

LAPORAN  
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL  
TAHUN ANGGARAN 2009



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

PRODUKSI SENYAWA ANTIMIKROBA DARI KULTUR KALUS  
*Dumortiera hirsuta*: UPAYA PENANGANAN PENYAKIT INFEKSI

Tim Peneliti :

Junairiah, S.Si., M.Kes.  
Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si  
Dr. Ni'matuzahroh  
Fatimah, S.Si., M. Kes

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009, sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional Nomor: 276/H3/KR/2009, Tanggal 16 Februari 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA  
OKTOBER 2009



LAPORAN  
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL  
TAHUN ANGGARAN 2009

klc  
klcC  
LP. 39/10  
Pro



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

PRODUKSI SENYAWA ANTIMIKROBA DARI KULTUR KALUS  
*Dumortiera hirsuta*: UPAYA PENANGANAN PENYAKIT INFEKSI

Tim Peneliti :

Junairiah, S.Si., M.Kes.  
Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si  
Dr. Ni'matuzahroh  
Fatimah, S.Si., M. Kes

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2009, sesuai dengan Surat  
Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional  
Nomor: 276/H3/KR/2009, Tanggal 16 Pebruari 2009

UNIVERSITAS AIRLANGGA  
OKTOBER 2009

LAPORAN  
HIBAH PENELITIAN STRATEGIS NASIONAL  
TAHUN ANGGARAN 2008



STABARA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
PONTIANAK  
KALIMANTAN  
61111

PRODUKSI SENYAWA AKTIFIKORBA DARI KULTUR KALUS  
Dumotora hantua: URAYA SEMANGAMBAI LEMYANTIMPERESI

Tim Peneliti :

Junaidah, S.Si., M.Kes.  
Dr. Hanik Siti Aminah, M.Si  
Dr. Himpudastich  
Fahman, S.Si., M.Kes

Nomor 237/HK/2008, Tanggal 16 Februari 2008  
Kontak: Penerima Universitas Airlangga Penelitian Strategis Nasional  
Dinayati oleh DIPA Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2008, sesuai dengan Surat

UNIVERSITAS AIRLANGGA  
OKTOBER 2008

## HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : PRODUKSI SENYAWA ANTIMIKROBA DARI KULTUR  
KALUS *Dumortiera hirsuta*: UPAYA PENANGANAN  
PENYAKIT INFEKSI

2. Ketua Peneliti :

a. Nama Lengkap : Junairiah, S.Si., M.Kes  
b. Jenis Kelamin : Perempuan  
c. NIP : 132300270  
d. Pangkat/Golongan : Penata Muda Tk I/ III b  
e. Jabatan : Asisten Ahli  
f. Bidang Keahlian : Botani  
g. Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/ Biologi  
h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

No	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Dr. Nanik Siti Aminah, M.Si	Kimia Bahan Alam	Fakultas Sains dan Teknologi, UNAIR/Kimia	Universitas Airlangga
2.	Dr. Ni'matuzahroh	Mikrobiologi	Fakultas Sains dan Teknologi, UNAIR/Biologi	Universitas Airlangga
3.	Fatimah, S.Si., M. Kes	Mikrobiologi	Fakultas Sains dan Teknologi, UNAIR/Biologi	Universitas Airlangga

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 1 tahun  
b. Biaya total yang diusulkan : Rp. 100.000.000,-  
c. Biaya yang disetujui : Rp. 100.000.000,-

Mengetahui

Dekan Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Airlangga

Drs Salamun, M.Kes  
NIP. 131696506

Surabaya, Oktober 2009  
Ketua Peneliti

Junairiah, S.Si., M.Kes  
NIP. 132300270

Menyetujui

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat

Prof. Dr Bambang Sektiari Lukiwanto., DEA., drh  
NIP. 131837004



HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : PRODUKSI BENYAWA ANTIBIOTIK DARI KULTUR

KALUS Diomochora Insula UPRYA PENANGKAMAN

PENYAKIT INFESI

2. Ketua Peneliti :

- a. Nama Lengkap : Junaidi, S. Si, M. Kes
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. NIP : 193200270
- d. Pangkat/Golongan : Pangkat Muda I/II b
- e. Jabatan : Asisten Ahli
- f. Bidang Keahlian : Botani
- g. Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi Biologi
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Anshada

3. Tim Peneliti

No	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/Jurusan	Perguruan Tinggi
1	Dr. Nolik Sia Anindia, M. Si	Kiara Bahari Alam	Fakultas Sains dan Teknologi UNIAKRONIA	Universitas Anshada
2	Dr. Nurmaestika	Microbiologi	Fakultas Sains dan Teknologi UNIAKRONIA	Universitas Anshada
3	Junaidi, S. Si, M. Kes	Mikrobiologi	Fakultas Sains dan Teknologi UNIAKRONIA	Universitas Anshada

- a. Biaya yang diterima
- b. Biaya total yang dikeluarkan
- c. Jangka waktu penelitian yang direncanakan
- d. Pemasukan dan jangka waktu penelitian

Rp. 100.000.000,-  
Rp. 100.000.000,-  
1 tahun

Menghasilkan  
Kerus Penelitian  
Shuhsya, Offset 2009

Universitas Anshada  
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

Junaidi, S. Si, M. Kes  
NIP 193200270

Dr. Saiful M. Kes  
NIP 193200270

Menyetujui  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat

Prof. Dr. Bambang Saiful Lubis, M. Kes  
NIP 193200270

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah Subhanahu wa Ta'ala atas segala ijinnya, kami dapat melaksanakan penelitian dan menyusun laporan yang berjudul *Produksi Senyawa Antimikroba Dari Kultur Kalus *Dumortiera hirsuta*: Upaya Penanganan Penyakit infeksi*. Pada kesempatan ini kami mengucapkan terima kasih yang tulus kepada:

1. Prof. Dr. Bambang Sektiari Lukiswanto, DEA, drh sebagai ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk melaksanakan penelitian.
2. DIPA/APBN Tahun Anggaran 2009 yang telah memberikan dana kepada kami untuk melaksanakan penelitian dan menyusun laporan penelitian
3. Drs. Salamun., M.Kes sebagai Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga
4. Dr. Alfiah Hayati sebagai Ketua Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga
5. Dr. Y. Sri Wulan Manuhara, MSi sebagai Penanggung Jawab Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga
6. Fatimah, S.Si., M.Kes sebagai Penanggung Jawab Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga
7. Drs Jusuf Syah, MS sebagai Ketua Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga
8. Berbagai pihak yang tidak bisa kami sebutkan satu persatu, atas kerja samanya kami sampaikan terima kasih

Tim Peneliti

## **RINGKASAN**

### **PRODUKSI SENYAWA ANTIMIKROBA DARI KULTUR KALUS *Dumortiera hirsuta*:**

#### **UPAYA PENANGANAN PENYAKIT INFEKSI**

**(Junairiah, Nanik Siti Aminah, Ni'matuzahroh, Fatimah)**

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab permasalahan 1) Metode sterilisasi manakah yang dapat menghasilkan eksplan steril dan segar? 2) Formulasi media manakah yang dapat menginduksi terbentuknya kalus ? 3) Jenis elisitor manakah yang dapat memacu terbentuknya senyawa antimikroba? 4) Jenis golongan senyawa antimikroba apa saja yang terdapat dalam kalus lumut hati *Dumortiera hirsuta* ? 5) Bagaimanakah aktivitas antimikroba ekstrak kalus lumut hati *Dumortiera hirsuta* dari berbagai metode elisitasi ?

Tujuan penelitian ini adalah 1) mengetahui metode sterilisasi yang sesuai untuk mendapatkan eksplan steril, 2) mengetahui formulasi media yang sesuai untuk induksi dan perbanyakan kalus, 3) mengetahui jenis elisitor yang dapat memacu terbentuknya senyawa antimikroba, 4) Mengetahui golongan senyawa antimikroba yang terdapat dalam kalus *Dumortiera hirsuta*, 5) Mengetahui aktivitas antimikroba ekstrak kalus *Dumortiera hirsuta* berbagai metode elisitasi terhadap mikroba patogen

Pembuatan media MS dilakukan dengan menimbang unsur-unsur makronutrien, mioinositol dan sukrosa dengan menggunakan timbangan analitik. Unsur makronutrien yang telah ditimbang dilarutkan dalam aquadest 300 ml dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Selanjutnya memasukkan larutan stok besi, mikronutrien, vitamin, hormon 2,4 D, mioinositol dan sukrosa ke dalam labu Erlenmeyer satu per satu sampai larut. Aquadest dituangkan sampai kurang lebih 900 ml. pH diukur dengan kertas pH. Bila pH terlalu asam, maka ditambahkan KOH, tetapi bila terlalu basa ditambahkan HCl. Selanjutnya ditambahkan aquadest sampai volume mencapai 1000 ml.

Bahan pematat yang telah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam larutan media dan dipanaskan di atas kompor gas sampai seluruh bahan larut. Larutan dituang ke dalam botol



steril, ditutup menggunakan aluminium foil atau sumbat karet dan diberi label. Botol-botol yang telah berisi media disterilisasi menggunakan autoclave pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya botol disimpan pada ruang inkubasi dengan suhu kamar. Medium perlakuan untuk induksi dan perbanyakkan kalus adalah sebagai berikut medium MS dengan perlakuan zat pengatur tumbuh 2,4 D masing-masing dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/L 2,4 D. Medium untuk pemacuan pembentukan bahan aktif terdiri atas: Medium Medium elisitasi biotik (MS + elisitor ekstrak yeast), Medium elisitasi abiotik (MS + elisitor KNO<sub>3</sub>), Medium elisitasi (MS + elisitor ekstrak yeast dan KNO<sub>3</sub>).

Penanaman eksplan dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Sebelum digunakan, LAF disterilkan terlebih dahulu dengan cara membersihkan seluruh permukaannya menggunakan tisu yang telah dibasahi dengan alcohol 70 %. Kemudian lampu ultraviolet (UV) dinyalakan selama kurang lebih 30 menit. Seluruh bahan dan alat yang akan digunakan dalam penanaman eksplan selanjutnya dimasukkan ke LAF. Peralatan dan bahan tersebut terdiri atas pinset, scalpel beserta mata pisau steril, cawan Petri steril, botol kultur, Erlenmeyer berisi aquades steril, botol berisi alcohol 70 %, lampu Bunsen, *sodium hipoklorit*, tween 80, gelas ukur dan eksplan. Sebelum dimasukkan dalam LAF, peralatan disemprot terlebih dahulu dengan alcohol 70 %.

Sebelum ditanam, eksplan harus disterilisasi dahulu dengan berbagai metode sterilisasi. Kemudian talus dipotong ukuran 1x1 cm diatas cawan petri steril menggunakan pinset steril dan gunting steril. Masing-masing potongan eksplan yang telah steril ditanam dalam botol kultur berisi media dengan kombinasi konsentrasi hormon tertentu. Setiap botol terdiri atas 5 potong eksplan dan diletakkan dalam ruang inkubasi gelap bersuhu 23±2°C. Kalus pada medium induksi dipelihara selama 4 minggu, selanjutnya disubkultur pada medium elisitasi selama 3 minggu. Kalus yang dihasilkan pada medium elisitasi diekstrak

Kalus Lumut dikeringkan dan dibuat dalam bentuk serbuk selanjutnya diekstrak dengan cara maserasi. Kalus dari masing-masing metode elisitasi diekstrak dengan menggunakan pelarut heksan dengan cara maserasi dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum*

*evaporator*. Masing-masing kandungan kimia ekstrak dimonitor dengan KLT menggunakan fase diam gel GF 254 dan fase gerak heksan : kloroform = 1:1, serta heksan: etil asetat = 8 : 1, diamati dibawah sinar uv dengan  $\lambda$  254 nm dan 366 nm, serta disemprot dengan pereaksi Liebermann Burchard.

Untuk mengetahui aktivitas antimikroba tumbuhan lumut digunakan metode cakram kertas. Media yang digunakan dalam uji ini adalah MHA steril. Suspensi mikroba dibuat sesuai dengan standar 0,5 Mc Farland yaitu dengan menentukan kekeruhan suspensi mikroba pada OD 0,1 pada  $\lambda_{625}$  nm untuk bakteri dan OD 0,1 pada  $\lambda_{600}$  nm untuk fungi. Sebanyak 1 ml suspensi mikroba uji dimasukkan kedalam cawan petri steril, kemudian ditambahkan 15 ml media MHA ke dalam cawan tersebut untuk dihomogenkan. Agar dibiarkan dingin dan memadat. Sebanyak 3 buah cakram kertas steril diletakkan di permukaan agar dengan jarak yang berjauhan dan sama. Pada kertas cakram diinjeksikan 20  $\mu$ L ekstrak kalus tumbuhan lumut, masing-masing dengan konsentrasi 80.000 ppm. Untuk uji difusi lanjut dengan konsentrasi 2500 ppm; 5000 ppm; 10000 ppm; 20000 ppm; 40000 ppm; 60000 ppm. Penghambatan pertumbuhan ditunjukkan dengan terbentuknya daerah hambatan (*Halo*) jernih di sekitar kertas cakram. Diameter daerah penghambatan diukur dengan jangka sorong (LC = 0,05 mm).

