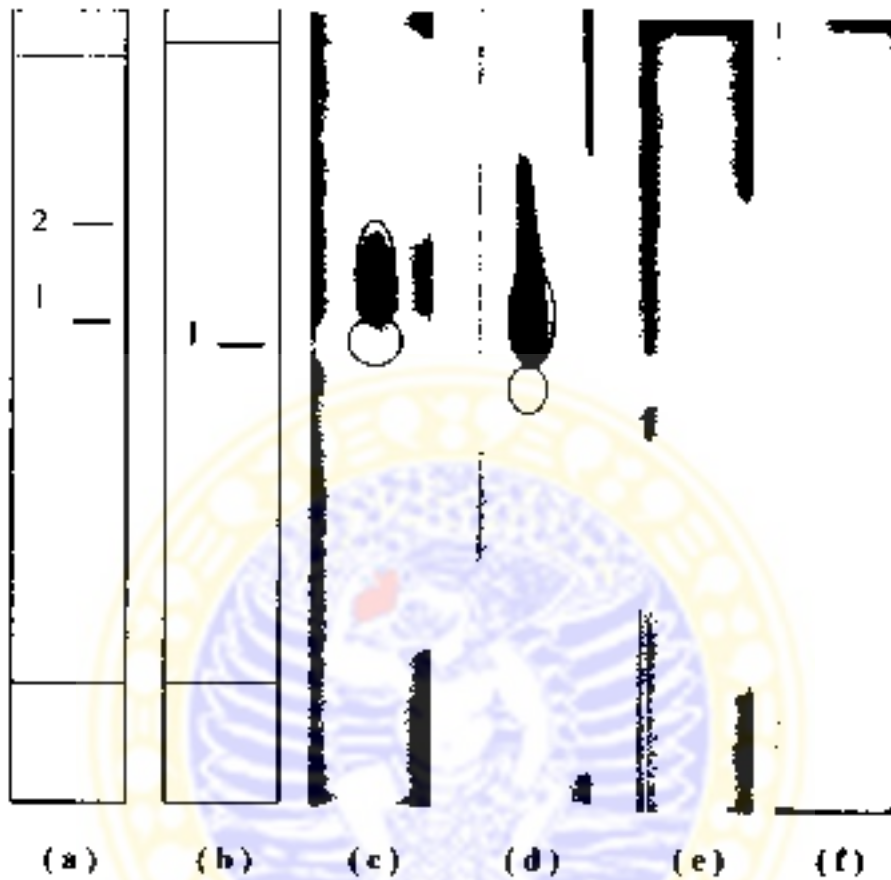


**Gambar 5.26** Densitogram Ekstrak etil Asetat Media kontrol Jamur Endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan eluen etil asetat : n-heksan = 4 : 1 %, sebagai fase gerak dan silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, Noda diamati dengan sinar UV pada  $\lambda = 365$  nm



**Gambar 5.27** Spektra noda 3 Ekstrak etil asetat media kontrol Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda$  200-400 nm.  $\lambda$  maksimum = 217 nm. kondisi KLT = lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak etil asetat : n-heksan = 4 : 1 v/v. Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda$  = 365 nm

### 5.7.3 Ekstrak n-heksan dengan fase gerak etil asetat : metanol = 9 : 1



**Gambar 5.28** Profil kromatografi ekstrak n-heksan dari miselia Jamur endofit (kode Dsp 2) pada tanaman *Dioscorea sp.* Kondisi KLT : silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam dan etil asetat : metanol = 9 : 1, sebagai fase gerak. Noda diamati dengan penampak noda ( a ) sinar UV 254; ( b ) sinar UV 365; ( c ) Anisaldehyd asam sulfat; ( d ) Vanilin asam sulfat; ( e ) Dragendorff; ( f ) Sitrat borat

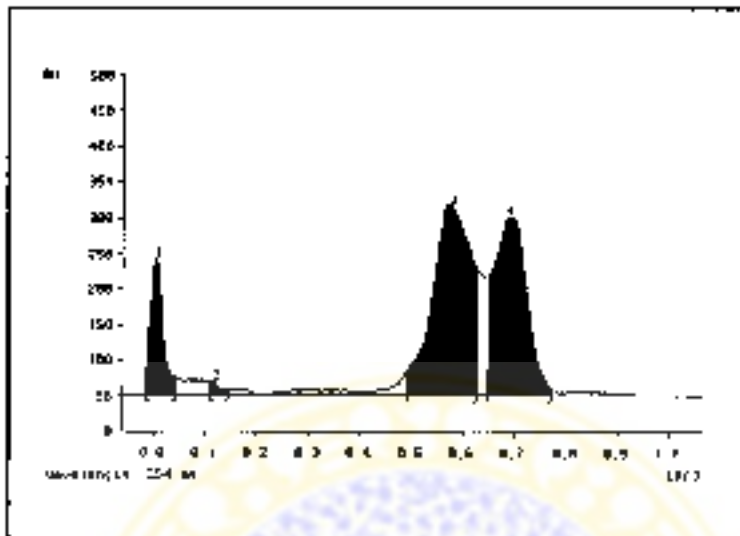


**Tabel V.6 Data Profil KLT-Densitometri Ekstrak n-heksan Miselia Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan Eluen etil asetat : metanol = 9 : 1 % dan Berbagai Penampak Noda**

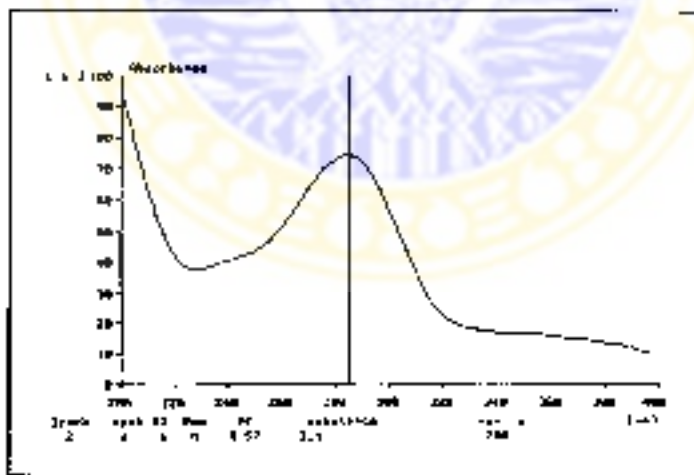
Penampak noda	Kromatogram			
	Noda +/- ( Jumlah )	Warna	Rf	$\lambda_{max}$ pengamatan spectra noda ( nm )
Sinar UV $\lambda = 254 \text{ nm.}$	+	Ungu	0,57	282
	( 2 )	Ungu	0,69	282
Sinar UV $\lambda = 365 \text{ nm.}$	+	Hijau kebiruan	0,53	282
Anisaldehyd asam sulfat	+	Biru gelap	0,59	-
	( 2 )	Biru gelap	0,71	-
Vanillin asam sulfat	+	Biru	0,44	-
	( 2 )	Biru	0,51	-
Dragendorf	-	-	-	-
Surat borat	-	-	-	-

Keterangan : tanda ( - ) menunjukkan bahwa penampak noda tidak menimbulkan perubahan warna.

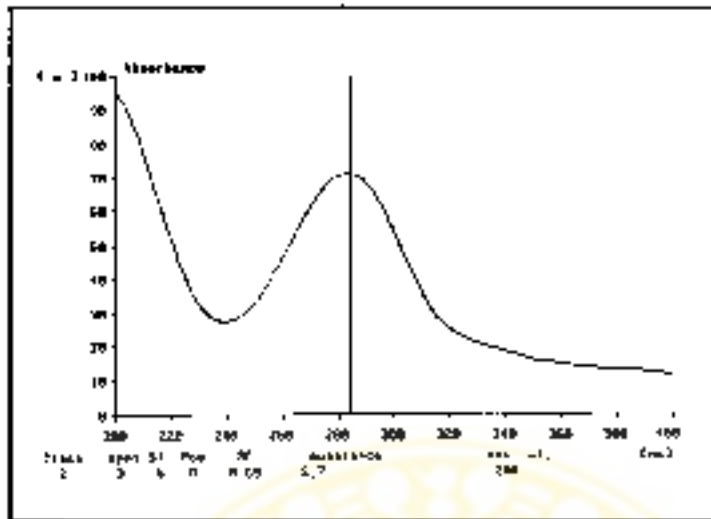
**Gambar Densitogram dan spectra hasil KLT Ekstrak n-heksan Miselia Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan Eluen etil asetat : metanol = 9 : 1 %, yang diamati dengan sinar UV**



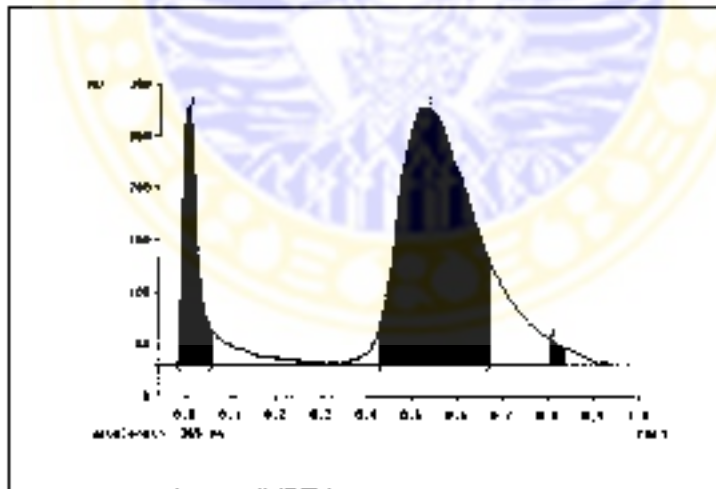
**Gambar 5.29** Densitogram Ekstrak n-heksan Miselia Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan eluen etil asetat : metanol = 9 : 1 %, sebagai fase gerak dan silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam. Noda diamati dengan sinar UV pada  $\lambda = 254$  nm.