Terlebih dahulu menyiapkan bejana pengembang dengan tutupnya. Lalu memasukkan fase gerak berupa heksan: kloroform = 1:1 dan heksan: etil asetat = 8:2. Selanjutnya bejana pengembang ditutup agar proses penjenuhan bisa homogen dan cepat. Untuk pembuatan kromatogram, silika gel dipotong lalu diberi tanda batas atas dan batas bawah. Masing-masing ekstrak ditotolkan pada silika gel dan ditunggu sampai kering. Silika gel dimasukkan pada bejana pengembang, ditutup an ditunggu hingga fase gerak mencapai batas atas. Silika gel dikeluarkan dan dikeringkan. Hasil keomatogram difoto. Selanjutnya menentukan harga Rf dari noda-noda yang tampak pada kromatogram. Identifikasi golongan senyawa bioaktif dilakukan dengan metode KLT menggunakan pereaksi semprot Liebermann Burchard.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa : 1) Metode sterilisasi untuk mendapatkan eksplan steril adalah dengan menggunakan sublimat dan sodium hipoklorit dengan konsentrasi rendah, 2) Formulasi media yang sesuai untuk induksi dan perbanyakan kalus adalah medium MS dengan zat pengatur tumbuh 2,4 D 1 mg/l, 3) ketiga jenis elisitor yaitu abiotik, biotik, abiotik dan biotik dapat memacu terbentuknya senyawa aktif antimikroba, 4) golongan senyawa aktif antimikroba yang terdapat dalam kalus lumut hati *Dumortiera hirsuta* adalah steroid (ekstrak A dan B) serta terpenoid (ekstrak C), 5) Ekstrak kalus lumut hati *Dumortiera hirsuta* dari berbagai metode elisitasi mempunyai aktivitas antimikroba yang berbeda-beda tergantung pada jenis mikroba yang diujikan.

## DAFTAR ISI

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....	i
KATA PENGANTAR .....	ii
RINGKASAN .....	iii
DAFTAR ISI .....	iv
DAFTAR TABEL .....	v
DAFTAR GAMBAR .....	vi
DAFTAR LAMPIRAN .....	vii
I.    PENDAHULUAN.....	1
II.   TINJAUAN PUSTAKA .....	3
III.  TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	9
IV.  BAHAN DAN METODE .....	10
V.   HASIL DAN PEMBAHASAN .....	20
VI.  KESIMPULAN DAN SARAN .....	44
DAFTAR PUSTAKA .....	45

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Persentase Eksplan Steril Dari Berbagai Metode Sterilisasi.....	20
Tabel 2. Waktu Induksi Kalus .....	24
Tabel 3. Persentase Eksplan Membentuk Kalus .....	27
Tabel 4. Bobot Kalus .....	28
Tabel 5. Hasil Ekstraksi Serbuk Kalus dari Berbagai Metode Elisitasi .....	33
Tabel 6. Nilai Rf Ekstrak dari Berbagai Metode Elisitasi dan Berbagai Eluen .....	34
Tabel 7. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Kalus <i>Dumortiera hirsuta</i> dari Berbagai Metode Elisitasi .....	36
Tabel 8. Diameter Daerah Penghambatan Pertumbuhan Mikroba oleh Ketiga Jenis Ekstrak dengan Berbagai Metode Elisitasi .....	37
Tabel 9. Tipe Penghambatan Mikroba Ketiga Jenis Ekstrak Dengan Berbagai Metode Elisitasi .....	38
Tabel 10. Diameter Penghambatan Mikroba Ekstrak C .....	38
Tabel 11. Tipe Penghambatan Mikroba oleh Ekstrak C .....	39

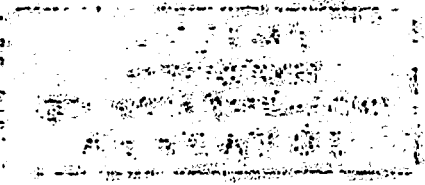
## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Diagram batang hubungan antara metode sterilisasi dengan eksplan steril .....	21
Gambar 2. Eksplan mengalami bleaching dan terkontaminasi oleh fungi .....	23
Gambar 3. Eksplan mengalami bleaching.....	23
Gambar 4. Diagram batang hubungan antara medium perlakuan dengan waktu induksi kalus .....	24
Gambar 5. Eksplan talus lumut <i>Dumortiera hirsuta</i> berukuran kecil .....	26
Gambar 6. Eksplan talus lumut <i>Dumortiera hirsuta</i> saat dikubasi di tempat terang .....	27
Gambar 7. Diagram batang yang menunjukkan hubungan antara medium perlakuan dengan persenyawaan eksplan membentuk kalus .....	27
Gambar 8. Diagram batang yang menunjukkan hubungan antara medium perlakuan dengan bobot kalus .....	28
Gambar 9. Induksi kalus pada medium $\frac{1}{2}$ MS pada umur 4 minggu setelah tanam.....	29
Gambar 10. Kalus mengalami pencoklatan .....	29
Gambar 11. Elisitasi dengan elisitor abiotik, biotik serta abiotik dan biotik .....	32
Gambar 12. Hasil kromatografi ekstrak dari berbagai metode elisitasi dengan fasa gerak heksan: kloroform 1:1 .....	35
Gambar 13. Hasil kromatografi ekstrak dari berbagai metode elisitasi dengan fasa gerak heksan: etil asetat 8:2 .....	25
Gambar 14. Diagram batang penghambatan mikroba oleh ketiga jenis ekstrak dengan berbagai metode elisitasi .....	37
Gambar 15. Diagram batang penghambatan mikroba oleh ekstrak C pada berbagai Konsentrasi .....	38
Gambar 16. Mikroba uji .....	39

## DAFTAR LAMPIRAN

1. Hasil Penelitian .....	49
---------------------------	----





## BAB I. PENDAHULUAN

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

### 1.1. Latar Belakang Permasalahan

Akhir-akhir ini terjadi kondisi yang mengkhawatirkan karena meningkatnya penyakit infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme yang resisten terhadap antibiotik. Dengan berkembangnya populasi mikroba yang resisten terhadap antibiotik, menyebabkan zat antimikroba semakin berspektrum sempit sehingga hanya efektif untuk jenis patogen tertentu. (Salvat *et al.*, 2004 dan Bonjar *et al.*, 2004). Selain itu, pada penyembuhan infeksi dengan antibiotik menyebabkan munculnya efek samping pada inang yang meliputi hipersensitivitas, reaksi alergi dan gangguan sistem imun (Schinor *et al.*, 2007).

Saat ini masyarakat ingin kembali menggunakan bahan dari alam (*back to nature*) (Salvat *et al.*, 2004 dan Sukardiman dkk., 2004). Hal tersebut menyebabkan permintaan terhadap bahan-bahan antimikroba alami mengalami kenaikan yang pesat (Basile *et al.*, 1998). Penelitian tentang ekstrak berbagai macam tumbuhan telah banyak dilakukan di negara-negara seperti Cina, India, Jepang dan Eropa untuk menyeleksi aktivitas antimikroba dan menemukan bahan antimikroba baru (Abu Shahab *et al.*, 2004).

Salah satu tumbuhan yang banyak terdapat di Indonesia dan mempunyai aktivitas antimikroba adalah Bryophyta (tumbuhan lumut). Berdasarkan hasil penelusuran pustaka, di Indonesia belum banyak penelitian yang mengungkap tentang potensi tumbuhan lumut sebagai antimikroba. Ekstrak tumbuhan lumut mengandung bahan aktif isoflavonoid, flavonoid, biflavonoid dan terpenoid yang telah dilaporkan mempunyai aktivitas antimikroba (Saritas *et al.*, 2001; Xiao Jian Bo, 2006) Lumut hati merupakan salah satu kelas dari divisi tumbuhan lumut yang memiliki beberapa kandungan bahan aktif yang berpotensi sebagai antimikroba. Flavonoid yang diisolasi dari ekstrak *Marchantia convoluta* mempunyai kemampuan menghambat *Staphylococcus aureus*, *Bacillus enteridis*, *Streptococcus hemolitic type B* dan *Diplococcus pneumoniae* (Xiao Jian Bo, 2006). Lumut hati *Pallavicinia lyelli* mengandung senyawa antifungi steroid yang dapat menghambat pertumbuhan fungi *Aspergillus fumigatus* (Subhisa dan Subramoniam, 2005). *Astellia angusta* mengandung senyawa antifungi *dibenzofuran bis (bibenzil)*, senyawa yang sama juga ditemukan pada lumut hati *Lepidozia incuruata* dari Jerman (Scher *et al.*, 2003 dan Qu *et al.*, 2006).

*Dumortiera hirsuta* adalah salah satu tumbuhan lumut hati yang tumbuh di hutan Cagar Batu. Lumut hati ini umumnya hanya tumbuh di hutan, dan pertumbuhannya membutuhkan persyaratan khusus diantaranya adalah tempat yang mempunyai kelembaban tinggi dan terlindung dari sinar matahari serta dipengaruhi oleh musim. Jika musim hujan ketersediaan lumut hati melimpah sedangkan pada musim kemarau terbatas atau sedikit sekali. Lumut hati *Dumortiera hirsuta* berpotensi sebagai penghasil antimikroba. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekstrak kasar *Dumortiera hirsuta* dalam aseton dan metanol air memiliki aktivitas penghambatan sebagai antibakteri dan antifungi (Junairiah dkk, 2007).

Kendala lumut hati *Dumortiera hirsuta* untuk dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku antimikroba adalah ketersediaannya yang terbatas dan belum diungkapnya teknologi budidaya sampai proses menghasilkan bahan aktif. Oleh sebab itu, pemanfaatan bioteknologi tepatnya kultur kalus diharapkan dapat membantu dalam penyediaannya.

Kajian tentang senyawa aktif antimikroba dalam *Dumortiera hirsuta* juga belum banyak dilakukan. Sehingga, penelitian yang mengungkap potensi *Dumortiera hirsuta* sebagai sumber bahan antimikroba dan upaya perbanyakannya melalui kultur kalus penting untuk dikembangkan.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka peneliti merumuskan permasalahan sebagai berikut:

- 1) Metode sterilisasi manakah yang dapat menghasilkan eksplan steril dan segar?
- 2) Formulasi media manakah yang dapat menginduksi terbentuknya kalus ?
- 3) Jenis elisitor manakah yang dapat memacu terbentuknya senyawa antimikroba?
- 4) Jenis golongan senyawa antimikroba apa saja yang terdapat dalam kalus lumut hati *Dumortiera hirsuta* ?
- 5) Bagaimanakah aktivitas antimikroba ekstrak kalus lumut hati *Dumortiera hirsuta* dari berbagai metode elisitasi ?

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Tinjauan Umum Lumut Hati

Berdasarkan perbedaan morfologi anatomi gametofitnya, para ahli botani membagi lumut menjadi tiga kelas yaitu Hapticopsida (lumut hati), Anthocerotopsida (lumut tanduk), dan Bryopsida (lumut daun). Lumut daun merupakan kelas yang mempunyai tingkat perkembangan paling tinggi dibandingkan dua kelas lumut lainnya serta memiliki jumlah jenis terbesar (Stern, 2003).

Hapticopsida adalah lumut hati, disebut demikian karena gametofit pada beberapa genus bentuk luarnya seperti hati. *Rhizoid* lumut hati berupa sel tunggal (uniseluler). *Rhizoid* berfungsi sebagai alat penghisap zat makanan, sekat melintang *rhizoid* tidak sempurna dan tidak bercabang. Gametofit umumnya berkembang secara langsung dari spora. Sporofit lumut hati umumnya kurang begitu kompleks dibandingkan lumut sejati. Pada kapsul sporogonium ada atau tidak mempunyai benang-benang elatera yang berfungsi mengeluarkan spora dan kapsul mempunyai mekanisme pelepasan spora yang sangat berbeda.

Gametofit lumut hati berwarna hijau memipih dan tubuhnya dorsiventral yaitu tubuh bagian atas atau dorsal berbeda dengan bagian bawah atau ventral. Berdasarkan bentuk talusnya, lumut hati dibagi menjadi dua kelompok yaitu lumut hati bertalus dan lumut hati berdaun. Anggota kelas Hapticopsida yang sering dijumpai adalah *Riccia*, *Marchantia*, dan *Dumortiera* yang semuanya bertalus, sedangkan yang berdaun adalah *Jungermania*, *Leucolejeuna*, dan *Scapania* (Tjitrosoepomo, 2003; Yudianto, 1992 ; dan Tjondronegoro, 1989)

### 2.2 Karakteristik dan Klasifikasi *Dumortiera hirsuta*

*Dumortiera hirsuta* merupakan tumbuhan taloid, tebal talus lebih dari satu sel. Sel-sel dengan banyak kloroplast kecil, permukaan talus tanpa porus dan tidak reticulate, tidak mempunyai ruang udara, mempunyai *rhizoid papillose*, lebar talus 1-3 cm, dan biasanya dengan sebuah midrib sempit, sporofit diatas reseptakel bertangkai (Sujadmiko, 1999).

*Dumortiera hirsuta* merupakan salah satu lumut hati dari famili *Marchantiaceae*, oleh karena itu kekerabatannya sangat dekat dengan lumut hati dari jenis *Marchantia*. Adapun klasifikasi *Dumortiera hirsuta* menurut Tjitrosoepomo (2005) adalah sebagai berikut :

Regnum : Plantae  
Divisi : Spermatophyta  
Kelas : Hepaticopsida  
Ordo : Marchantiales  
Famili : Marchantiaceae  
Genus : *Dumortiera*  
Spesies : *Dumortiera hirsuta*

### 2.3 Kandungan dan Fungsi Bahan Aktif Bryophyta

Bryophyta mengandung bahan aktif flavonoid, isoflavonoid, biflavonoid, flavones apigenin, apige nin-7-O-triglycoside, lucenin-2, luteolin-7-O-neohesperidoside, saponarine, vitexin dan bifianoid bartramiaflavone, 'C-dan O-Glikosida flavon, O-Glikosida flavanol, O-Glikosida flavanon, O-Glikosida auron, C-Glikosida dihidrokhalkon, O-Glikosida flavanol, Auron, 'C-dan O'-Glikosida flavon, dan 3-Deoksiantosianin (Basile *et al.*, 1999 ; Markham, 1988; Saxena dan Harinder,2004)

Flavonoid terdapat pada tanaman dan mempunyai banyak fungsi, diantaranya menghasilkan wama kuning, merah, dan biru pada bunga, serta untuk proteksi terhadap serangan mikroba dan serangga. Flavonoid mengurangi respons tubuh terhadap alergen, virus, dan karsinogen, sehingga flavonoid menunjukkan aktivitas anti alergi, anti inflamasi, antimikrobia, dan anti kanker. Flavonoid juga mempunyai aktivitas sebagai antioksidan, yaitu sebagai proteksi terhadap kerusakan oksidasi dan radikal bebas. Selain bahan-bahan aktif yang disebutkan di atas, Bryophyta juga mengandung terpenoid, fenolik, dan bahan-bahan yang mudah menguap yang mempunyai kemampuan sebagai antimikroba.

### 2.4 Manfaat Bryophyta

Manfaat Bryophyta sebagai tumbuhan obat di Cina, Eropa, dan Amerika Utara telah tercatat dalam literatur. Di Cina, beberapa spesies dari *Fissidens* dan *Polytrichum*

digunakan sebagai diuretik dan obat untuk menstimulasi pertumbuhan rambut. Orang Indian di Amerika Utara menggunakan *Bryum*, *Mnium*, *Philonotis*, dan *Polytrichum juniperinum* untuk menyembuhkan luka bakar dan memar (Basile *et al.*, 1998). *Rhodobyum giganteum* dapat meningkatkan transfusi darah aorta sampai 30% pada hewan. *Physcomitrela* digunakan untuk menghasilkan faktor IX pembekuan darah untuk penderita hemofili B (Basile *et al.*, 1998).

Telah dilakukan penelitian yang menunjukkan aktivitas ekstrak Bryophyta sebagai antimikroba, di antaranya adalah penelitian yang dilakukan oleh Ilhan *et al.*, (2006) yang menyatakan bahwa ekstrak *Palustriella commutata* dalam fraksi aseton dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif (*Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, dan *Enterobacter aerogenes*) dan bakteri Gram positif (*Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, dan *Micrococcus luteus*). Subhisha dan Subramoniam (2005) melaporkan bahwa ekstrak *Pallavicinia lyellii* mempunyai aktivitas antifungi terhadap *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, dan *Candida albicans*.

## 2.5 Tinjauan Antimikroba

Antimikroba adalah bahan kimia alami atau sintetik yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Agen yang dapat membunuh organisme sering disebut agensidal (*cidal agents*) seperti bakterisidal, fungisidal, dan virusidal. Agen yang dapat menghambat pertumbuhan disebut agen statik (*static agents*) seperti bakteri statik, fungi statik, dan virus statik (Madigan *et al.*, 2003). Agen mikroba dapat berupa desinfektan, antiseptik, maupun antibiotik. Senyawa antimikroba dapat menyebabkan kerusakan fisik sel, misalnya lisis yang disebabkan oleh *surface active agents* sehingga mikroba tidak mungkin lagi dapat berkembang biak. Aktivitas mikroba yang dapat diamati secara langsung adalah penghambatan terhadap perkembangbiakan mikroba (Madigan *et al.*, 2003).

Menurut Pelczar dan Chan (1988) banyak faktor dan keadaan dapat mempengaruhi penghambatan atau pembasmian mikroorganisme oleh bahan antimikroba. Faktor-faktor tersebut antara lain konsentrasi atau intensitas zat antimikroba, jumlah mikroorganisme, suhu, spesies mikroorganisme, adanya bahan organik, dan pH.

Aktivitas antimikroba dapat diketahui dengan melakukan uji skrining antimikroba, antara lain dengan menggunakan metode kertas cakram. Aktivitas antimikroba suatu senyawa terhadap suatu mikroba uji dibuktikan dengan adanya respons penghambatan pertumbuhan mikroba yang ditandai dengan halo (daerah bening di sekitar kertas cakram). Aktivitas antimikroba dapat digunakan untuk menentukan nilai MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) yaitu konsentrasi terendah suatu agen antimikroba yang diperlukan untuk menghambat perkembangan pertumbuhan mikroba secara nyata setelah diinkubasi selama waktu yang dikehendaki; atau nilai MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*); dan MFC (*Minimal Fungicidal Concentration*) untuk mengetahui efek membunuh bakteri atau fungi (Haba *et al.*, 2002; Wistreich, 2003).

## **2.6 Mekanisme Kerja Antimikroba**

Secara umum, serangan suatu bahan antimikroba dapat diduga dengan mengetahui struktur dan komposisi mikroba. Suatu sel hidup yang normal memiliki dinding sel, membran sitoplasma yang tersusun oleh sejumlah besar protein, asam nukleat, dan senyawa lainnya. Kerusakan pada salah satu penyusun sel dapat mengawali terjadinya perubahan yang menuju kematian sel tersebut (Pelczar dan Chan, 1988).

Mekanisme daya kerja antimikroba terhadap sel antara lain dengan merusak dinding sel, mengganggu permeabilitas membran sel, merusak molekul protein dan asam nukleat, menghambat aktivitas enzim, dan menghambat sintesa asam nukleat (Pelczar dan Chan, 1988; Muslimin 1995).

## **2.7 Tinjauan Mikroba Patogen**

Mikroba patogen adalah semua mikroba yang dapat menimbulkan penyakit baik pada hewan, manusia dan tumbuhan. Mikroba uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri dan yeast. Bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Untuk golongan yeast yang digunakan adalah *Candida albicans*.



## **2.8 Teknik Pemisahan dan Pemurnian**

### **2.8.1. Ekstraksi**

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Penggunaan ekstraksi yang tepat bergantung pada bahan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi.

Berdasarkan proses pelaksanaannya, ada 2 macam ekstraksi, yaitu:

#### **1. Ekstraksi berkesinambungan**

Pada ekstraksi ini, pelarut yang sama dipakai secara berulang-ulang sampai proses selesai. Contohnya: sokhlet.

#### **2. Ekstraksi bertahap**

Pada ekstraksi ini, selalu dipakai pelarut baru pada setiap tahapnya sampai proses selesai. Contohnya: maserasi dan perkolasi.

Sedangkan berdasarkan bentuk campuran yang diekstraksi dapat dibedakan menjadi 2 macam, yaitu:

#### **1. Ekstraksi padat-cair**

Merupakan proses ekstraksi yang paling banyak ditemui dalam usaha mengisolasi senyawa berkhasiat yang terkandung dalam bahan alam yang berbentuk padat.

#### **2. Ekstraksi cair-cair**

Merupakan proses ekstraksi yang berdasarkan pada distribusi solut dalam dua macam pelarut yang tidak saling campur sehingga solut akan terbagi dalam kedua macam pelarut tersebut sampai dicapai suatu keadaan yang setimbang (Harborne, 1987).

### **2.8.2. Kromatografi**

Kromatografi merupakan teknik pemisahan suatu campuran zat-zat kimia berdasarkan perbedaan distribusinya dalam fasa gerak (dapat berupa cair maupun gas) dan fasa diam (dapat berupa padat maupun cair). Dengan kromatografi, hampir setiap campuran kimia, mulai dari senyawa dengan berat molekul rendah sampai tinggi, dapat dipisahkan menjadi komponen-komponennya dengan beberapa metode kromatografi (Gritter, 1991).

Ada beberapa macam metode kromatografi, yaitu kromatografi lapis tipis, kromatografi gas, kromatografi kolom, kromatografi vakum cair, kromatografi kolom cepat, dan sebagainya. Pemisahan dan pemurnian kandungan senyawa dalam tumbuhan dapat

dilakukan dengan menggunakan salah satu dari metode kromatografi atau gabungan dari metode tersebut

Kromatografi lapis tipis merupakan suatu metode pemisahan senyawa kimia berdasarkan perbedaan adsorpsi oleh fasa diam dan fasa gerak. Fasa diam yang digunakan berupa lapisan tipis dengan ketebalan 0,1 – 0,25 mm yang terdiri dari bahan padat biasanya berupa selulosa yang disapukan pada suatu pelat kaca atau penyangga lain yang digunakan untuk kromatografi. Lapisan yang paling banyak digunakan berupa silika gel, tetapi dapat juga dari sephadex, aluminium oksida, magnesium fosfat, damar penukar ion (untuk senyawa terionisasi), kalium hidroksida dan poliamida (Harborne, 1987).

## BAB III

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

- 1) Mengetahui metode sterilisasi yang sesuai untuk mendapatkan eksplan steril
- 2) Mengetahui formulasi media yang sesuai untuk induksi dan perbanyakan kalus.
- 3) Mengetahui jenis elisitor yang dapat memacu terbentuknya senyawa antimikroba
- 4) Mengetahui golongan senyawa antimikroba yang terdapat dalam kalus *Dumortiera hirsuta*
- 5) Mengetahui aktivitas antimikroba ekstrak kalus *Dumortiera hirsuta* berbagai metode elisitasi terhadap mikroba patogen

#### 3.2. Manfaat Penelitian

- 1) Tersedianya data dasar tentang senyawa antimikroba lumut *Dumortiera hirsuta*.
- 2) Memberikan informasi ilmiah manfaat lumut *Dumortiera hirsuta* untuk digunakan penelitian di bidang biologi, farmasi dan kedokteran.
- 3) Meningkatkan derajat kesehatan masyarakat

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Lokasi dan Lama Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di 3 laboratorium yaitu Laboratorium Kultur Jaringan dan Mikrobiologi Departemen Biologi, serta Laboratorium Kimia Organik Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga selama 8 bulan. Tahapan penelitian ini adalah (1) Sterilisasi untuk mendapatkan eksplan talus steril, (2) Induksi dan perbanyakan kalus dengan menggunakan zat pengatur tumbuh yang sesuai, (3) Uji peningkatan produksi senyawa aktif dengan menggunakan metode elisitasi biotik dan abiotik, (4) Ekstraksi kalus *Dumortiera hirsuta* dengan berbagai metode elisitasi (5) Uji aktivitas antimikroba dari ekstrak kalus berbagai metode elisitasi.

#### 4.2. Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.2.1 Bahan

1. Bahan utama yang digunakan adalah lumut hati *Dumortiera hirsuta* yang diperoleh dari Hutan Cagar Batu Malang.
2. Mikroba uji yang digunakan meliputi *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* yang merupakan koleksi dari laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Unair.
3. Bahan kimia untuk ekstraksi yaitu heksan berderajat pa (pro analisis), silika gel GF<sub>254</sub>, pereaksi Liebermann Buchard dan bahan lainnya.
4. Bahan untuk pertumbuhan mikroba uji terdiri atas Eosine Methylene Blue (EMB), Manitol Salt Agar (MSA), Potato Dextrose Agar (PDA), dan Mueller Hinton Agar (MHA)
5. Bahan untuk induksi dan perbanyakan kalus adalah medium Murashige dan Skoog.

##### 4.2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas yang biasa dipakai di laboratorium, tabung maserasi, pipet mikro, rotary vacuum evaporator, water bath, seperangkat alat kromatografi lapis tipis.

### **4.3. Cara Kerja**

#### **4.3.1 Prosedur sterilisasi**

Prosedur sterilisasi eksplan lumut hati *Dumortiera hirsuta* terdiri atas 6 metode sterilisasi yaitu:

##### **Metode sterilisasi A.**

Tumbuhan lumut dibersihkan dari tanah yang melekat, direndam dalam larutan detergen, dan dibilas dengan air mengalir hingga tidak berbusa. Di dalam LAFC, tumbuhan lumut disterilisasi dengan 0,1% sodium hipoklorit selama 5 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing 3 menit. Selanjutnya disterilisasi lagi dengan 1% sodium hipoklorit selama 5 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing 3 menit. Eksplan ditanam pada 6 botol, masing-masing botol terdiri atas 5 potong eksplan.

##### **Metode sterilisasi B.**

Tumbuhan lumut dibersihkan dari tanah yang melekat, direndam dalam larutan detergen, dan dibilas dengan air mengalir hingga tidak berbusa. Lalu direndam dalam fungisida (2 gram dalam 100 ml aquades) selama 10 menit. Di dalam LAFC, tumbuhan lumut disterilisasi dengan 0,1% sodium hipoklorit selama 5 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing 3 menit. Selanjutnya disterilisasi lagi dengan 1% sodium hipoklorit selama 5 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing 3 menit. Eksplan ditanam pada 6 botol, masing-masing botol terdiri atas 5 potong eksplan.

##### **Metode sterilisasi C**

Tumbuhan lumut dibersihkan dari tanah yang melekat, direndam dalam larutan detergen, dan dibilas dengan air mengalir hingga tidak berbusa. Di dalam LAFC, tumbuhan lumut disterilisasi dengan sublimat (1,6 ml dalam 100 ml aquades steril) selama 10 menit, dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya disterilisasi lagi dengan 20% sodium hipoklorit dan satu tetes tween 80 selama 10 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing 3 menit. Eksplan ditanam pada 6 botol, masing-masing botol terdiri atas 5 potong eksplan.

#### **Metode sterilisasi D**

Tumbuhan lumut dibersihkan dari tanah yang melekat, direndam dalam larutan detergen, dan dibilas dengan air mengalir hingga tidak berbusa. Di dalam LAFC, tumbuhan lumut disterilisasi dengan sublimat (1,6 ml dalam 100 ml aquades steril) selama 7 menit, dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya disterilisasi lagi dengan 1% sodium hipoklorit dan satu tetes tween 80 selama 5 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing 3 menit. Eksplan ditanam pada 6 botol, masing-masing botol terdiri atas 5 potong eksplan.