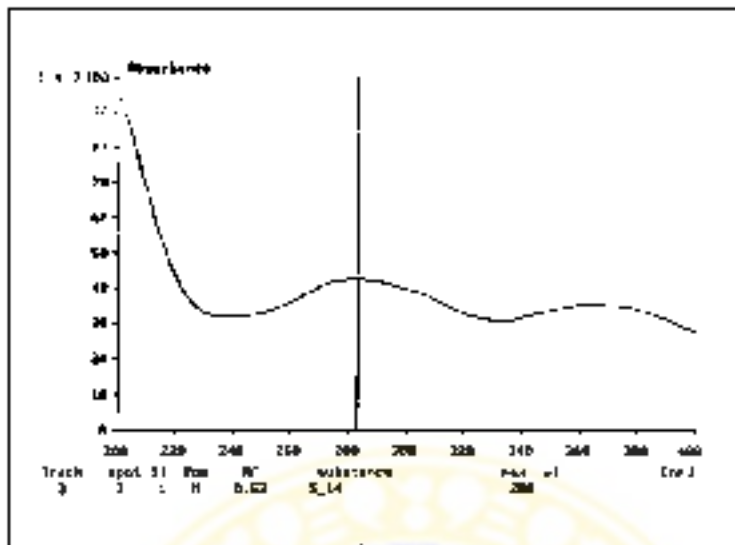
**Gambar 5.30** Spektra noda 3 Ekstrak n-heksan miselia Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm.  $\lambda$  maksimum = 282 nm. kondisi KLT = lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak etil asetat : metanol = 9 : 1 %. Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 254$  nm.



**Gambar 5.31** Spektra nada 4 Ekstrak n-heksan miselia Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm.  $\lambda$  maksimum = 282 nm. kondisi KLT = tempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak etil asetat : metanol = 9 : 1 %  
%. Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 254$  nm.

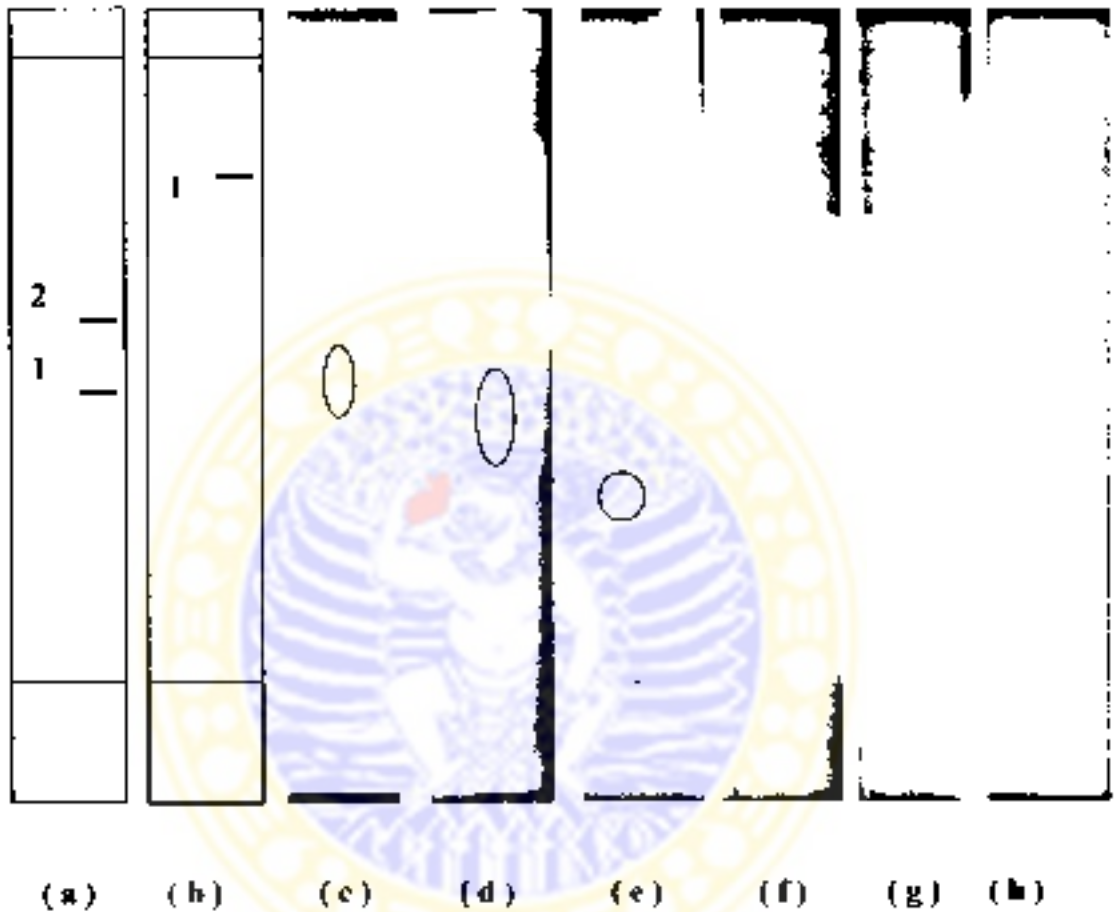


**Gambar 5.32** Densitogram Ekstrak n-heksan Miselia Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan eluen etil asetat : metanol = 9 : 1 % sebagai fase gerak dan silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam. Noda diamati dengan sinar UV pada  $\lambda = 365$  nm.



**Gambar 5.33** Spektra nodul 2 Ekstrak n-eksan miselia jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm.  $\lambda$  maksimum = 282 nm. kondisi KLT = lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak etil asetat : metanol = 9 : 1  
 % Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 365$  nm.

**5.7.4 Ekstrak metanol media dengan fase gerak kloroform : metanol : air = 2 : 7 : ½**



**Gambar 5.34** Profil kromatografi ekstrak metanol dari media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada tanaman *Dioscorea sp.* Kondisi KLT : silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam dan kloroform : metanol : air = 2 : 7 : ½, sebagai fase gerak. Noda diamati dengan penampak noda ( a ) sinar UV 254; ( b ) sinar UV 254 kontrol; ( c ) Anisaldehyd asam sulfat; ( d ) Anisaldehyd asam sulfat( kontrol ); ( e )Vanilin asam sulfat; ( f ) Vanilin asam sulfat ( kontrol ); ( g )Dragendorff; ( h ) Sitrat borat

**Tabel V.7 Data Profil KLT- Ekstrak metanol media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan Eluen kloroform : metanol : air = 2 : 7 : ½ % dan Berbagai Penampak Noda**

Penampak noda	Kromatogram			
	Noda		Rf	Amaks pengamatan spectra noda ( nm )
	+/- ( Jumlah )	Warna		
Sinar UV $\lambda = 254 \text{ nm}$	+ ( 1 )	Ungu	0,46	272
		Ungu	0,55	270
Sinar UV $\lambda = 365 \text{ nm}$	+ ( 1 )	Hijau	0,80	290
Anisaldehid Asam sulfat	+ ( 1 )	Kuning terang	0,56	-
Vanillin asam sulfat	+ ( 1 )	Biru-ungu	0,31	-
Dragendorf	-	-	-	-
Sitrat borat	-	-	-	-

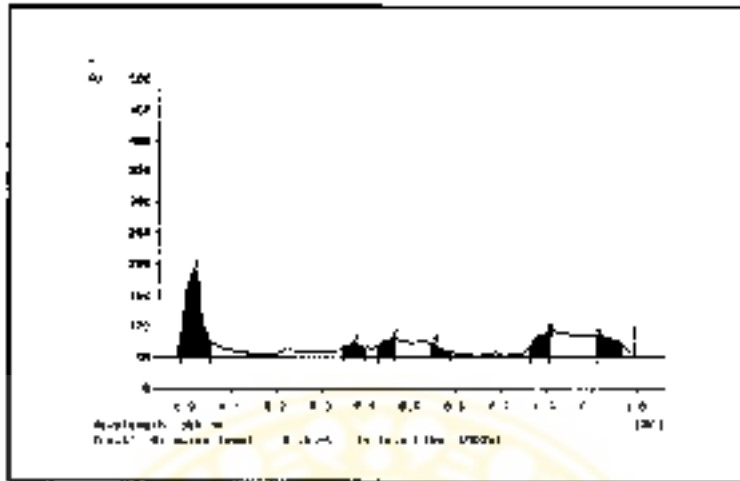
Keterangan : tanda ( - ) menunjukkan bahwa penampak noda tidak menimbulkan perubahan warna

**Tabel V.8 Data Profil KLT- Ekstrak metanol media kontrol Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan Eluen kloroform : metanol : air = 2 : 7 : ½ %, dan Berbagai Penampak Noda**

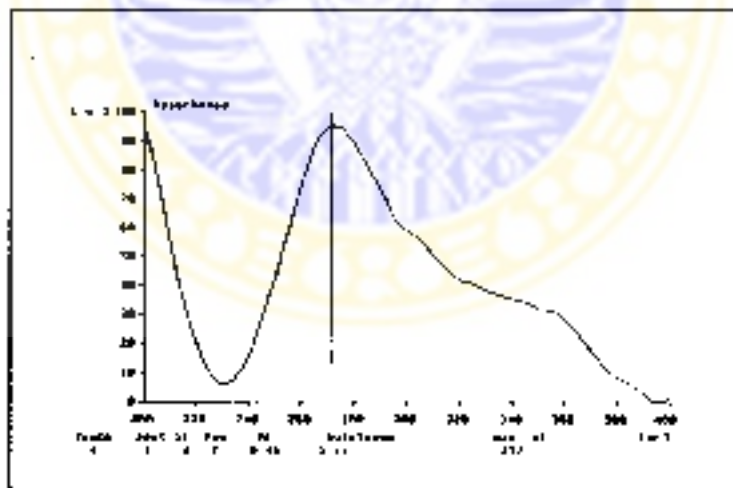
Penampak noda	Kromatogram			
	Noda		Rf	λ maks pengamatan spectra noda ( nm )
	+/- ( Jumlah )	Warna		
Sinar UV λ = 254 nm	+ ( 1 )	Ungu	0,80	290
Sinar UV λ = 365 nm	+ ( 2 )	Hijau	0,32	292
Anisaldehyd asam sulfat	+ ( 1 )	Coklat muda	0,38	-
Vanillin asam sulfat	+ ( 1 )	Coklat	0,38	-
Dragendorf	-	-	-	-
Sitrat borat	-	-	-	-

Keterangan : tanda ( - ) menunjukkan bahwa penampak noda tidak menimbulkan perubahan warna.

**Gambar Densitogram dan spectra hasil KLT Ekstrak metanol media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan Eluen kloroform : metanol : air = 2 : 7 : 1/2 %, yang diamati dengan sinar UV**

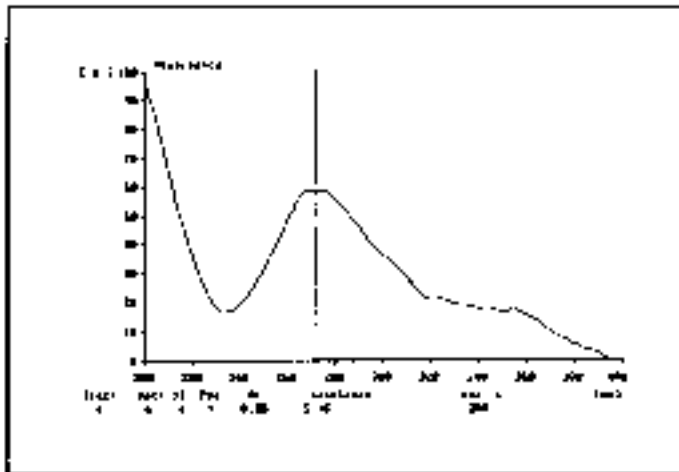


**Gambar 5.35 Densitogram ekstrak metanol media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan Eluen kloroform : metanol : air = 2 : 7 : 1/2 %, sebagai fase gerak dan silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam. Noda diamati dengan sinar UV pada  $\lambda = 254 \text{ nm}$**

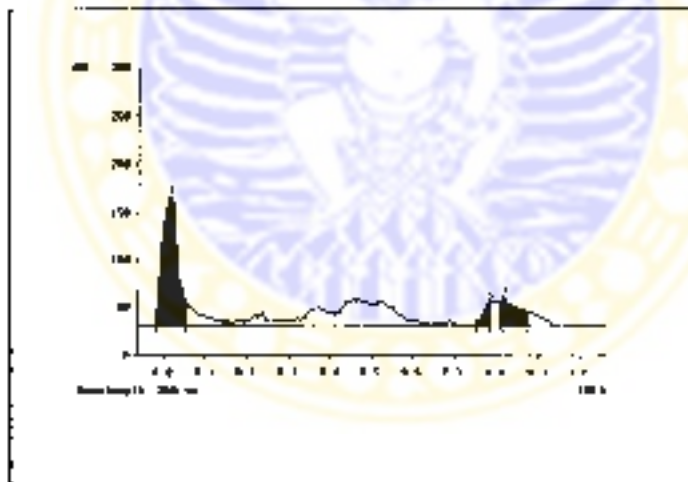


**Gambar 5.36 Spektra noda 3 Ekstrak metanol media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400 \text{ nm}$ .  $\lambda$  maksimum = 272 nm. kondisi KLT = lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak kloroform : metanol : air = 2 : 7 : 1/2 %, Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 254 \text{ nm}$**

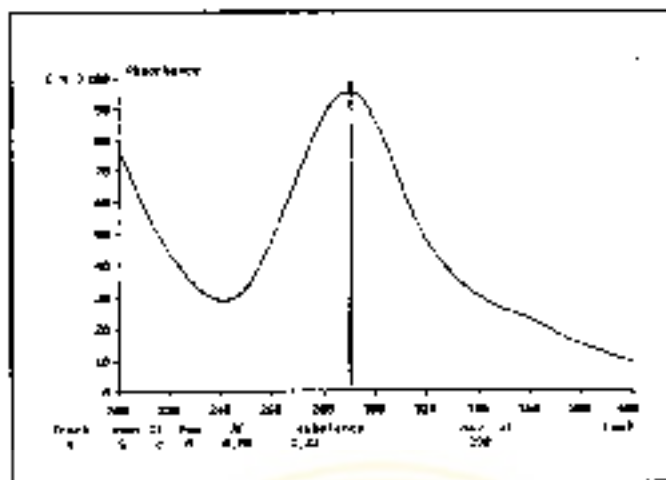




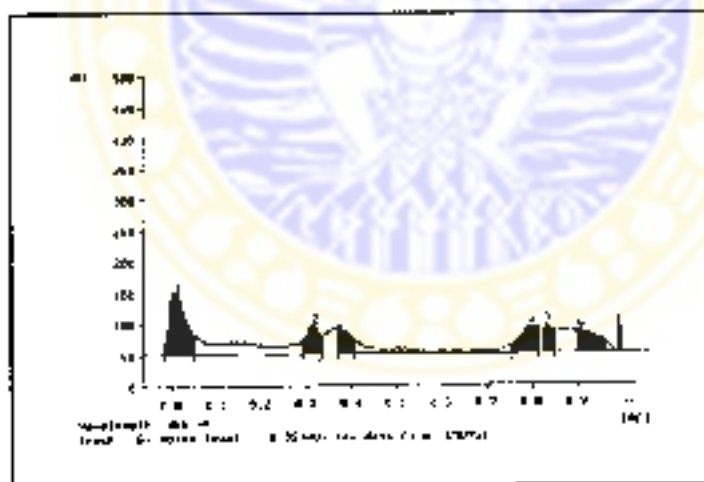
**Gambar 5.37** Spektre noda 4 Ekstrak metanol media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm.  $\lambda$  maksimum = 270 nm, kondisi KLT = lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak kloroform ; metanol : air = 2 : 7 : 1/2 v/v, Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 254$  nm



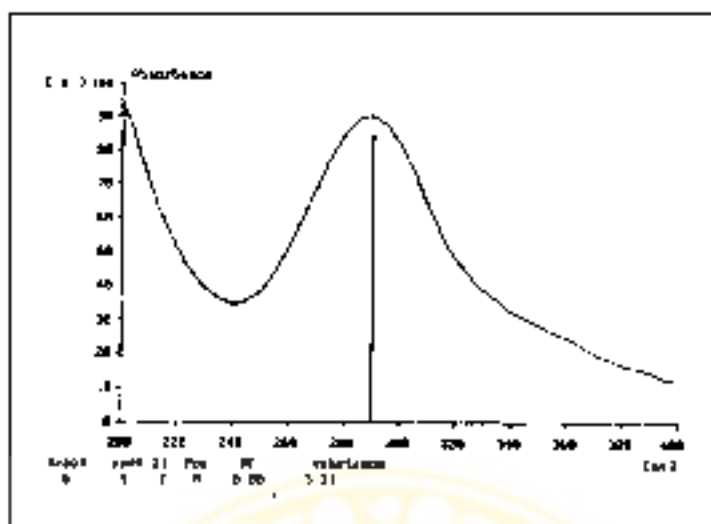
**Gambar 5.38** Densitogram Ekstrak metanol media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan Eluen kloroform ; metanol : air = 2 : 7 : 1/2 v/v sebagai fase gerak dan silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam. Noda diamati dengan sinar UV pada  $\lambda = 365$  nm



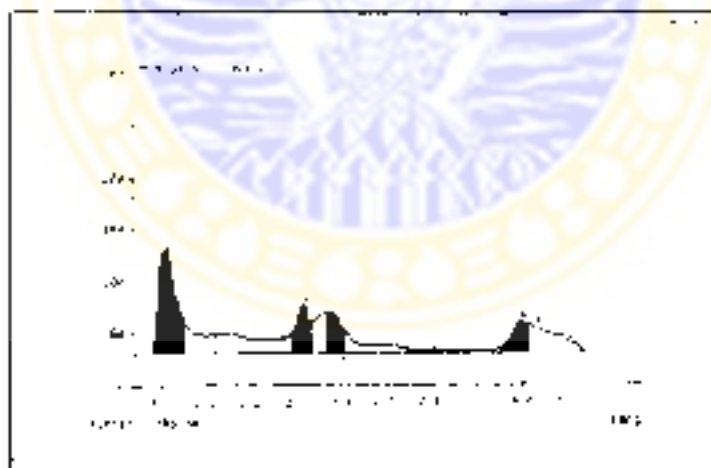
**Gambar 5.39** Spektra noda 3 Ekstrak metanol media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm.  $\lambda$  maksimum = 290 nm. kondisi KLT = lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak kloroform : metanol : air = 2 : 7 : 1/2 %. Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 365$  nm



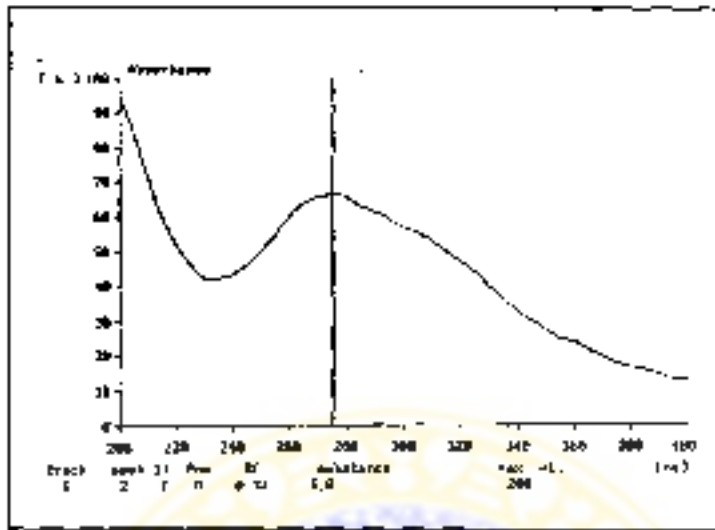
**Gambar 5.40** Densitogram Ekstrak metanol media kontrol Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan Eluen kloroform : metanol : air = 2 : 7 : 1/2 %, sebagai fase gerak dan silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam. Noda diamati dengan sinar UV pada  $\lambda = 254$  nm



**Gambar 5.41** Spektra noda 6 Ekstrak metanol media Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm.  $\lambda$  maksimum = 290 nm. kondisi KLT = lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak kloroform : metanol : air = 2 : 7 : ½ %, Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 365$  nm