#### **Metode sterilisasi E**

Tumbuhan lumut dibersihkan dari tanah yang melekat, direndam dalam larutan detergen, dan dibilas dengan air mengalir hingga tidak berbusa. Di dalam LAFC, tumbuhan lumut disterilisasi dengan 1% sodium hipoklorit dan satu tetes tween 80 selama 5 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing 3 menit. Eksplan ditanam pada 6 botol, masing-masing botol terdiri atas 5 potong eksplan.

#### **Metode sterilisasi F**

Tumbuhan lumut dibersihkan dari tanah yang melekat, direndam dalam larutan detergen, dan dibilas dengan air mengalir hingga tidak berbusa. Di dalam LAFC, tumbuhan lumut disterilisasi dengan sublimat (0,2 ml dalam 100 ml aquades steril) selama 7 menit, dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya disterilisasi lagi dengan 1% sodium hipoklorit dan satu tetes tween 80 selama 5 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing 3 menit. Eksplan ditanam pada 6 botol, masing-masing botol terdiri atas 5 potong eksplan.

#### **Metode sterilisasi G**

Tumbuhan lumut dibersihkan dari tanah yang melekat, direndam dalam larutan detergen, dan dibilas dengan air mengalir hingga tidak berbusa. Di dalam LAFC, tumbuhan lumut disterilisasi dengan betadin (0,25 ml dalam 100 ml aquades steril) selama 5 menit, dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya disterilisasi lagi dengan 1% sodium hipoklorit dan satu tetes tween 80 selama

5 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing 3 menit. Eksplan ditanam pada 6 botol, masing-masing botol terdiri atas 5 potong eksplan.

#### **Metode sterilisasi H**

Tumbuhan lumut dibersihkan dari tanah yang melekat, direndam dalam larutan detergen, dan dibilas dengan air mengalir hingga tidak berbusa. Di dalam LAFC, tumbuhan lumut disterilisasi dengan sublimat (0,1 ml dalam 100 ml aquades steril) selama 2 menit, dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing selama 3 menit. Selanjutnya disterilisasi lagi dengan 1% sodium hipoklorit dan satu tetes tween 80 selama 5 menit dan dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing 3 menit. Eksplan ditanam pada 6 botol, masing-masing botol terdiri atas 5 potong eksplan.

#### **4.3.2 Pembuatan Media**

Pembuatan media MS dilakukan dengan menimbang unsur-unsur makronutrien, mioinositol dan sukrosa dengan menggunakan timbangan analitik. Unsur makronutrien yang telah ditimbang dilarutkan dalam aquadest 300 ml dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Selanjutnya memasukkan larutan stok besi, mikronutrien, vitamin, hormon 2,4 D, mioinositol dan sukrosa ke dalam labu Erlenmeyer satu per satu sampai larut. Aquadest dituangkan sampai kurang lebih 900 ml. pH diukur dengan kertas pH. Bila pH terlalu asam, maka ditambahkan KOH, tetapi bila terlalu basa ditambahkan HCl. Selanjutnya ditambahkan aquadest sampai volume mencapai 1000 ml.

Bahan pematat yang telah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam larutan media dan dipanaskan di atas kompor gas sampai seluruh bahan larut. Larutan dituang ke dalam botol steril, ditutup menggunakan aluminium foil atau sumbat karet dan diberi label. Botol-botol yang telah berisi media disterilisasi menggunakan autoclave pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya botol disimpan pada ruang inkubasi dengan suhu kamar.

Medium perlakuan untuk induksi dan perbanyakkan kalus adalah sebagai berikut:

Medium 1: MS 0

Medium 2: MS + 1 mg/l 2,4 D

Medium 3: MS + 2 mg/l 2,4 D

Medium 4: MS + 3 mg/l 2,4 D



Medium 5: MS + 4 mg/l 2,4 D

Medium 6: MS + 5 mg/l 2,4 D

Medium untuk pemacuan pembentukan bahan aktif terdiri atas:

Medium elisitasi biotik (MS + elisitor ekstrak yeast)

Medium elisitasi abiotik (MS + elisitor KNO<sub>3</sub>)

Medium elisitasi (MS + elisitor ekstrak yeast dan KNO<sub>3</sub>)

#### 4.3.3 Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Sebelum digunakan, LAF disterilkan terlebih dahulu dengan cara membersihkan seluruh permukaannya menggunakan tisu yang telah dibasahi dengan alcohol 70 %. Kemudian lampu ultraviolet (UV) dinyalakan selama kurang lebih 30 menit. Seluruh bahan dan alat yang akan digunakan dalam penanaman eksplan selanjutnya dimasukkan ke LAF. Peralatan dan bahan tersebut terdiri atas pinset, scalpel beserta mata pisau steril, cawan Petri steril, botol kultur, Erlenmeyer berisi aquades steril, botol berisi alcohol 70 %, lampu Bunsen, *sodium hipoklorit*, tween 80, gelas ukur dan eksplan. Sebelum dimasukkan dalam LAF, peralatan disemprot terlebih dahulu dengan alcohol 70 %.

Sebelum ditanam, eksplan harus disterilisasi dahulu dengan berbagai metode sterilisasi. Kemudian talus dipotong ukuran 1x1 cm diatas cawan petri steril menggunakan pinset steril dan gunting steril.

Masing-masing potongan eksplan yang telah steril ditanam dalam botol kultur berisi media dengan kombinasi konsentrasi hormon tertentu. Setiap botol terdiri atas 5 potong eksplan dan diletakkan dalam ruang inkubasi gelap bersuhu 23±2°C. Kalus pada medium induksi dipelihara selama 4 minggu, selanjutnya disubkultur pada medium elisitasi selama 3 minggu. Kalus yang dihasilkan pada medium elisitasi diekstrak

#### 4.3.4 Pembuatan Ekstrak Kalus *Dumortiera hirsuta* dan Monitoring Bioaktif Ekstrak dengan KLT

Kalus Lumut dikeringkan dan dibuat dalam bentuk serbuk selanjutnya diekstrak dengan cara maserasi. Kalus dari masing-masing metode elisitasi diekstrak dengan menggunakan pelarut heksan dengan cara maserasi dan dipisahkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator*. Masing-masing kandungan kimia ekstrak

dimonitor dengan KLT menggunakan fase diam gel GF 254 dan fase gerak heksan : kloroform = 1:1, serta heksan: etil asetat = 8 : 1, diamati dibawah sinar uv dengan  $\lambda$  254 nm dan 366 nm, serta disemprot dengan pereaksi Liebermann Burchard.

#### 4.3.5 Penentuan Aktivitas Antimikroba

Untuk mengetahui aktivitas antimikroba tumbuhan lumut digunakan metode cakram kertas. Media yang digunakan dalam uji ini adalah MHA steril. Suspensi mikroba dibuat sesuai dengan standar 0,5 Mc Farland yaitu dengan menentukan kekeruhan suspensi mikroba pada OD 0,1 pada  $\lambda_{625}$  nm untuk bakteri dan OD 0,1 pada  $\lambda_{600}$  nm untuk fungi. Sebanyak 1 ml suspensi mikroba uji dimasukkan kedalam cawan petri steril, kemudian ditambahkan 15 ml media MHA ke dalam cawan tersebut untuk dihomogenkan. Agar dibiarkan dingin dan memadat. Sebanyak 3 buah cakram kertas steril diletakkan di permukaan agar dengan jarak yang berjauhan dan sama. Pada kertas cakram diinjeksikan 20  $\mu$ L ekstrak kalus tumbuhan lumut, masing-masing dengan konsentrasi 80.000 ppm. Untuk uji difusi lanjut dengan konsentrasi 2500 ppm; 5000 ppm; 10000 ppm; 20000 ppm; 40000 ppm; 60000 ppm. Penghambatan pertumbuhan ditunjukkan dengan terbentuknya daerah hambatan (*Halo*) jemih di sekitar kertas cakram. Diameter daerah penghambatan diukur dengan jangka sorong (LC = 0,05 mm).

#### 4.3.6 Metode Pengenceran dalam Tabung (*tube dilution method*)

Metode ini diawali dengan membuat suspensi mikroba uji pada air fisiologis sehingga diperoleh OD 0,5 pada  $\lambda = 600$ . Kisaran konsentrasi zat antimikroba yang akan diujikan harus lebih rapat agar dapat mempertegas nilai MIC (Bailey dan Scott, 1994).

Masing-masing fraksi yang diperoleh diencerkan dengan pelarut yang sesuai, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 1 mL dan ditambahkan 1 mL suspensi mikroba uji ke dalamnya. Kultur dihomogenkan dan diinkubasikan selama 24 jam. Aktivitas antibakteri akan terlihat apabila terjadi penurunan kekeruhan dalam kultur tersebut. Aktivitas ini menunjukkan nilai MIC. Sedangkan nilai MBC dapat diketahui setelah kultur yang positif ditumbuhkan pada medium agar dan diinkubasikan selama 24 jam. Apabila tidak ada mikroba yang tumbuh, maka konsentrasi tersebut merupakan nilai MBC (Bailey dan Scott, 1994)

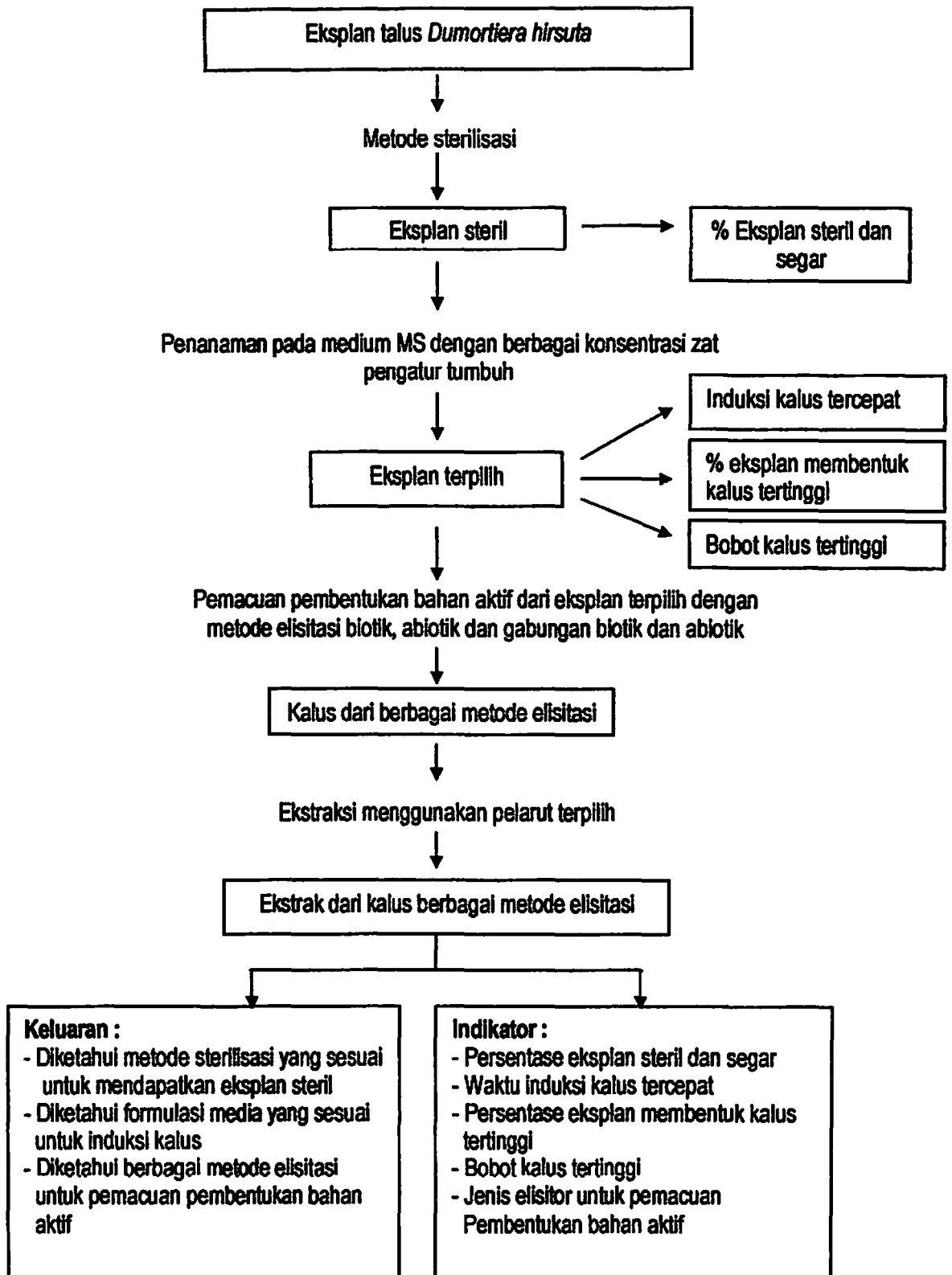
#### **4.3.7 Pemisahan Kandungan Senyawa dalam Ekstrak**

Terlebih dahulu menyiapkan bejana pengembang dengan tutupnya. Lalu memasukkan fase gerak berupa heksan: kloroform = 1:1 dan heksan: etil asetat = 8:2. Selanjutnya bejana pengembang ditutup agar proses penjenuhan bisa homogen dan cepat. Untuk pembuatan kromatogram, silika gel dipotong lalu diberi tanda batas atas dan batas bawah. Masing-masing ekstrak ditotolkan pada silika gel dan ditunggu sampai kering. Silika gel dimasukkan pada bejana pengembang, ditutup an ditunggu hingga fase gerak mencapai batas atas. Silika gel dikeluarkan dan dikeringkan. Hasil keomatogram difoto. Selanjutnya menentukan harga Rf dari noda-noda yang tampak pada kromatogram.