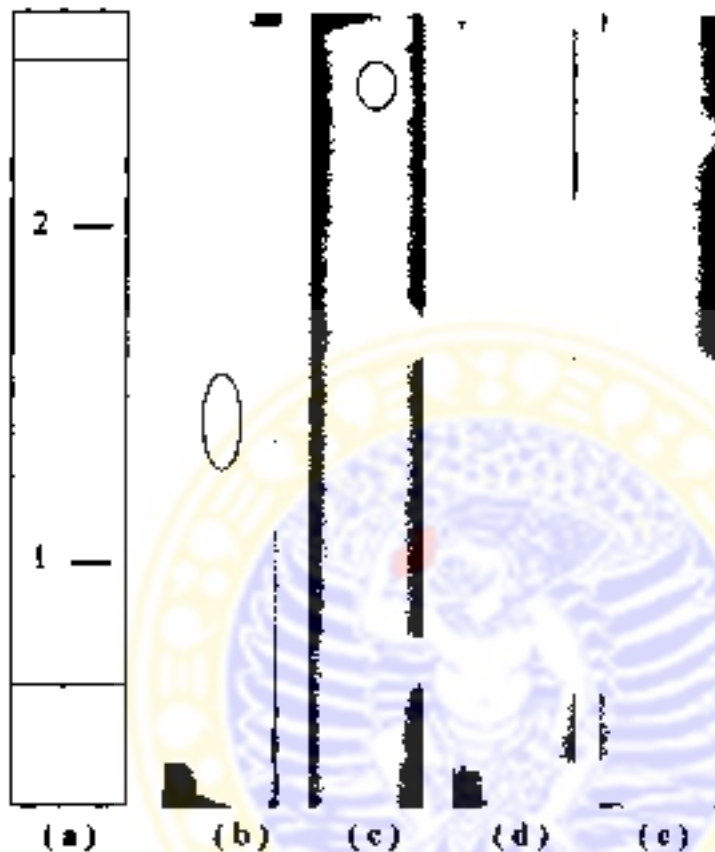


**Gambar 5.42** Densitogram Ekstrak metanol media kontrol Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan Eluen kloroform : metanol : air = 2 : 7 : ½ %, sebagai fase gerak dan silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam. Noda diamati dengan sinar UV pada  $\lambda = 365$  nm



**Gambar 5.43** Spektra pada 2 Tkstrak metanol media kontrolJamur endolite ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm.  $\lambda$  maksimum = 292 nm. kondisi KLT = lempeng silica gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak kloroform : metanol : air = 2 : 7 : 1/2 v/v. Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 365$  nm

**5.7.5 Ekstrak metanol miselia dengan fase gerak etil asetat : metanol : air = 7: 2: 1**

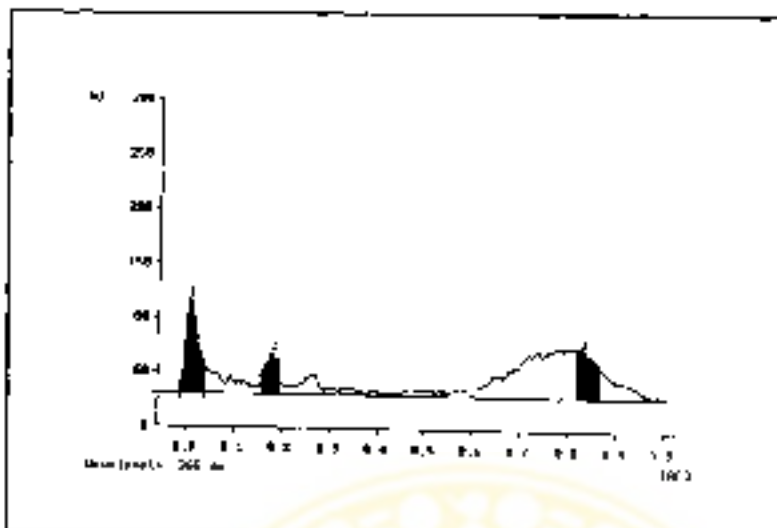


**Gambar 5.44** Profil kromatografi methanol dari miselia Jamur endofit (kode Dsp 2) pada tanaman *Dioscorea sp.* Kondisi KLT : silica gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam dan etil asetat : metanol : air = 7: 2: 1 sebagai fase gerak. Noda diamati dengan penampak noda ( a ) sinar UV; ( b ) Anisaldehyd asam sulfat; ( c ) Vanilin asan sulfat; ( d ) Dragendorff; ( e ) Sitrat borat

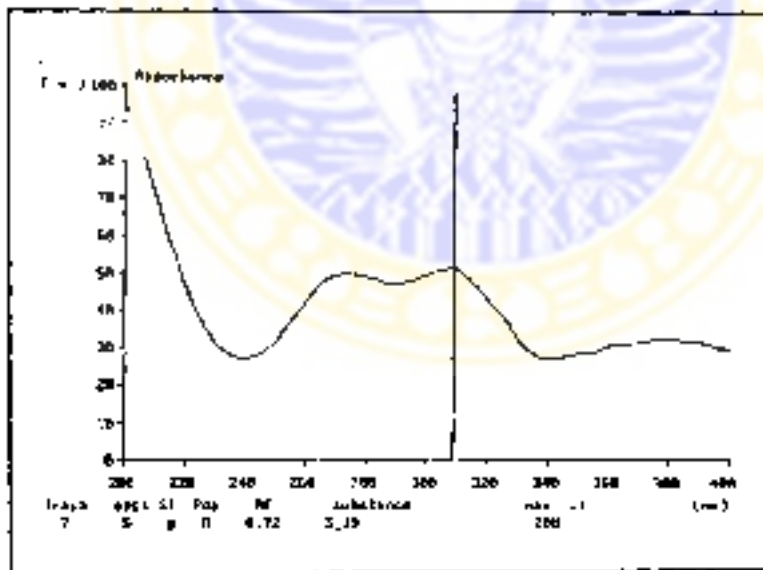
**Tabel V.9 Data Profil KLT- Ekstrak metanol miselia Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea* sp dengan Eluen asetat : metanol : air =7: 2: 1%, dan Berbagai Penampak Noda**

Penampak noda	Kromatogram			
	Noda		Rf	
	+/- ( Jumlah )	Warna		
			$\lambda_{maks}$ pengamatan spectra noda ( nm )	
Sinar UV $\lambda = 254 \text{ nm}$	+ ( 2 )	Ungu	0,17	223
		Ungu	0,72	310
Sinar UV $\lambda = 365 \text{ nm}$	-	-	-	-
Anisaldehyd asam sulfat	+ ( 1 )	Kuning	0,38	-
Vanillin asam sulfat	+ ( 1 )	Biru	0,93	-
Dragendorf	-	-	-	-
Sifat borat	-	-	-	-

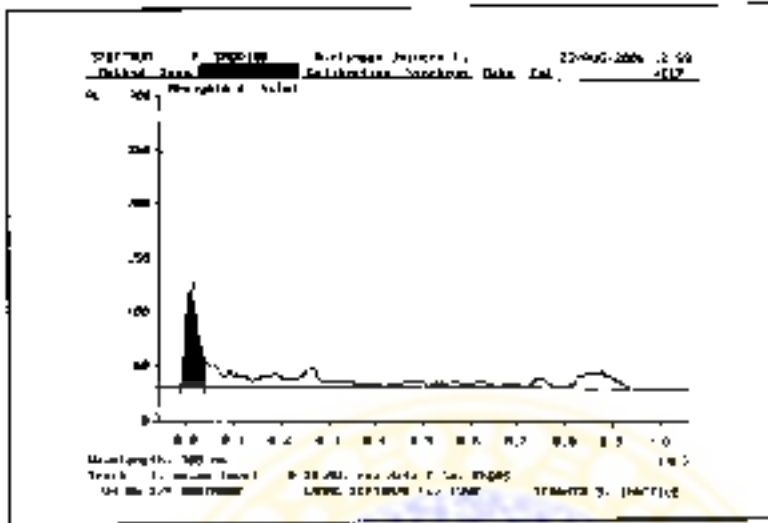
Keterangan : tanda ( - ) menunjukkan bahwa penampak noda tidak menimbulkan perubahan warna.



**Gambar 5.45** Densitogram Ekstrak metanol miselia Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan etil asetat : metanol : air = 7: 2: 1  $\%$  sebagai fase gerak dan silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam. Noda diamati dengan sinar UV pada  $\lambda = 254$  nm



**Gambar 5.46** Spektra noda 3 Ekstrak metanol miselia Jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada  $\lambda = 200-400$  nm,  $\lambda$  maksimum = 310nm, kondisi KLT - lempeng silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam, dan fase gerak etil asetat : metanol : air : 7: 2: 1  $\%$ . Pengamatan dilakukan dengan sinar UV  $\lambda = 254$  nm



**Gambar 5.47** Densitogram ekstrak metanol miselia Jamur endofit (kode Dsp 2) pada Tanaman *Dioscorea sp* dengan Eluen etil asetat : metanol : air = 7: 2: 1  $V/V$  sebagai fase gerak dan silika gel F<sub>254</sub> sebagai fase diam. Noda diamati dengan sinar UV pada  $\lambda = 365$  nm



## PEMBAHASAN

Tanaman *Dioscorea sp* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan salah satu kelompok suku Dioscoreaceae. Pemilihan tanaman untuk penelitian ini dikarenakan *Dioscorea sp* mempunyai kandungan utama diosgenin yang merupakan komponen dalam pembuatan produk-produk hormonal, anti inflamasi, rematik, asma, liver dan obat untuk terapi pengobatan hormon reproduksi wanita. ( Duke, 1997 ) dan juga memiliki kandungan pati tinggi terutama amilopektin, pro-vitamin A, vitamin C, protein, asam amino.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi terhadap tanaman *Dioscorea sp* untuk mendapatkan jamur endofit dan selanjutnya jamur tersebut diteliti profil kandungan senyawanya. Pemanfaatan jamur endofit diharapkan akan dapat memberikan efisiensi waktu dan biaya untuk mendapatkan senyawa bermanfaat dari tanaman *Dioscorea sp*. Bagian tanaman *Dioscorea sp* yang berupa batang, akar dan daun dimana terdapat tulang daun pada awalnya dilakukan sterilisasi permukaan dengan menggunakan larutan pensteril alkohol-klorox- alkohol menggunakan metode Bills. ( Bills, 1996 ). Selanjutnya dilakukan optimasi waktu perendaman dalam alkohol dan klorox ( misalnya 3, 5, 7, dan 10 menit ) serta optimasi konsentrasi alkohol dan klorox yang digunakan ( misalnya 50 %, 60 % dan 70 % ). Pemilihan waktu perendaman dan konsentrasi tersebut berbeda-beda untuk tiap jenis bagian tanaman. Potongan tanaman kemudian ditanam pada sebuah cawan petri yang berisi media *Malt Extract Agar* dan diinkubasi selama dua minggu untuk jaminan sterilitas. Untuk menjamin kondisi aseptis, pada proses penanaman disiapkan petri yang mengandung media steril sebagai kontrol. Jika pada media kontrol tersebut terjadi pertumbuhan, dimungkinkan proses penanaman terkontaminasi. Selain itu, adanya kontaminasi dapat dicegah dengan dilakukan beberapa tahap sterilisasi untuk menjamin bahwa yang diisolasi adalah jamur endofit, yaitu dengan melakukan sterilisasi media, tanaman, maupun dengan pengerjaan secara aseptis. Setelah terbukti steril, tanaman tersebut dipotong-potong menjadi bagian yang lebih kecil untuk memperluas permukaan tanaman dan dipindah ke media baru yang mengandung infus tanaman. Hal tersebut bertujuan

untuk menyesuaikan dengan kondisi pertumbuhan jamur endofit dengan adanya komponen dari tanaman inangnya. Endofit akan mengalami sporulasi ( pembentukan spora ) setelah beberapa minggu dan disimpan pada 15-21°C atau pada suhu kamar ( Bills, 1996 ). Pada penelitian ini, cawan petri berisi daun tanaman yang disterilkan dengan menggunakan alkohol 70% selama 10 menit, larutan NaOCl 60 % selama 60 menit, dan larutan alkohol 70% selama 10 menit setelah diinkubasi selama empat minggu menunjukkan pertumbuhan jamur endofit pada pinggir potongan bagian daun ( gambar 5.1 C ). Bagian akar dan batang tidak menunjukkan pertumbuhan, sehingga perlu dilakukan optimasi kondisi lagi untuk mendapatkan kondisi steril tetapi masih dapat menumbuhkan jamur endofit.

Jamur endofit dari bagian daun tersebut dipisahkan berdasarkan warna dan bentuk koloninya pada media agar miring *Malt Extract Agar* dan *Potato Dextrose Agar*. Proses pemisahan dilakukan hingga didapatkan jamur yang murni berdasarkan pengamatan visual terhadap bentuk dan warna koloni jamur. Jamur endofit yang ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Agar* menunjukkan pertumbuhan yang lebih cepat secara visual dibandingkan pada media *Malt Extract Agar*, sehingga selanjutnya pemisahan dilakukan dengan menggunakan media *Potato Dextrose Agar*. Hasil pemurnian jamur secara visual mendapatkan dua macam warna jamur yang berbeda yaitu koloni berbentuk bunga karang berwarna kecoklatan (gambar 5.2 C, kode Dsp 1) dan kuning gading ( gambar 5.2 D, kode Dsp 2 ).

Penelitian dilanjutkan dengan melakukan identifikasi terhadap isolat jamur endofit ( kode Dsp 2 ) secara makroskopi dan mikroskopi. Pengamatan makroskopi dilakukan dengan menginokulasikan kultur induk jamur ( kode Dsp 2 ) dan ditanam pada 4 macam media yang berbeda, yaitu *Potato Dextrose Agar*, *Malt Extract Agar*, *Sabouraud Dextrose Agar* dan *Czapek-Dox Agar*. Penampakan jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* pada keempat macam media menunjukkan pertumbuhan koloni yang berbeda-beda. Pada media *Potato Dextrose Agar* dan *Sabouraud Dextrose Agar* mengalami pertumbuhan yang relatif lebih cepat dibandingkan kedua macam media yang lain. Hal ini ditunjukkan dengan melihat ukuran miselia jamur pada masing-masing media pertumbuhan. Jamur pada media *Sabouraud Dextrose Agar* mempunyai koloni jamur yang cenderung berwarna kuning terang dan berbentuk seperti bunga karang sepanjang + 7-8 cm setelah berumur 21 hari. Koloni jamur yang ditanam pada media *Czapek-Dox Agar* juga

berbentuk menyerupai bunga karang tetapi lebih tipis dan ukurannya lebih kecil. Pada media *Potato Dextrose Agar*, terlihat koloni yang berbentuk lingkaran sepanjang 8 cm. Koloni juga berbentuk bunga karang dengan warna coklat gelap, kemudian terdapat 3 lapisan mengelilingi koloni yang berwarna kuning, coklat gelap dan coklat muda. Penampakan makroskopis jamur pada media *Malt Extract Agar* tidak menunjukkan perubahan sejak awal ditanam. Hal ini dimungkinkan komposisi media yang tidak sesuai dengan yang dibutuhkan untuk pertumbuhan jamur.

Pengamatan mikroskopi dilakukan dengan menginokulasikan kultur induk jamur ( kode Dsp 2 ) dan ditanam pada empat macam media yang berbeda, yaitu *Potato Dextrose Agar*, *Malt Extract Agar*, *Sabouraud Dextrose Agar* dan *Czapek-Dox Agar*. Didalam cawan petri, diletakkan pipa U yang diisi air steril untuk kebutuhan aerasi jamur. Jamur ( kode Dsp 2 ) mempunyai struktur hifa panjang berserabut dan berwarna coklat dengan spora berupa butiran kecil ketika diamati dengan mikroskop pembesaran 600  $\mu$ m. Namun, identifikasi secara makroskopis dan mikroskopis ini hanya dapat untuk mengetahui koloni dan struktur hifa serta sporanya saja, sehingga perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut untuk dapat mengetahui nama genus dan spesies jamur.

Pengamatan terhadap profil pertumbuhan jamur endofit dilakukan pada hari ke 7, 14, 21, dan 28 dengan menimbang berat kering miselia jamur dari 2 botol kultur jamur. Berdasarkan data pertumbuhan miselia pada tabel V.2, berat kering miselia jamur pada masing-masing hari pengamatan berbeda. Hal ini dikarenakan obyek pengamatan adalah makhluk hidup yang mempunyai variasi yang tinggi walaupun sudah dilakukan persamaan kondisi seperti suhu inkubasi, tempat penyimpanan, serta kemungkinan terjadinya kontaminasi. Hasil pengamatan pertumbuhan jamur digambarkan dengan kurva pertumbuhan antara waktu pengamatan ( hari ) dengan log berat miselia kering (gram) ( gambar 5.6 ). Kurva menunjukkan bahwa hingga hari ke 28, jamur belum memasuki fase stasioner sehingga masih mengalami pertumbuhan.

Kultivasi jamur endofit ( kode Dsp 2 ) tanaman *Dioscorea sp* dilakukan pada media *Potato Dextrose* cair. Pemilihan jamur endofit berwarna kuning gading ( kode Dsp 2 ) dengan alasan karena jamur ini relatif lebih cepat pertumbuhannya secara visual dan tidak mengalami kontaminasi jika dibandingkan dengan koloni jamur yang berwarna kecoklatan ( kode Dsp 1 ). Perama-tama dilakukan peremajaan jamur endofit dengan menginokulasikannya pada media miring *Potato Dextrose Agar* dan

diinkubasi selama 7 hari. Inokulum pada media miring selanjutnya diinokulasikan pada media cair dengan volume 50 ml. Pemindahan inokulum yang masih muda pada media cair *Potato Dextrose* dimaksudkan untuk mempercepat pertumbuhan miselia karena miselia jamur yang berumur 3-7 hari berada pada fase logaritmik sehingga apabila dipindahkan ke media baru yang kaya nutrisi saat fase ini, maka jamur tidak akan melalui fase adaptasi lagi. Inokulum jamur pada media cair *Potato Dextrose* diinkubasi pada suhu kamar selama 28-30 hari dengan dilakukan pengocokan. Pengocokan dilakukan untuk memenuhi kebutuhan aerasi pertumbuhan jamur.

Sebanyak 45 botol kultur jamur endofit dengan volume media masing-masing 50 ml ( total volume media penanaman adalah 2,25 L ) dipanen dengan cara penyaringan vakum dan menghasilkan 3,135 gram miselia kering serta filtrat media sebanyak 1,598 L. Filtrat media diekstraksi dengan etil asetat dengan jumlah  $\frac{1}{2}$  dari jumlah volume mediana. Tujuan penggunaan etil asetat adalah agar mampu menarik senyawa-senyawa polar dan semipolar dari media. Ekstraksi dilakukan dengan menggojok media dan etil asetat dengan *rotary shaker* sebanyak 3 kali selama 1 jam. Fase etil asetat yang diperoleh selanjutnya dipekatkan dengan vakum rotavapour pada suhu 35 °C. Residu media setelah diekstraksi dengan etil asetat dipekatkan hingga didapatkan cairan kental, kemudian cairan kental tersebut ditimbang dan diekstraksi dengan menambahkan metanol 80 % hingga didapatkan ekstrak metanol. Pemilihan pelarut metanol dikarenakan metanol merupakan pelarut polar yang baik untuk mengekstraksi dan melarutkan sebagian besar senyawa-senyawa alam. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali. Selain mengekstraksi bagian media yang mengandung jamur, juga dilakukan ekstraksi terhadap media kosong pertumbuhan jamur sebagai kontrol. Hal ini bertujuan agar dapat diketahui senyawa-senyawa yang berasal dari media pertumbuhan merupakan metabolit dari jamur, bukan kandungan media pertumbuhan. Didapatkan 2 macam ekstrak dari media yaitu ekstrak etil asetat sebanyak 2,648 gram dan ekstrak metanol sebanyak 7,89 gram.

Biomassa ( miselia jamur ) diekstraksi dengan cara merendamnya dalam n-heksan untuk menarik senyawa yang non polar, kemudian diultrasonik selama 15 menit, dikocok dengan *shaker* dan disaring. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali dan kemudian dipekatkan dengan vakum rotavapour suhu 35 °C. Residu selanjutnya diekstraksi dengan menggunakan etil asetat untuk menarik senyawa yang bersifat semipolar pada miselia jamur dengan cara yang sama yaitu perendaman dan

penyaringan. Filtrat kemudian dipisahkan dengan vakum rotavapour 35 °C dan residu diekstraksi dengan metanol 100 % untuk menarik senyawa yang bersifat polar. Didapatkan 3 macam ekstrak yaitu ekstrak n-heksan sebanyak 0,047 gram, ekstrak etil asetat sebanyak 0,07 gram dan ekstrak metanol sebanyak 0,483 gram.