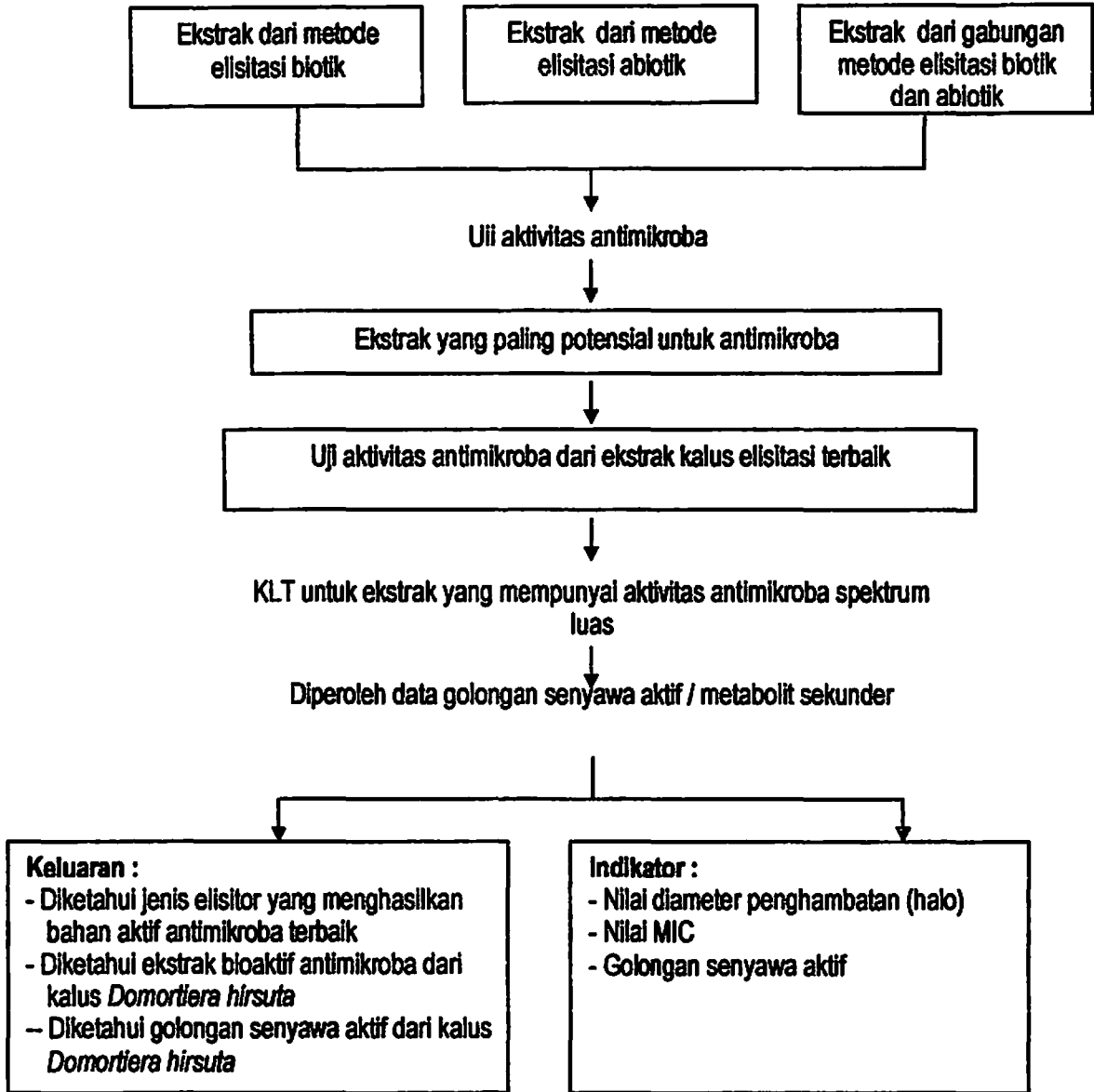
#### **4.3.8 Penentuan Golongan Senyawa Bioaktif**

Identifikasi golongan senyawa bioaktif dilakukan dengan metode KLT menggunakan pereaksi semprot Liebermann Burchard.

## Bagan Alir Penelitian



**Tahap II**  
**Lanjutan**



#### **4.3.9.Rancangan Penelitian**

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratoris ( metode sterilisasi, induksi kalus, penentuan aktivitas antimikroba).

##### **4.3.9.1.Variabel Penelitian**

Variabel dalam penelitian ini meliputi :

- a. Variabel bebas : berbagai metode sterilisasi, konsentrasi 2,4 D yaitu 0, 1,2,3,4,5 mg/l dan konsentrasi ekstrak masing-masing 0 ppm; 2500 ppm; 5000 ppm; 10000 ppm; 20000 ppm; 40000 ppm; 60000; 80000 ppm
- b. Variabel terikat : persentase eksplan steril, waktu induksi kalus, persentase eksplan membentuk kalus, bobot kalus, diameter daerah penghambatan, nilai MIC, dan golongan senyawa aktif

##### **4.3.9.2. Analisis Data**

Data yang diperoleh berupa persentase eksplan steril, waktu induksi kalus, persentase eksplan membentuk kalus, bobot kalus, diameter daerah penghambatan, nilai MIC, golongan senyawa aktif. Data – data tersebut dianalisis secara deskriptif.

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi senyawa antimikroba secara *in vitro* dilakukan melalui serangkaian tahapan. Tahapan tersebut adalah pemilihan eksplan dan sterilisasi, inisiasi dan proliferasi kalus, elisitasi dan ekstraksi senyawa metabolit sekunder.

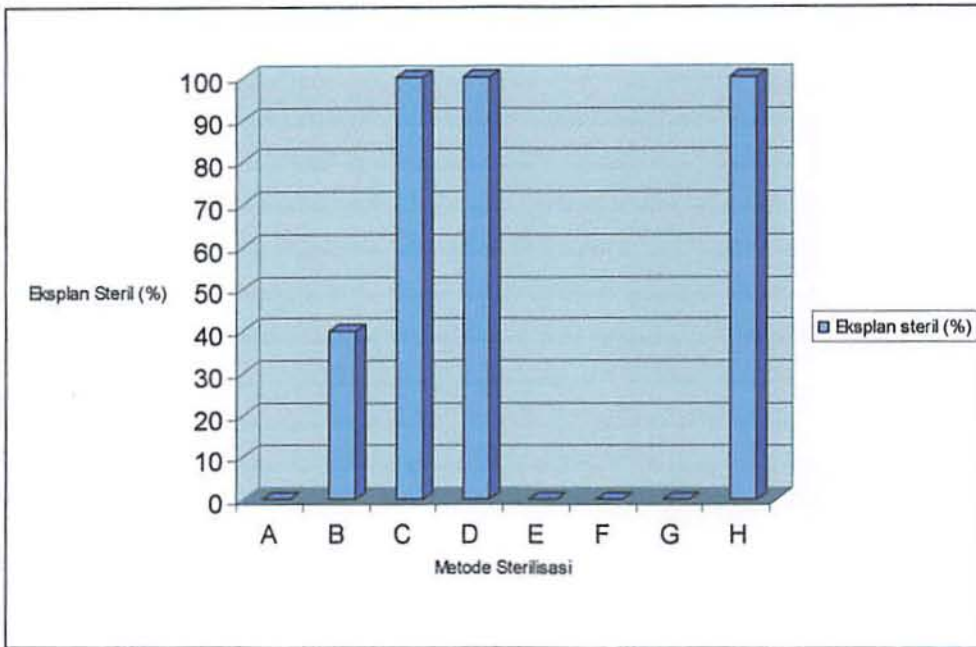
Penelitian ini dirancang untuk mengetahui metode sterilisasi yang sesuai untuk mendapatkan eksplan steril, mengetahui formulasi media yang sesuai untuk induksi dan perbanyakan kalus, mengetahui jenis elisitor yang dapat memacu terbentuknya senyawa antimikroba, mengetahui golongan senyawa antimikroba yang terdapat dalam kalus *Dumortiera hirsuta* dan mengetahui aktivitas antimikroba dari masing-masing ekstrak kalus dari berbagai metode elisitasi.

Hasil pengamatan terhadap hasil penelitian berupa persentase eksplan steril, waktu induksi kalus (hari), persentase eksplan membentuk kalus, bobot kalus, aktivitas antimikroba, dan golongan senyawa aktif yang disajikan dalam bentuk tabel dan diagram batang di bawah ini.

#### 5.1 Sterilisasi Eksplan

Tabel 1. Persentase Eksplan Steril Dari Berbagai Metode Sterilisasi

Metode sterilisasi	Eksplan steril (%)	Kondisi eksplan	Jenis kontaminan
A	0	bleaching	fungi
B	40	bleaching	fungi
C	100	bleaching	-
D	100	tidak bleaching, kecoklatan	-
E	0	tidak bleaching	fungi
F	0	tidak bleaching, coklat	fungi
G	0	tidak bleaching, hijau	fungi
H	100	hijau segar	-



Gambar 1. Diagram batang hubungan antara metode sterilisasi dengan eksplan steril

Bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan untuk inisiasi kultur disebut eksplan (Lestari, 2008). Dalam penelitian ini digunakan eksplan talus. Sebelum ditanam secara aseptis pada media steril, eksplan harus dibersihkan dari kotoran terluar dan disterilisasi. Sterilisasi eksplan hanya sebatas sterilisasi permukaan atau bukan menghilangkan infeksi kontaminan dalam eksplan. Dalam proses sterilisasi eksplan yang dibersihkan adalah debu, cendawan, bakteri atau kontaminan dari bagian dalam permukaan eksplan, bukan yang berada di bagian dalam eksplan (Yusnita, 2003).

Dari semua sumber kontaminasi, yang paling sulit diatasi adalah yang berasal dari eksplan. Oleh karena itu dalam memilih suatu metode sterilisasi harus selektif, yaitu yang mampu mengeliminasi bakteri dan jamur yang tidak diinginkan dengan gangguan seminimal mungkin terhadap bahan eksplan. Pada prinsipnya sulit untuk menentukan metode baku yang berlaku untuk semua jenis tanaman dan semua bagian tanaman. Secara garis besar ada ketentuan umum, namun secara spesifik metode sterilisasi yang paling tepat akan diperoleh dari *trial and error*. Cara penanganan bagian tanaman yang lunak akan sangat berbeda dengan bagian tanaman yang keras atau biji yang memiliki kulit keras (Zulkarnain, 2009). Evans *et al.*, (2003) menyatakan bahwa kultur dapat diperiksa selama 3-5 hari setelah inisiasi atau sub kultur. Sterilan yang digunakan untuk sterilisasi eksplan talus adalah sodium hipoklorit, sublimat, betadine. Konsentrasi dan lama





waktu sterilisasi sangat bervariasi tergantung dari jenis eksplan dan tempat tumbuhnya (Indrianto, 2003 dan Zulkamain, 2009).

Hasil penelitian (tabel 1) menunjukkan bahwa pada metode sterilisasi A, eksplan mengalami bleaching dan kontaminasi 100%. Kontaminasi terjadi setelah 3 hari penanaman (30%) dan setelah 7 hari (1 minggu) eksplan kontaminasi 100%. Kontaminasi berupa kapang yang berwarna putih menutupi eksplan (Gambar 2). Hal ini disebabkan eksplan yang ditanam berasal dari lapang (hutan) yang umumnya lebih kotor, lebih terkontaminasi sejak awal sehingga prosedur sterilisasi harusnya dibuat lebih keras dengan meningkatkan konsentrasi bahan pensteril atau dengan memperpanjang waktu sterilisasi. Penggunaan sodium hipoklorit secara bertingkat menyebabkan sebagian eksplan mengalami perubahan warna.

Dalam proses sterilisasi, dilakukan prasterilisasi yaitu mencuci eksplan dengan menggunakan sabun atau detergen dan dibiarkan beberapa saat di bawah pancuran air yang mengalir. Hal ini dilakukan untuk memecah koloni kontaminan agar lebih peka terhadap sterilan. Pada prosedur sterilisasi B digunakan fungisida dan sodium hipoklorit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan mengalami *bleaching* dan kontaminasi. Kontaminasi terjadi setelah 7 hari penanaman (10%) dan setelah 14 hari (60%). Kontaminan berupa fungi yang menutupi permukaan eksplan.

Penggunaan sodium hipoklorit dengan konsentrasi 20% (metode C) menghasilkan eksplan steril 100%, tetapi semua eksplan mengalami *bleaching* (Gambar 3). Hal ini disebabkan oleh konsentrasi sodium hipoklorit yang digunakan terlalu tinggi. Menurut Bhojwani dan Razdan (1983) sterilan bersifat meracuni jaringan. Oleh karena itu konsentrasi dan lama perlakuan harus benar-benar diperhatikan untuk mengurangi resiko kematian jaringan.

Semua sterilan adalah toksik terhadap eksplan, sehingga perlu dilakukan pencucian yang berulang-ulang agar semua sterilan yang menempel dapat tercuci. Dalam penelitian ini digunakan tween 80 yang berfungsi untuk menurunkan tegangan pada permukaan eksplan, sehingga sterilan lebih mudah masuk ke dalam membran sel eksplan.

Penggunaan sublimat telah terbukti efektif untuk sterilisasi tanaman yang berasal dari lapangan. Roy *et al* (1990) menggunakan 0,5% sublimat sebagai bahan untuk sterilisasi eksplan nodus tanaman nangka dengan hasil yang memuaskan, sedangkan Hadyono dan Zulkamain (1991) menggunakan 0,05% sublimat untuk sterilisasi eksplan

nodus tanaman lada dengan hasil baik. Pada metode sterilisasi C dan D penggunaan sublimat dapat menghasilkan eksplan steril sebesar 100%, hanya saja penggunaan sublimat dengan konsentrasi tinggi menyebabkan eksplan mengalami perubahan warna menjadi *bleaching* (metode C) dan kecoklatan (metode D).

Sterilisasi tanpa menggunakan sublimat seperti pada metode E dan G menyebabkan seluruh eksplan mengalami kontaminasi. Walaupun penggunaan betadine, tetap tidak mampu menghilangkan kontaminan pada eksplan. Pada metode sterilisasi F dihasilkan eksplan steril 100%, tetapi seiring dengan berjalannya waktu eksplan lambat laun mengalami perubahan warna menjadi hijau kecoklatan. Pada metode sterilisasi H, dengan menurunkan konsentrasi sublimat dan waktu sterilisasi, eksplan yang dihasilkan tetap segar. Penggunaan sublimat merupakan pilihan terakhir jika bahan-bahan lain ternyata tidak mampu memusnahkan mikroorganisme yang menginfeksi bahan tanaman. Hal ini disebabkan oleh sifat senyawa tersebut yang sangat beracun sehingga memerlukan penanganan yang sangat hati-hati. Jika menggunakan sublimat, sisa larutan harus dikumpulkan dalam satu wadah kemudian dibuang di suatu tempat yang tidak mencemarkan sumber air minum (Zulkamain, 2009).



Gambar 2. Eksplan mengalami *bleaching* dan terkontaminasi oleh fungi



Gambar 3. Eksplan mengalami *bleaching*



## 5.2 Waktu Induksi Kalus

Tabel 2. Waktu induksi kalus (hari)

Perlakuan	Waktu Induksi Kalus (hari)
To	0
T1	6
T2	6
T3	7
T4	8
T5	9

Keterangan tabel:

T 0 = 0 mg/L 2,4 D

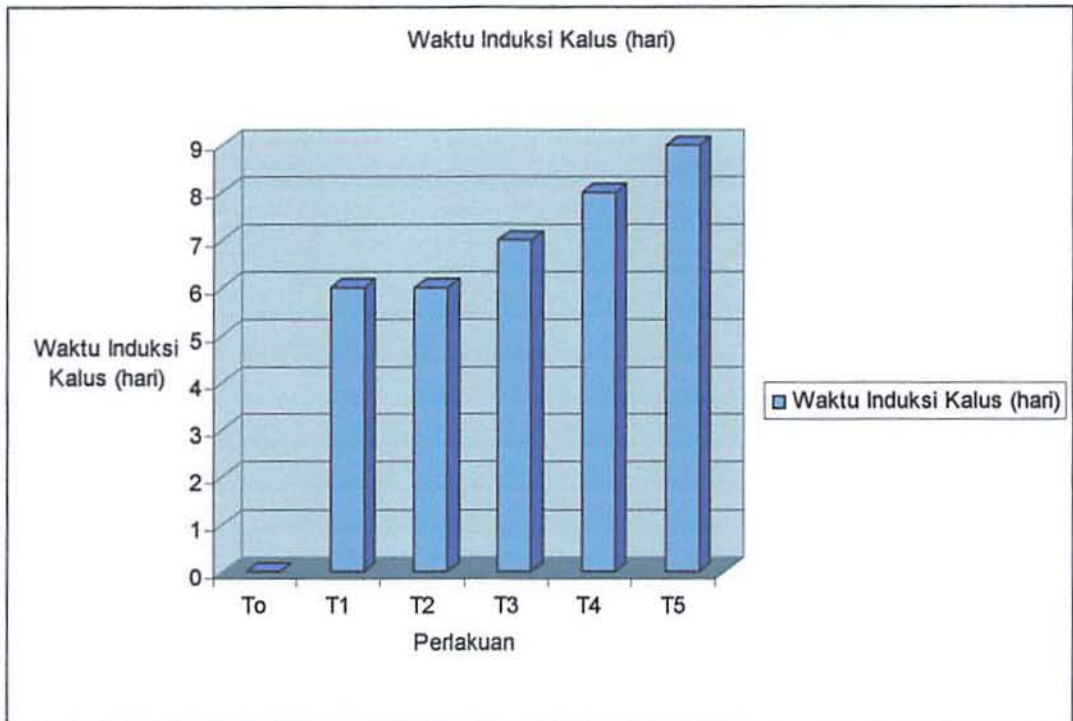
T 1 = 1 mg/L 2,4 D

T 2 = 2 mg/L 2,4 D

T 3 = 3 mg/L 2,4 D

T 4 = 4 mg/L 2,4 D

T 5 = 5 mg/L 2,4 D



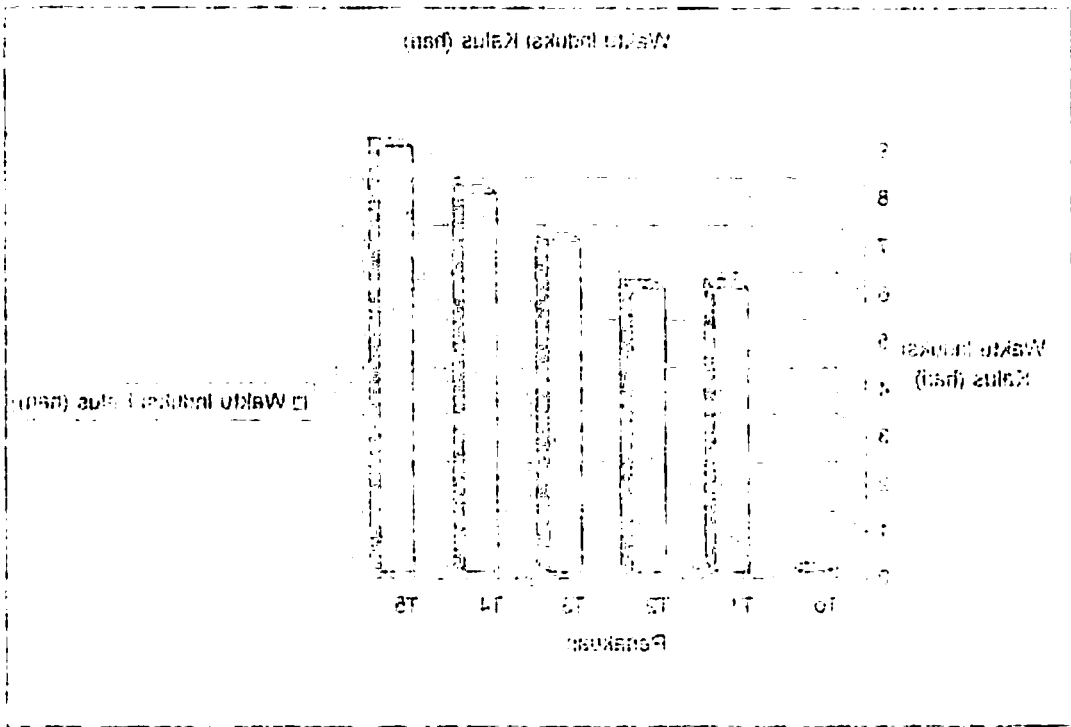
Gambar 4. Diagram batang hubungan antara medium perlakuan dengan waktu induksi kalus

2.3. Waktu Induksi Kalus

Tabel 2. Waktu induksi kalus (hari)

Waktu Induksi Kalus (hari)	Indikator
0	T0
6	T1
6	T2
7	T3
8	T4
9	T5

Indikator label:  
 T0 = 0 mg/L S.A.D  
 T1 = 1 mg/L S.A.D  
 T2 = 2 mg/L S.A.D  
 T3 = 3 mg/L S.A.D  
 T4 = 4 mg/L S.A.D  
 T5 = 5 mg/L S.A.D



Gambar 2.3. Waktu induksi kalus pada media kultur jaringan dengan konsentrasi S.A.D yang berbeda-beda

Kalus merupakan jaringan penutup luka, yaitu massa sel yang terbentuk pada seluruh permukaan irisan eksplan. Untuk menentukan waktu induksi kalus yaitu dengan mengamati dan menghitung lamanya waktu (hari) eksplan membentuk kalus. Helaiian potongan talus lumut hati ditanam di dalam botol yang telah berisi medium MS dengan penambahan garam mineral makro dan mikro (separuh konsentrasi) yang diperkaya dengan penambahan hormon 2,4D berbagai konsentrasi.

Pada semua perlakuan kecuali kontrol menunjukkan bahwa eksplan talus *Dumortiera hirsuta* mampu terinduksi untuk membentuk kalus. Kalus mulai terbentuk pada hari ke enam. Proses mulai terjadinya kalus berbeda-beda tergantung pada macam dan bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan, metode budidaya *in vitro* yang dipakai, serta zat-zat yang ditambahkan pada medium dasar (Suryowinoto, 1996).

Terbentuknya kalus dimulai pada bagian bekas irisan atau luka kemudian diikuti oleh bagian-bagian lain. Kalus biasanya terbentuk pada bagian bekas irisan atau luka dan dapat pula terbentuk pada bagian yang tidak bersentuhan dengan medium sebagai respon terhadap hormon baik hormon endogen maupun eksogen (Hartman *et al*, 1990).

Pengaruh pemberian 2,4D dengan konsentrasi yang bervariasi terhadap hari terbentuknya kalus disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 4. Pada tabel terlihat bahwa konsentrasi 2,4D berpengaruh terhadap waktu induksi kalus. Induksi kalus tercepat didapatkan pada medium  $\frac{1}{2}$  MS dengan konsentrasi 2,4D sebesar 1 dan 2 mg/L., sedangkan pembentukan kalus yang paling lambat diperoleh pada perlakuan 5 mg/L. Pembentukan kalus yang lambat ini kemungkinan disebabkan oleh jaringan talus mengandung auksin endogen dalam jumlah yang tidak cukup untuk memacu pembelahan dan atau pembentangan sel-sel eksplan tanpa penambahan auksin eksogen.

Induksi kalus dari kebanyakan jaringan tanaman yang dikulturkan secara *in vitro* membutuhkan auksin dalam medium pertumbuhannya. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Bijelovic (2003) bahwa pembentukan kalus lumut daun *Aloina aloides* didapatkan pada medium MS dengan zat pengatur tumbuh 2,4D sebesar 1 mg/L..

Kemampuan tanaman untuk dapat diinduksi sangat bergantung pada berbagai variabel termasuk faktor eksplan, komposisi medium, zat pengatur tumbuh, dan stimulus fisik seperti cahaya, suhu dan kelembaban. Sebagai konsekuensinya keberhasilan teknik kultur jaringan sangat bergantung pada optimasi variabel-variabel tersebut. Setiap variabel dapat berbeda pengaruhnya terhadap setiap organ tanaman tertentu dan berdasarkan



tujuan dari pengkulturan. Di antara faktor-faktor tersebut, enam variabel utama harus dipertimbangkan, yaitu seleksi bahan tanaman, teknik sterilisasi eksplan, komposisi medium dasar, keterlibatan zat pengatur tumbuh, serta faktor-faktor lingkungan di mana kultur ditempatkan (Zulkamain, 2009).

Keberadaan zat pengatur tumbuh menentukan terbentuknya kalus. Bagian eksplan yang terinisiasi membentuk kalus, disebabkan oleh sel-sel yang kontak dengan media terdorong menjadi meristematik dan selanjutnya aktif mengadakan pembelahan seperti jaringan penutup luka. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada perlakuan To, kalus tidak terbentuk. Sedangkan pada medium yang diperkaya dengan zat pengatur tumbuh, kalus terbentuk dengan variasi waktu yang berbeda-beda.

Hormon 2,4 D adalah golongan zat pengatur tumbuh yang merangsang perbesaran sel yang terdapat pada jaringan talus lumut dan juga berperan pada beberapa perubahan fisiologi di dalam sel, misalnya permeabilitas membran plasma terhadap bahan-bahan organik sehingga penyerapan bahan organik ke dalam sel menjadi lebih tinggi yang menyebabkan perbesaran sel (Wattimena, 1987).

Pada penelitian ini induksi kalus dipengaruhi oleh metode sterilisasi eksplan, ukuran eksplan yang digunakan dan faktor lingkungan (cahaya) dan oksigen. Sterilisasi yang terlalu keras menyebabkan eksplan mengalami kerusakan jaringan sehingga tidak terinduksi membentuk kalus. Faktor lain yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan adalah ukuran eksplan yang digunakan. George dan Sherrington (1984) menyatakan bahwa semakin kecil ukuran eksplan akan semakin kecil kemungkinan terjadinya kontaminasi baik secara internal dan eksternal, namun laju kehidupan semakin rendah (Gambar 5). Adanya cahaya menyebabkan eksplan mengalami perubahan warna menjadi transparan. Penggunaan cawan petri sebagai wadah kultur kurang sesuai untuk induksi kalus. Hal ini disebabkan kurangnya kandungan oksigen yang digunakan untuk pertumbuhan (Gambar 6).



Gambar 5. Eksplan talus lumut *Dumortiera hirsuta* berukuran kecil

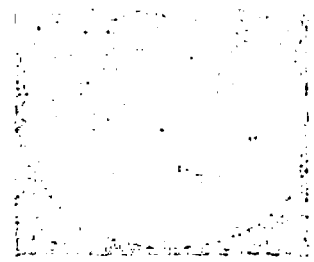


jumlah dari lingkungan. Di antara faktor-faktor tersebut, enam variabel utama harus dipertimbangkan, yaitu seleksi bahan tanaman, teknik seleksi eksplan, komposisi medium dasar, kelembaban zat pengikat, serta faktor-faktor lingkungan di mana kultur dibudidayakan (Zulkarnain, 2009).