Kelima macam ekstrak yang didapat dari proses ekstraksi yaitu ekstrak etil asetat dan metanol dari media, serta ekstrak n-heksan, etil asetat dan metanol dari miselia, masing-masing dilarutkan pada pelarut masing-masing dan kemudian ditotolkan pada lempeng silika gel F<sub>254</sub>. Sebelum digunakan, lempeng silika hendaknya dipanaskan dahulu dalam oven bersuhu 105 °C selama 1 jam untuk mengaktifkan lempeng silika karena lempeng silika gel bersifat higroskopis yang dapat mengakibatkan silika gel tidak aktif dan kehilangan kemampuannya untuk memisahkan senyawa ( Fried and Sherna, 1994 ). Ekstrak kemudian ditotolkan pada lempeng KLT dan dieluasi dengan fase gerak yang sesuai. Ekstrak etil asetat yang berasal dari miselia dieluasi dengan menggunakan fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol = 4 : 5 : 1  $\frac{1}{v}$  dan untuk ekstrak etil asetat yang berasal dari media dieluasi dengan fase gerak etil asetat : n-heksan = 4 : 1  $\frac{1}{v}$ . Ekstrak metanol yang berasal dari miselia dieluasi dengan menggunakan fase gerak etil asetat : metanol : air = 7 : 2 : 1  $\frac{1}{v}$  dan untuk ekstrak metanol yang berasal dari media dieluasi dengan fase gerak kloroform : metanol : air = 2 : 7 :  $\frac{1}{2}$   $\frac{1}{v}$ . Ekstrak n-heksan dieluasi dengan menggunakan fase gerak etil asetat : metanol = 9 : 1  $\frac{1}{v}$ . Setelah dieluasi, lempeng dipayar dengan menggunakan densitometri. Densitometri merupakan suatu metode analisis kuantitatif yang diperlakukan pada noda-noda pada lempeng KLT dengan suatu instrumen yang mengukur berdasarkan serapan warna, absorpsi terhadap sinar ultraviolet, fluoresensi dan aktivitas radioaktifnya. Densitometri dititikberatkan pada analit-analit yang mempunyai kadar kecil dan perlu dilakukan pemisahan terlebih dahulu dengan KLT. Selanjutnya lempeng disemprot dengan berbagai penampak noda yaitu anisaldehyd asam sulfat, dragendorf, vanillin asam sulfat dan sitrat borat. Penggunaan berbagai macam penampak noda dilakukan karena masih belum diketahui metabolit yang terkandung pada jamur. Keempat macam penampak noda tersebut mewakili kebanyakan metabolit yang terkandung pada jamur. Kecuali penampak noda dragendorf dan sitrat borat, setelah disemprot lempeng dipanaskan dalam oven suhu 100° C selama 10 menit ( Gibbons and Gray, 1998 ). Dari hasil

enyemprotan, diamati terhadap perubahan warna yang terjadi, kemudian dilakukan perhitungan jarak migrasi masing-masing noda yang tampak.

Analisa KLT ekstrak etil asetat miselia menggunakan fase gerak n-Heksan:etil asetat:metanol = 4:5:1 %. Deteksi metabolit dengan penampak noda sinar UV 254 diperoleh tiga noda berwarna ungu ( Rf 0,17; 0,74 dan 0,84 ) sedangkan deteksi metabolit dengan penampak noda sinar UV 365 diperoleh dua noda berwarna hijau kebiruan ( Rf 0,48 dan 0,75 ). Noda pada serapan 200-400 nm menunjukkan senyawa ini mengandung gugus kromofor yang menyerap sinar UV ( Pecsok *et al.*, 1976 ). Deteksi metabolit dengan menggunakan penampak noda anisaldehyd asam sulfat mendapatkan satu noda berwarna kuning ( Rf 0,14 ). Senyawa yang menghasilkan warna ungu dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat menunjukkan senyawa tersebut termasuk golongan steroid, sedangkan warna merah hingga ungu menunjukkan senyawa tersebut merupakan golongan seskuiterpen ( Pulici *et al.*, 1995 ). Selain itu, penampak noda anisaldehyd asam sulfat juga dapat mendeteksi *bitter principles* dengan memberikan warna merah-coklat, kuning-coklat atau hijau gelap ( Wagner and Bladt, 1996 ). Pada hasil diatas, noda berwarna kuning dalam ekstrak etil asetat miselia diduga merupakan senyawa *bitter principles*. Deteksi metabolit dengan penampak noda vanillin asam sulfat menghasilkan noda noda berwarna coklat ( Rf 0,17 ) dan berwarna biru ( Rf 0,71 dan 0,86 ). Senyawa yang menghasilkan warna merah dan biru dengan penampak noda vanillin asam sulfat menunjukkan senyawa tersebut golongan terpenoid ( Gibbons and Gray, 1998 ). Pada hasil diatas kemungkinan ekstrak merupakan golongan terpenoid karena memberikan warna biru. Deteksi metabolit dengan menggunakan penampak noda dragendorf dan sitrat borat menunjukkan hasil yang negatif. Senyawa yang menghasilkan warna kuning dengan penampak noda dragendorf dan sitrat borat menunjukkan bahwa tsenyawa termasuk golongan alkaloid dan flavanoid. Hasil negatif kemungkinan karena dalam ekstrak ini tidak mengandung senyawa golongan alkaloid dan flavanoid.

Pemisahan ekstrak n-heksan menggunakan fase gerak etil asetat : metanol = 9 : 1 %, Deteksi metabolit dengan penampak noda sinar UV 254 diperoleh dua noda berwarna ungu ( 0,57 dan 0,69 ) sedangkan deteksi metabolit dengan penampak noda sinar UV 365 diperoleh satu noda berwarna hijau kebiruan ( Rf 0,53 ). Noda pada serapan 200-400 nm menunjukkan senyawa ini mengandung gugus kromofor yang menyerap sinar UV ( Pecsok *et al.*, 1976 ). Deteksi metabolit dengan menggunakan

penampak noda anisaldehyd asam sulfat mendapatkan dua noda berwarna biru gelap ( Rf 0,59 dan 0,69 ). Senyawa yang menghasilkan warna ungu dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat menunjukkan senyawa tersebut termasuk golongan steroid, sedangkan warna merah hingga ungu menunjukkan senyawa tersebut merupakan golongan seskuiterpen ( Pulici *et al.*, 1995 ). Selain itu, penampak noda anisaldehyd asam sulfat juga dapat mendeteksi *bitter principles* dengan memberikan warna merah-coklat, kuning-coklat atau hijau gelap ( Wagner and Bladt, 1996 ). Pada hasil diatas, noda pada Rf = 0,69 memberikan hasil positif dengan sinar UV 254 dan penampak noda anisaldehyd asam sulfat, sehingga senyawa ini mengandung gugus kromofor yang menyerap sinar UV dan diduga merupakan golongan terpenoid. Deteksi metabolit dengan penampak noda vanillin asam sulfat menghasilkan 2 noda berwarna biru ( Rf 0,44 dan 0,51 ). Senyawa yang menghasilkan warna merah dan biru dengan penampak noda vanillin asam sulfat menunjukkan senyawa tersebut golongan terpenoid ( Gibbons and Gray, 1998 ). Pada hasil diatas kemungkinan ekstrak merupakan golongan terpenoid karena memberikan warna biru. Deteksi metabolit dengan menggunakan penampak noda dragendorf dan sitrat borat menunjukkan hasil yang negatif. Senyawa yang menghasilkan warna kuning dengan penampak noda dragendorf dan sitrat borat menunjukkan bahwa senyawa termasuk golongan alkaloid dan flavanoid. Hasil negatif kemungkinan karena dalam ekstrak ini tidak mengandung senyawa golongan alkaloid dan flavanoid.

Pemisahan ekstrak metanol miselia menggunakan fase gerak etil asetat : metanol : air = 7 : 2 : 1 <sup>1</sup>/<sub>v</sub>. Deteksi metabolit dengan penampak noda sinar UV 254 diperoleh dua noda berwarna ungu ( Rf 0,17 dan 0,72 ). Noda pada serapan 200-400 nm menunjukkan senyawa ini mengandung gugus kromofor yang menyerap sinar UV ( Pecsok *et al.*, 1976 ). Deteksi metabolit dengan menggunakan penampak noda anisaldehyd asam sulfat mendapatkan satu noda berwarna kuning kehijauan ( Rf 0,38 ). Senyawa yang menghasilkan warna ungu dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat menunjukkan senyawa tersebut termasuk golongan steroid, sedangkan warna merah hingga ungu menunjukkan senyawa tersebut merupakan golongan seskuiterpen ( Pulici *et al.*, 1995 ). Selain itu, penampak noda anisaldehyd asam sulfat juga dapat mendeteksi *bitter principles* dengan memberikan warna merah-coklat, kuning-coklat atau hijau gelap ( Wagner and Bladt, 1996 ). Pada hasil diatas, warna kuning kehijauan dalam ekstrak etil asetat miselia diduga merupakan senyawa *bitter*

warna merah dan biru dengan penampak noda vanillin asam sulfat menunjukkan senyawa tersebut golongan terpenoid ( Gibbons and Gray, 1998 ). Pada hasil diatas kemungkinan ekstrak merupakan golongan terpenoid karena memberikan warna biru. Deteksi metabolit dengan menggunakan penampak noda dragendorff dan sitrat borat menunjukkan hasil yang negatif. Senyawa yang menghasilkan warna kuning dengan penampak noda dragendorff dan sitrat borat menunjukkan bahwa tsenyawa termasuk golongan alkaloid dan flavanoid. Hasil negatif kemungkinan karena dalam ekstrak ini tidak mengandung senyawa golongan alkaloid dan flavanoid.