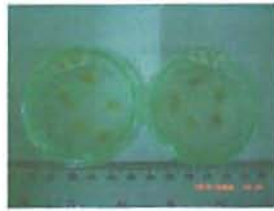
Kecairan zat pengikat untuk menuliskan pembeluhannya sebagai bagian eksplan yang teknisasi menurut kasus, diadapkan oleh sel-sel yang keluar dengan media tersebut menjadi karakteristik dan selulernya akan mengadakan pembelahan seperti jaringan penutup luka. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa perilaku kultur tidak berbeda pada medium yang diperkaya dengan zat pengikat tertentu. Kultur tersebut dengan variasi waktu yang berbeda-beda.

Horner & D adalah golongan zat pengikat untuk yang mengandung beberapa kandungan sel yang terdapat pada jaringan lain. Untuk itu ada beberapa pada beberapa kandungan fitologi di dalam sel, misalnya kemampuan membuat plasma terikat pada bahan-bahan organik sehingga penyediaan bahan organik ke dalam sel menjadi lebih tinggi yang merupakan perbedaan sel (Wahman, 1987).

Faktor pemilihan di media kultur diadapkan oleh media tersebut eksplan ukuran eksplan yang digunakan dan faktor lingkungan (cahaya) dan oksigen. Sterilisasi yang benar harus disediakan eksplan mengenai kesehatan jaringan selnya yang terinfeksi. Faktor lain yang mempengaruhi keberhasilan kultur jaringan adalah ukuran eksplan yang digunakan (Gee dan Shepherd, 1984) menyatakan bahwa semakin kecil ukuran eksplan akan semakin kecil kemungkinannya terinfeksi kontaminasi baik secara infeksi dan eksternal namun juga kebutuhan semakin rendah (Guntur &). Adapun caranya menyajikan eksplan mengenai perbedaan waktu menjadi transplan. Penggunaan cawan petri sebagai wadah kultur kadang sesuai untuk indikasi kultur. Hal ini disebabkan kandungannya organik yang digunakan untuk pertumbuhan (Guntur &).



Gambar 2. Eksplan kultur jamur *Durothia* pada petri dish.

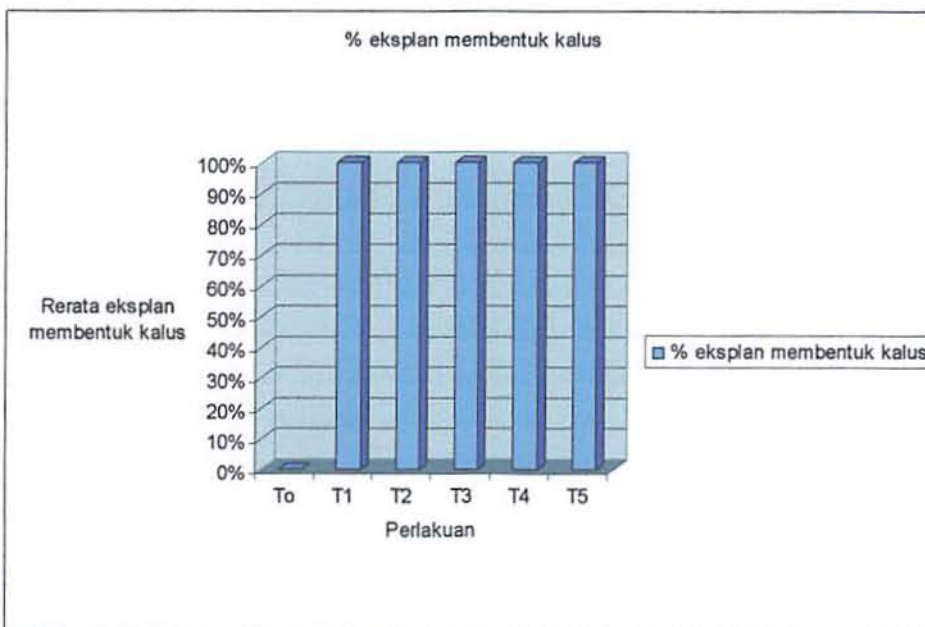


Gambar 6. Eksplan talus lumut *Dumortiera hirsuta* saat diinkubasi di tempat terang

### 5.3 Persentase Eksplan Membentuk Kalus

Tabel 3. Persentase eksplan membentuk kalus

Perlakuan	% eksplan membentuk kalus
To	0%
T1	100%
T2	100%
T3	100%
T4	100%
T5	100%



Gambar 7. Diagram batang yang menunjukkan hubungan antara medium perlakuan dengan persentase eksplan membentuk kalus

Persentase eksplan membentuk kalus dihitung dari jumlah eksplan yang membentuk kalus dibagi jumlah eksplan yang ditanam pada medium perlakuan kemudian dikali 100%. Pada Tabel dan Gambar 7 menunjukkan bahwa keberadaan zat pengatur

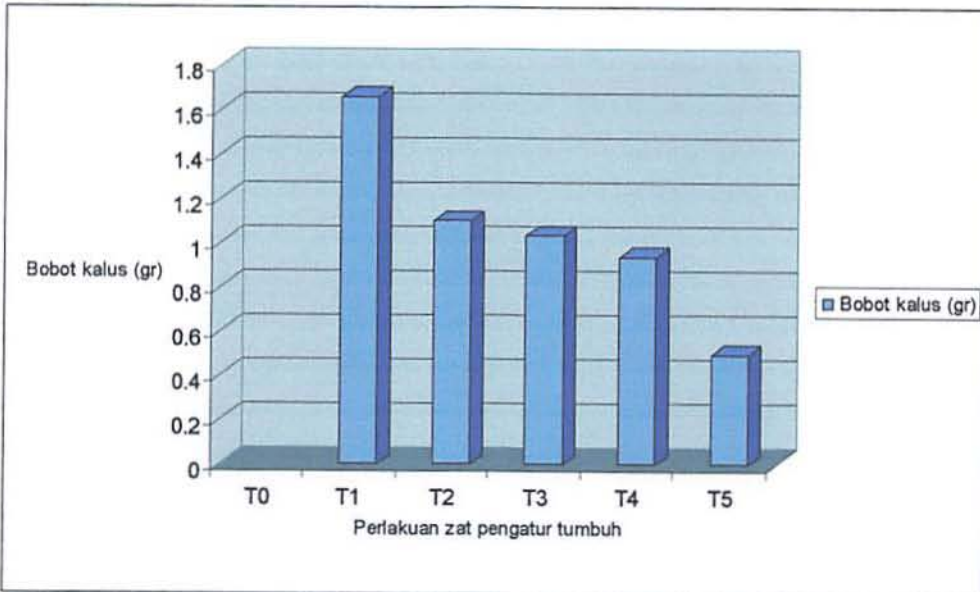
tumbuh dalam berbagai konsentrasi berperan dalam menginduksi terbentuknya kalus, sehingga persentase eksplan yang ditanam pada medium perlakuan adalah 100%.

Tidak adanya zat pengatur tumbuh menyebabkan eksplan tidak mampu untuk membentuk kalus. Menurut Zulkamain (2009) di dalam teknik kultur jaringan kehadiran zat pengatur tumbuh sangat nyata pengaruhnya. Pierik (1997) menyatakan bahwa sangat sulit untuk menerapkan teknik kultur jaringan pada upaya perbanyakan tanaman tanpa melibatkan zat pengatur tumbuh.

#### 5.4 Bobot Kalus

Tabel 4. Bobot kalus

Perlakuan	Bobot kalus (g)
T0	-
T1	1.657
T2	1.10035
T3	1.032475
T4	0.93735
T5	0.498675



Gambar 8. Diagram batang yang menunjukkan hubungan antara medium perlakuan dengan bobot kalus

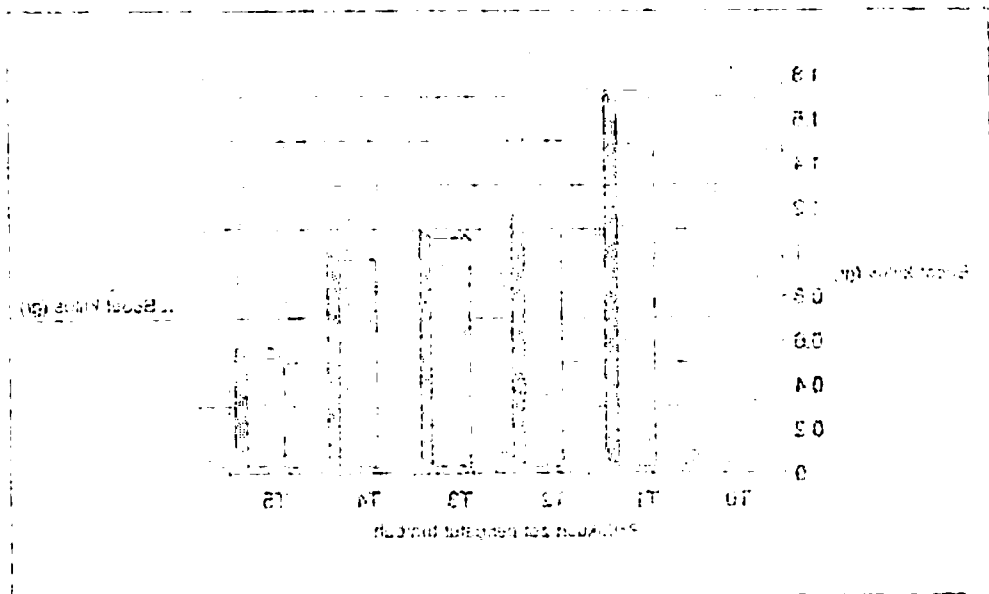
jumlah bobot kering (konsentrasi) dan bobot basah (konsentrasi) telah dikalikan dengan faktor koreksi bobot kering yang dihasilkan pada media tersebut adalah 100%.

Tidak adanya zat pengikat untuk menyebarkan ekstrak tidak masalah untuk uji in vitro karena zat pengikat akan hilang selama proses pengeringan. Menurut Sulaiman (2009) di dalam teknik kultur jaringan, kebutuhan zat pengikat untuk media sangat penting. Prick (1987) menyatakan bahwa sangat sulit untuk melakukan teknik kultur jaringan pada upaya penyebaran jaringan tanpa penambahan zat pengikat tersebut.

### 3.4 Bobot Keras

Tabel 4. Bobot Keras

Replikasi	Bobot Keras (g)
T0	-
T1	1.187
T2	1.1006
T3	1.0243
T4	0.9039
T5	0.8889



Gambar 8. Bobot Keras yang menunjukkan pengaruh media pada bobot kering jaringan



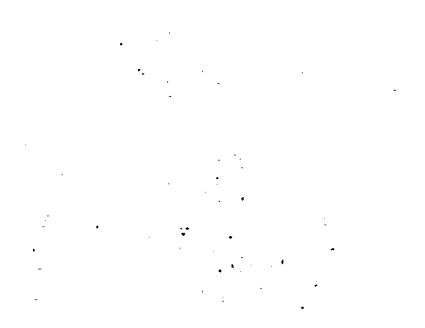
Gambar 9. Induksi kalus pada medium  $\frac{1}{2}$  MS pada umur 4 minggu setelah tanam



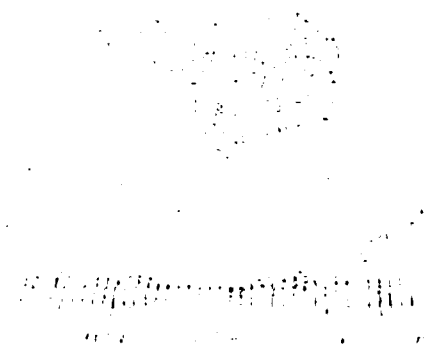
Gambar 10. Kalus mengalami pencoklatan

Pengaruh perlakuan pemberian 2,4D dengan konsentrasi yang bervariasi terhadap bobot kalus disajikan pada Tabel 4 dan Gambar 8. Berdasarkan data hasil pengamatan memperlihatkan kecenderungan bahwa pembentukan dan proliferasi kalus lebih cocok atau sesuai pada medium yang mengandung 2,4D dengan konsentrasi rendah, sehingga pertumbuhan kalus menjadi tidak terhambat (Gambar 9). Pertumbuhan dapat diartikan sebagai peningkatan massa, ukuran, volume sel, organ atau organisme yang bersifat irreversibel.

Pertumbuhan kalus yang baik akan diikuti oleh penambahan ukuran, volume dan bobot kalus. Dengan demikian, tepat jika bobot basah kalus yang dijadikan sebagai parameter juga bertambah berat. Diperkirakan bahwa jaringan talus *Dumortiera hirsuta* memiliki kandungan auksin yang cukup memadai, sehingga penambahan auksin eksogen dalam jumlah sedikit sudah dapat memacu pembentukan dan proliferasi kalus.



Gambar 9. Induksi kultur pada medium NMS pada umur 4 minggu setelah lahir



Gambar 10. Kultur medium berkembang

Pada hari pertama kultur, medium 24D dengan konsentrasi yang bervariasi telah dipotong kultur disajikan pada Tabel 4 dan Gambar 8. Berdasarkan data hasil pengamatan memperlihatkan kecenderungan bahwa pertumbuhan dan proliferasi kultur lebih cocok atau sesuai pada medium yang mengandung 24D dengan konsentrasi rendah, sehingga pertumbuhan kultur menjadi lebih terhambat (Gambar 9). Pertumbuhan dapat diartikan sebagai peningkatan massa, ukuran, volume sel, organ atau organisme yang bersifat invertibel.

Pertumbuhan kultur yang baik akan diikuti oleh bertambahnya ukuran, volume dan bobot kultur. Dengan demikian, bobot jika bobot kultur yang diizinkan sebagai parameter juga menjadi berat. Diperkirakan bahwa jaringan tulang Duvvokiers harus memiliki kandungan senyawa yang cukup memadai, sehingga pertumbuhan kultur ekspansi dalam jumlah sedikit sudah dapat mencapai pertumbuhan dan proliferasi kultur.