Ekstrak etil asetat media dipisahkan dengan menggunakan fase gerak Etil asetat : n-Heksan = 4 : 1 %. Deteksi metabolit dengan penampak noda sinar UV 254 terlihat 8 puncak noda dengan harga Rf masing-masing 0,05; 0,1; 0,29; 0,3; 0,39; 0,44, 0,74 dan 0,77 Sedangkan etil asetat dari media kontrol juga memberikan noda dengan nilai Rf 0,05; 0,1; 0,3; 0,35; 0,41 dan 0,79. Noda yang sama menunjukkan bahwa metabolit yang terkandung dalam ekstrak merupakan metabolit yang berasal dari media, sehingga yang merupakan metabolit dari ekstrak jamur adalah noda dengan harga Rf 0,29; 0,44; 0,74 dan 0,77. Deteksi metabolit dengan penampak noda sinar UV 365 menunjukkan satu noda berwarna hijau kebiruan ( Rf 0,61 ) dan berbeda dengan noda pada kontrol yaitu sebesar 0,28 sehingga noda yang muncul adalah noda dari metabolit. Perbedaan harga Rf pada ekstrak media dan media kontrol diduga karena senyawa dalam metabolit media yang terkandung dalam ekstrak dari media telah habis dimakan oleh jamur sehingga senyawa tersebut tidak muncul pada ekstrak media. Senyawa yang positif terhadap UV 254 dan 365 menunjukkan jika senyawa tersebut mengandung gugus kromofor. Deteksi metabolit dengan menggunakan penampak noda anisaldehyd asam sulfat mendapatkan satu noda dengan berwarna ungu ( 0,84 ) yang berbeda dengan hasil media kontrol yang menunjukkan 2 noda berwarna kuning ( Rf 0,26 dan 0,71 ). Senyawa yang menghasilkan warna ungu dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat menunjukkan senyawa tersebut termasuk golongan steroid, sedangkan warna merah hingga ungu menunjukkan senyawa tersebut merupakan golongan seskuiterpen ( Pulici *et al.*, 1995 ). Selain itu, penampak noda anisaldehyd asam sulfat juga dapat mendeteksi *bitter principles* dengan memberikan warna merah-coklat, kuning-coklat atau hijau gelap ( Wagner and Bladt, 1996 ). Pada hasil diatas, warna ungu pada ekstrak metabolit jamur diduga merupakan senyawa steroid. Deteksi metabolit dengan



menggunakan penampak noda vanilin asam sulfat menghasilkan dua noda berwarna kuning ( Rf 0,19 dan 0,29 ) serta empat noda berwarna biru ( Rf 0,11; 0,44; 0,65 dan 0,77 ). Keenam noda ini berbeda dengan harga Rf dari media kontrol yaitu sebesar 0,28 dan 0,84 berwarna biru muda dan 0,73 berwarna kuning, sehingga noda yang timbul adalah noda metabolit dari jamur. Senyawa yang menghasilkan warna merah dan biru dengan penampak noda vanillin asam sulfat menunjukkan senyawa tersebut golongan terpenoid ( Gibbons and Gray, 1998 ). Hasil positif yang diberikan pada noda dengan Rf 0,44 dan 0,77 terhadap penampak noda UV 254 dan vanillin asam sulfat menunjukkan bahwa senyawa tersebut mempunyai gugus kromofor dan kemungkinan merupakan golongan terpenoid. Deteksi metabolit dengan menggunakan penampak noda dragendorf dan sitrat borat menunjukkan hasil yang negatif. Senyawa yang menghasilkan warna kuning dengan penampak noda dragendorf dan sitrat borat menunjukkan bahwa senyawa termasuk golongan alkaloid dan flavanoid. Hasil negatif kemungkinan karena dalam ekstrak ini tidak mengandung senyawa golongan alkaloid dan flavanoid. Hasil negatif kemungkinan karena dalam ekstrak ini tidak mengandung senyawa golongan alkaloid dan flavanoid.

Ekstrak metanol media dipisahkan dengan menggunakan fase gerak kloroform : metanol : air = 2 : 7 : 1/4. Deteksi metabolit dengan penampak noda sinar UV 254 terlihat dua noda berwarna ungu ( Rf 0,46 dan 0,55 ). Hasil ini berbeda dengan harga Rf dari ekstrak metanol media kontrol yaitu sebesar 0,80, sehingga noda yang muncul merupakan metabolit dari ekstrak. Deteksi metabolit dengan penampak noda sinar UV 365 menunjukkan satu noda berwarna hijau ( Rf 0,80 ) dan berbeda dengan noda pada kontrol yaitu sebesar 0,32 sehingga noda yang muncul adalah noda dari metabolit. Senyawa yang positif terhadap UV 254 dan 365 menunjukkan jika senyawa tersebut mengandung gugus kromofor. Deteksi metabolit dengan menggunakan penampak noda anisaldehyd asam sulfat mendapatkan satu noda dengan berwarna kuning terang ( Rf 0,56 ) yang berbeda dengan hasil media kontrol yang menunjukkan satu noda berwarna coklat muda ( Rf 0,38 ). Senyawa yang menghasilkan warna ungu dengan penampak noda anisaldehyd asam sulfat menunjukkan senyawa tersebut termasuk golongan steroid, sedangkan warna merah hingga ungu menunjukkan senyawa tersebut merupakan golongan seskuiterpen ( Pulici *et al.*, 1995 ). Selain itu, penampak noda anisaldehyd asam sulfat juga dapat mendeteksi *bitter principles* dengan memberikan warna merah-coklat, kuning-coklat

atau hijau gelap ( Wagner and Bladt, 1996 ). Pada hasil diatas, warna kuning terang pada ekstrak metabolit jamur diduga merupakan senyawa *bitter principles*. Deteksi metabolit dengan menggunakan penampak noda vanilin asam sulfat menghasilkan satu noda berwarna biru ungu ( Rf 0,31 ). Noda ini berbeda dengan harga Rf dari media kontrol yaitu sebesar 0,38 dan berwarna coklat sehingga noda yang timbul adalah noda metabolit dari jamur. Senyawa yang menghasilkan warna merah dan biru dengan penampak noda vanillin asam sulfat menunjukkan senyawa tersebut golongan terpenoid ( Gibbons and Gray, 1998 ). Noda berwarna biru dengan vanillin asam sulfat kemungkinan merupakan senyawa golongan terpenoid. Perbedaan harga Rf pada ekstrak media dan media kontrol diduga karena senyawa dalam metabolit media yang terkandung dalam ekstrak dari media telah habis dimakan oleh jamur sehingga senyawa tersebut tidak muncul pada ekstrak media. Senyawa yang menghasilkan warna kuning dengan penampak noda dragendorff dan sitrat borat menunjukkan bahwa senyawa termasuk golongan alkaloid dan flavanoid. Hasil negatif kemungkinan karena dalam ekstrak ini tidak mengandung senyawa golongan alkaloid dan flavanoid. Hasil negatif kemungkinan karena dalam ekstrak ini tidak mengandung senyawa golongan alkaloid dan flavanoid.

Analisis jamur endofit dengan metode KLT diatas dilakukan dengan menggunakan "*crude extract*" sehingga masih banyak senyawa yang terkumpul dalam satu noda. Masih perlu optimasi kondisi KLT lebih lanjut dan sebelumnya dilakukan fraksinasi sehingga diperoleh pemisahan yang baik. Selain itu, dari berbagai literatur disebutkan bahwa jamur endofit dapat menghasilkan senyawa-senyawa yang bermanfaat sehingga selanjutnya perlu dilakukan uji aktivitas terhadap jamur endofit Dsp 1 dan Dsp 2 dari tanaman *Dioscorea sp.*

## KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1 KESIMPULAN

1. Isolasi terhadap tanaman *Dioscorea sp* menghasilkan dua macam jamur endofit yaitu berbentuk koloni menyerupai bunga karang dengan warna kecoklatan ( kode Dsp 1 ) dan berwarna kuning gading ( kode Dsp 2 )
2. Kondisi optimum isolasi jamur endofit dari tanaman *Dioscorea sp* bagian daun adalah direndam alkohol 70% selama 10 menit, direndam larutan NaOCl 60 % selama 60 menit, direndam larutan alkohol 70% selama 10 menit.
3. Analisis ekstrak n-heksan menggunakan fase gerak etil asetat : metanol = 9 : 1 %. Hasil menunjukkan dua noda dengan penampakan noda sinar UV 254 ( 0,57 dan 0,69 ), satu noda dengan penampakan noda sinar UV 365 ( Rf 0,53 ), dengan penampakan noda anisaldehyd asam sulfat dua noda berwarna biru gelap ( Rf 0,59 dan 0,69 ) dan dua noda berwarna biru ( Rf 0,44 dan 0,51 ). Noda pada Rf = 0,69 memberikan hasil positif dengan sinar UV 254 dan penampakan noda anisaldehyd asam sulfat, sehingga senyawa ini mempunyai gugus kromofor dan kemungkinan merupakan golongan terpenoid.
4. Analisis ekstrak metanol miselia menggunakan fase gerak etil asetat : metanol : air = 7 : 2 : 1 %/v. Hasil menunjukkan dua noda dengan penampakan noda sinar UV 254 ( Rf 0,17 dan 0,72 ), satu noda berwarna kuning kehijauan dengan penampakan noda anisaldehyd asam sulfat ( Rf 0,38 ), satu noda berwarna biru dengan penampakan noda vanillin asam sulfat ( Rf 0,93 ), sehingga kemungkinan ekstrak merupakan golongan terpenoid.
5. Analisis ekstrak etil asetat media dengan fase gerak etil asetat : n-heksan = 4 : 1 %, Hasil menunjukkan 4 noda metabolit dari ekstrak ( Rf 0,29; 0,44; 0,74 dan 0,77 ) dengan penampakan noda sinar UV 254, satu noda dengan penampakan noda sinar UV 365 berwarna hijau kebiruan ( Rf 0,61 ), satu noda berwarna ungu ( 0,84 ) dengan penampakan noda anisaldehyd asam sulfat, sehingga kemungkinan senyawa metabolit ekstrak ini merupakan golongan steroid. Deteksi metabolit dengan penampakan noda vanillin asam sulfat menghasilkan dua noda berwarna kuning ( Rf 0,19 dan 0,29 ) serta empat noda berwarna biru ( Rf 0,11; 0,44; 0,65 dan 0,77 ). Hasil positif yang diberikan pada noda dengan

Rf 0,44 dan 0,77 terhadap penampakan UV 254 dan 365 dan vanillin asam sulfat menunjukkan bahwa senyawa tersebut mempunyai gugus kromofor dan kemungkinan merupakan golongan terpenoid

6. Analisis ekstrak metanol media Hasil menunjukkan dua noda dengan penampakan noda sinar UV 254 ( Rf 0,46 dan 0,55 ), satu noda dengan penampakan noda sinar UV 365 ( Rf 0,80 ) satu noda berwarna kuning terang dengan penampakan noda anisaldehyd asam sulfat ( Rf 0,56 ) dan satu noda berwarna biru ungu ( Rf 0,31 ) dengan penampakan noda vanillin asam sulfat menghasilkan Noda berwarna biru dengan vanillin asam sulfat kemungkinan merupakan senyawa golongan terpenoid
7. Analisis ekstrak etil asetat miscela menggunakan fase gerak n-Heksan:etil asetat:metanol = 4:5:1 ), Hasil menunjukkan tiga noda dengan penampakan noda sinar UV 254 ( Rf 0,17; 0,74 dan 0,84 ), dua noda berwarna hijau kebiruan dengan penampakan noda sinar UV 365 diperoleh ( Rf 0,48 dan 0,75 ), satu noda berwarna kuning dengan penampakan noda anisaldehyd asam sulfat ( Rf 0,14 ) dan dengan penampakan noda vanillin asam sulfat menghasilkan noda noda berwarna coklat ( Rf 0,17 ) dan berwarna biru ( Rf 0,71 dan 0,86 ), sehingga kemungkinan ekstrak merupakan golongan terpenoid.
8. Deteksi metabolit semua ekstrak dengan menggunakan penampakan noda dragendorf dan sirat borat menunjukkan hasil yang negatif. Hasil negatif kemungkinan karena dalam ekstrak ini tidak mengandung senyawa golongan alkaloid dan flavanoid.

## 7.2 Saran

1. Melakukan optimasi cara isolasi jamur endofit bagian batang dan akar tanaman *Dioscorea sp*.
2. Melakukan identifikasi lebih lanjut jamur endofit yang telah diisolasi ( Dsp 1 dan Dsp 2 )
3. Melakukan proses fraksinasi bertingkat terhadap masing-masing ekstrak untuk mendapatkan pemisahan noda yang optimal pada hasil KLT-Densitometri
4. Melakukan uji aktifitas dari masing-masing ekstrak dan membandingkan profil senyawa yang terkandung dalam jamur endofit dengan tanaman inangnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2004. *Culture Media for Fungi*, 16-07-05.  
<http://www.classes.plantpath.wsu.edu/plp521/Word%20documents/421media.doc>.
- Anonim, 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Ditjen POM dan Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, hal 9-12
- Anonim, 1995. *Farmakope Indonesia edisi ke empat*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia., Jakarta : hal 7-9.
- Alexopoulos, C.I., 1962. *Introductory Mycology*, 2<sup>nd</sup> Ed., New York: John Wiley and Sons, p.143-49.
- Alexopoulos, C.I.C.W.Mims. and M. Blackwell.1996. *Introductory Mycology* (4<sup>th</sup> Ed. ). John Wiley and Sons, New York, USA.868p
- Bacon, C. 1991. Isolation, Culture and Maintenance of Endophytic Fungi and grasses. *In Hand Book of Mycology* (D.K. Aurora, D. Rai, K.G. Mukeri dan G.R. Knudsen, Vol.1).Athens, Georgia
- Bills, G.F. 1993. Isolation and Analysis of endophytic Fungal Communities from woody plants. pp. 31-65. In: Systematics, Ecology and Evolution of *Endophytic Fungi* in Grasses and Woody Plants. S. Redlin and L.M.Carris, eds. APS Press, St. Paul, MN. ( in press)
- Carrol, C.G. 1988 Fungal Endophytes in Stems and Leaves From Latent Pathogens to Mutualistic Symbiont. *Ecology*, 69:2-9.
- Clay, K. 1988. Fungal Endophytes of Grasses : A Defensive Mutualism Between Plants and Fungi. *Ecology*, 69 (1):10-16.
- Crueger, W. and Crueger, A.,1982. *Biotechnology : A Textbook of Industrial Microbiology*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., p.5-6
- Dreyfuss, M. and O. Petrini., 1984. *Further investigations on the occurrence distribution of endophytic fungi in tropical plants*. *Botanica Helvetica* 94: 33-40
- Duke, JA. 1997. *The Green Pharmacy*. St. Martin's Press: New York 1997p.111. 209-210,352
- Faeth, S.H., 2002. *Are Endophytic Fungi Defensive Plant Mutualists?* : *Oikos* vol 98. p.25-36

- Fried. B and Sherma, J., 1994. *Thin Layer Chromatography Techniques and Application*, Third edition. New York: Marcell Dekker, Inc., p.51-178
- Gibbins, S and Gray, A.I., 1998. Methods in Biotechnology. *Natural Products Isolation*. Humana Press Inc., Totawa, NS. Vol 4.
- Hanson, C., 1971. *Recent Advances in Liquid-Liquid Extraction*. 1<sup>st</sup> edition. University of Bradford, UK. Pergamon Press. P 1-4.
- Helfman, E., 1975. *Chromatography*. Third edition. Van Nostrand Rein Company. New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne.
- Lepp, H., 2005. *Classification & identification*, 14-02-2006, [http://www.anbg.gov.au/Jungi\\_classification\\_identification.html](http://www.anbg.gov.au/Jungi_classification_identification.html)
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., 2000. *Biology of Microorganisms*. Upper Saddle River, New Jersey :prentice-Hall, Inc., p. 729-732
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S., 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi 1 ( Terjemahan )*. Jakarta: Universitas Indonesia Press, hal 189-215
- Petrini, O., T.N Sieber, L. Toti dan O. Virel., 1992. Ecology Metabolite Production and Substrate Utilization in Endophytic Fungi. *Natural Toxins* 1:185-196.
- Pulici, M., F. Sugawara, H. Koshino, Uzawa, and S. Yoshida., 1996. A new Isodreminol from *Pestalotiopsis* sp. *Journal of Natural Product.*, Vol. 59, p. 47-48
- Rao, S.N.S. 1994. *Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*. Edisi kedua. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Keynolds, J., 2005. *Identification of Fungi*, 14-02-2006, [http://www.rlc.dcccd.edumath/Scireynolds/MICROLab\\_mannulfungi\\_id.html](http://www.rlc.dcccd.edumath/Scireynolds/MICROLab_mannulfungi_id.html)
- Rubatzky, Vincent E. 1998. *Sayuran Dunia: Prinsip, Produksi dan Gizi*. Edisi ke-1/ Vincent E Rubatzky., Mas Yamaguchi, Penerbit ITB. Bandung.
- Stahl, F., 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Penerbit ITB Bandung.
- Strobel, G.A., W.M. Hess, E. Ford, R.S. Sidhu, and X. Taxol from Fungal Endophytes and The Issue of Biodiversity. *Journal of Industrial Microbiology*. 17:417-425
- Stukkonen, K., 2001. *Endophytic Fungi in Natural Manmade Plant Communities*, Department of Biology, University of Turku, 16-07-2005, <http://fibrc.utu.fi/proj/index.htm>

- Stierle, A and Strobel, G., 1995. The Search for a Taxol Producing Microorganism among The Endophytic Fungi of The Pacific Yew, *Taxus brevifolia*. *Journal of Industrial Microbiology*. Hal 1317-1318
- Van Steenis, C.G.G.J., *Flora untuk Sekolah di Indonesia*. Pradya Paramita, hal 160-161
- Wagner, H. And Bladt S., 1996. **Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas**, 2<sup>nd</sup> Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, hal 351-352



Lampiran I

LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA  
(Indonesian Institute of Sciences)  
**UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN KEBUN RAYA PURWODADI**  
(Purwodadi Botanic Garden)  
Jl. Raya Surabaya - Malang Km. 65, Purwodadi - Pasuruan 67163  
Telpom : 0341 - 434046 Fax : 0341 - 428046  
e-mail : klt@ipqi.iaind.ac.id

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI**  
No. SKI/APH.UPT.001/10/2006

Kepala Kebun Raya Purwodadi dengan ini menerangkan bahwa materi  
tersebut yang dibawa oleh :

**YUANITA ANGGRAINI NIM. 050210133E**

Mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya di Surabaya datang  
di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 19  
September 2006, berdasarkan buku Flora of Java, karangan G. A. Beckler Vol. III  
(1908), halaman 155, nama ilmiahnya adalah:

Marga : *Dioscorea*  
Jenis : *Dioscorea sp.*

Adapun menurut buku The Standard Cyclopaedia of Horticulture, karangan L.H.  
Bailey jilid I (1953) halaman 2, klasifikasinya adalah sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta  
Sub-Divisi : Angiospermae  
Kelas : Monocotyledonae  
Ordo / Bangsa : Liliaceae  
Family / Suku : Dioscoreaceae

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan  
sebagaimana mestinya

Purwodadi, 3 Oktober 2006

An Kepala

UPT Balai Konservasi Tumbuhan  
Kebun Raya Purwodadi  
Koordinator Unit Jasa dan Informasi



**WARDAYA**  
NIP. 320903343



**Lampiran 2****Komposisi media****Media Malt Extract Agar**

Komposisi :

Malt extract	15,0 g
Agar	15,0 g
Air suling hingga	1,0 liter

(Van Rij, 1984)

**Media Sabouraud Dextrose Agar**

Komposisi :

Sabouraud Dextrose Agar	15,0 g
Air suling hingga	250 ml

**Media Czapek-Dox Agar**

Komposisi :

Fe sulfat	0,01 gram
Mg sulfat	0,5 gram
Na Cl	0,5 gram
Fosfat dipotasium	1,0 gram
sodium nitrat	3,0 gram
sukrosa	30,0 gram
Air suling hingga	1,0 liter

**Media Potato Dextrose Agar**

Komposisi :

Kentang	30 g
Agar AA	20 g
Dextrose	20 g
Air suling hingga	1 liter

**Komposisi penampak noda**

**Anisaldehyd-asam sulfat**

Komposisi : 1 mL  $H_2SO_4$  pekat ditambahkan pada larutan 0.5 ml. anisaldehyd dalam 50 mL asam asetat.

**Vanilin-asam sulfat**

Komposisi : 3 g vanilin dilarutkan dalam 100 mL etanol dengan penambahan 0,5 mL  $H_2SO_4$  pekat.

**Dragendorf**

Komposisi : 0,85 g bismuth nitrat basa dilarutkan dalam 40 ml. air dan 10 ml. asam asetat glasial, kemudian ditambahkan larutan 8 g potassium iodide dalam 20 mL air.

( Gibbons and Gray, 1998