Menurut Moore (1989) auksin dapat memacu pemanjangan sel dengan menginduksi sekresi ion hidrogen ke luar sel melalui dinding sel. Keasaman dinding sel meningkatkan pelonggaran dinding sel. Ion kalium masuk ke dalam sel untuk menetralkan ion hidrogen. Hal ini akan meningkatkan penurunan potensial air sel sehingga air masuk dan sel-sel akan membentangi. Pertumbuhan merupakan penambahan ukuran sel yang irreversibel dan peningkatan ini adalah hasil dari kombinasi dan pemanjangan sel (Steeves dan Sussex, 1989).

Pertumbuhan adalah suatu konsep universal dalam bidang biologi dan merupakan hasil dari pengintegrasian berbagai reaksi biokimia, peristiwa biofisik dan proses fisiologi yang berinteraksi di dalam tubuh tumbuhan bersama-sama dengan faktor luar (Sitompul dan Guritno, 1995). Menurut Salisbury dan Ross (1992) pengukuran sederhana untuk mengetahui pertumbuhan dapat dilakukan dengan cara mengukur pertambahan panjang (misalnya tinggi batang), pertambahan diameter (misalnya diameter batang), atau luas (misalnya luas daun) serta dapat pula dilakukan dengan mengukur bobot (massa) tumbuhan dengan cara menimbang berat basah (berat segar) dari tumbuhan.

Pada penelitian ini, parameter untuk mengetahui adanya pertumbuhan yaitu dengan mengukur bobot basah dari kalus. Pada tabel dan gambar 4 menunjukkan bahwa pada konsentrasi 2,4 D sebesar 1 mg/L dihasilkan rata-rata bobot basah tertinggi bila dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Hal ini disebabkan zat pengatur tumbuh 2,4 D dengan konsentrasi tinggi bersifat menghambat pembelahan sel dan pertumbuhan (Amien *et al.*, 2007). Selain itu kalus yang dihasilkan dari medium yang diperkaya dengan 2,4 D dengan konsentrasi yang tinggi umumnya berwarna coklat kehitaman dan rata-rata bobot kalus yang dihasilkan adalah rendah (Gambar 10). Kalus yang terbentuk berwarna coklat dan ada pula yang berwarna hitam. Pada permukaan kalus terdapat tonjolan atau bulatan. Rendahnya kemampuan sel-sel kalus untuk berproliferasi pada perlakuan kombinasi tersebut kemungkinan disebabkan sumber karbohidrat yang dipergunakan sebagai sumber energi dan bahan penyusun dinding sel kurang sesuai untuk mendukung pertumbuhan kalus. Indrianto (2003) menyatakan bahwa zat pengatur tumbuh aktif pada konsentrasi rendah dan diproduksi di dalam tubuh tanaman itu sendiri, pada konsentrasi tinggi merupakan herbisida. Pemberian 2,4 D dengan konsentrasi tinggi akan menghambat IAA, sedangkan pada konsentrasi rendah akan bersifat seperti auksin lain yaitu mendorong transport IAA. Kalus yang berwarna coklat (penuaan) kemungkinan disebabkan oleh

tingginya kandungan sukrosa sehingga menyebabkan tekanan osmosis medium terlalu tinggi. Tingginya tekanan osmosis medium dapat menyebabkan sel-sel kalus yang terbentuk mengalami plasmolisis sehingga dapat menyebabkan kematian. Menurut Pierik (1987) umumnya pertumbuhan dan perkembangan kultur akan meningkat apabila konsentrasi gula ditingkatkan sampai konsentrasi optimum dan akan menurun apabila konsentrasinya terlalu tinggi.

Penuaan kalus ini dapat terjadi karena terhambatnya difusi nutrisi yang disebabkan karena adanya perubahan tekanan osmosis sel-sel kalus dan media atau dapat juga disebabkan adanya akumulasi metabolit yang dapat bersifat racun. Kalus yang umumnya terlalu lama dalam kultur sering kali menunjukkan tanda-tanda penuaan. Hal ini selain disebabkan karena kedua hal tersebut di atas dapat juga karena kehabisan nutrisi, berkurangnya oksigen, disertai kenaikan konsentrasi dari beberapa konstituen medium karena perubahan keseimbangan metabolisme.

Pencoklatan atau *browning* merupakan respon adaptif bagian tanaman akibat pengaruh fisik atau biokimia (memar, perlukaan) ataupun karena proses penuaan. Berdasarkan prosesnya, *browning* dapat dibagi menjadi dua yaitu secara enzimatis (fenolase) dan secara non enzimatis. Pada *browning* secara enzimatis, enzim yang berperan dalam proses ini adalah polifenol oksidase yang mengkatalisis pembentukan melamin berwarna coklat (Santoso dan Nursandi, 2002). Cara mengatasi *browning* adalah dengan melakukan subkultur dan menambah vitamin atau antioksidan pada medium.

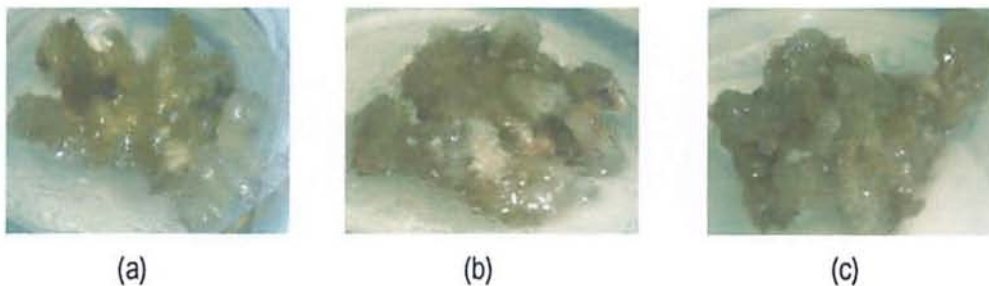
## 5.5 Elisitasi

Tahap yang dilakukan setelah menumbuhkan kalus adalah memindahkan kalus pada medium elisitasi dengan berbagai metode yaitu metode elisitasi abiotik, biotik, gabungan abiotik dan biotik. Menurut Namdeo (2007) elisitor didefinisikan sebagai substansi yang jika diintroduksi dalam konsentrasi kecil ke dalam suatu sistem yang hidup dapat menginisiasi atau meningkatkan biosintesis senyawa tertentu. Elisitasi adalah induksi atau peningkatan biosintesis metabolit dengan penambahan elisitor dalam jumlah sedikit. Elisitor dapat diklasifikasikan berdasarkan sifat dasar dan asalnya. Elisitor abiotik adalah substansi yang dihasilkan dari zat non biologis misalnya garam anorganik, logam berat, pH, dan sebagainya. Sedangkan elisitor biotik adalah substansi yang dihasilkan oleh jasad hidup misalnya zat yang dihasilkan oleh jasad hidup misalnya jasad yang dihasilkan



oleh mikroba. Berdasarkan asalnya ada elisitor eksogen yaitu substansi yang berasal dari luar sel dan elisitor endogen adalah elisitor berasal dari dalam sel.

Pada penelitian ini jenis elisitor yang digunakan adalah elisitor abiotik yaitu garam  $KNO_3$ , elisitor biotik yaitu ekstrak yeast serta elisitor biotik dan abiotik ( ekstrak yeast dan garam  $KNO_3$ ). Sitinjak (1999) melakukan penelitian untuk meningkatkan kandungan gossipol pada kultur kalus *Gossypium hirsutum* L., dengan pemberian elisitor *Saccharomyces cerevisiae*. Sudirga (2002) melaporkan bahwa peningkatan kandungan azadirachtin dalam kultur suspensi sel *Azadirachta indica* adalah melalui elisitasi dengan ekstrak ragi. Muspiah (2002) telah mengevaluasi pengaruh penambahan elisitor berupa ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap produksi ajmalisin pada kultur agregat sel *Catharanthus roseus*. Rahayu (2008) melaporkan tentang peningkatan produksi artemisinin dalam kultur suspensi sel *Artemisia annua* melalui elisitasi dengan ekstrak ragi. Sedangkan Bastari (2008) melakukan penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap metabolit sekunder pada kultur kalus sambiloto (*Andrographis paniculata*). Hasil elisitasi dengan berbagai jenis elisitor disajikan pada gambar 11 di bawah ini.



Gambar 11. Elisitasi dengan elisitor (a) abiotik, (b) biotik, (c) abiotik dan biotik

### 5.6 Ekstraksi Kalus

Kalus yang diperoleh dari masing-masing metode elisitasi diekstraksi. Kalus dikeringkan dan dibuat serbuk untuk memperkecil ukuran partikel. Semakin kecil ukuran partikel maka luas permukaan partikel semakin besar. Ekstraksi akan bertambah baik bila permukaan serbuk yang bersentuhan dengan cairan ekstraksi semakin luas, sehingga semakin halus serbuk seharusnya semakin baik ekstraksinya (Anonim, 1993).

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi. Metode ini dipilih karena tidak menggunakan pemanasan sehingga menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang tidak



tahan panas. Pelarut yang digunakan akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif ini akan larut dan dengan adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan di luar sel menyebabkan larutan lebih pekat yang ada di dalam sel terdesak keluar. Peristiwa tersebut terjadi berulang kali sehingga tercapai keseimbangan konsentrasi larutan zat aktif di dalam dan di luar sel.

Pemilihan pelarut didasarkan atas standar yang sudah ditetapkan, yaitu zat aktif tertentu hanya dapat ditarik keluar oleh pelarut tertentu pula. Pada proses ekstraksi ini pelarut yang digunakan adalah heksan. Perolehan ekstrak dari berbagai metode elisitasi disajikan pada tabel 5 di bawah ini.

Tabel 5. Hasil ekstraksi serbuk kalus *Dumortiera hirsuta* dari berbagai metode elisitasi

No	Elisitasi	Berat Serbuk (mg)	Berat Ekstrak (mg)
1	Abiotik	3662,8	33,5
2	Biotik	8111,8	35,5
3	Abiotik dan biotik	11131,2	48,3

### 5.7 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi adalah prosedur pemisahan yang paling baik untuk memisahkan senyawa yang ada di dalam ekstrak kalus *Dumortiera hirsuta*, karena dalam proses ini tidak melibatkan pH dan suhu ekstrem, maupun asam dan basa kuat yang dapat merusak struktur maupun fungsi biologi dari sampel. Pada proses kromatografi melibatkan tiga macam komponen yaitu fase diam, fase gerak dan senyawa yang dipisahkan.

Pada proses kromatografi ini, digunakan kromatografi lapis tipis. Menurut Adnan (1997) KLT merupakan metode pemisahan fisiko-kimiawi dengan lapisan yang terdiri atas butiran halus atau fase diam yang dilapiskan merata pada lempeng atau penyangga yang cocok. Fungsinya antara lain untuk memisahkan berbagai senyawa seperti ion-ion anorganik, kompleks senyawa-senyawa organik dengan anorganik dan senyawa-senyawa organik baik yang terdapat di alam dan senyawa-senyawa organik sintetik.

KLT mempunyai beberapa kelebihan yaitu waktu perambatan lebih pendek, spot atau nodanya kompak, sehingga memungkinkan untuk pemisahan suatu senyawa yang konsentrasinya kecil yang tidak mungkin tampak dengan cara kromatografi kertas,

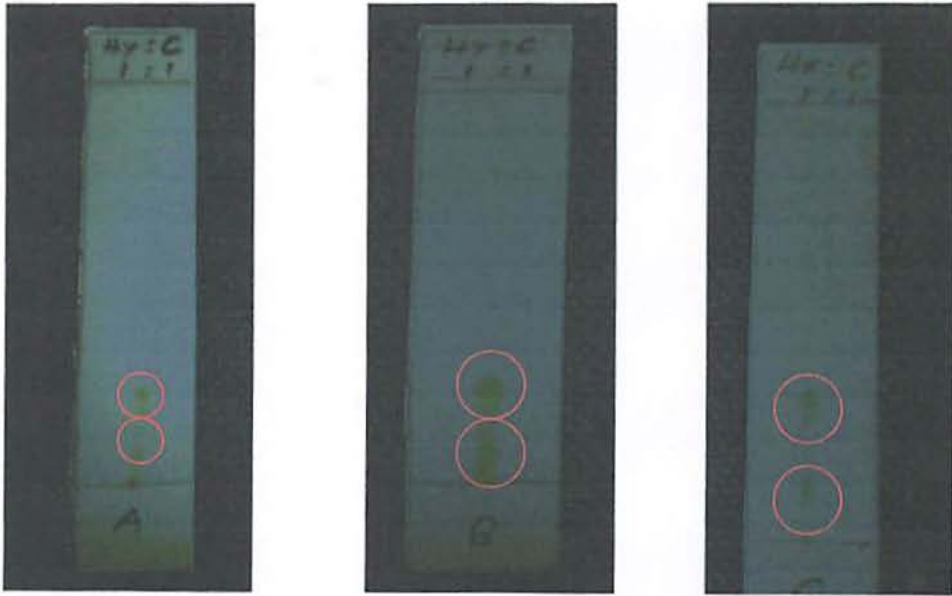
pemisahan lebih tajam. Sudaryo (2001) menyatakan bahwa KLT memiliki keuntungan yang memberikan pemisahan yang baik, waktu analisa cepat, bahan kimia sedikit, penanganan lebih cepat dan untuk keperluan yang luas dalam pemisahan-pemisahan.

Dalam proses KLT ini, fasa diam yang digunakan adalah silika gel. Menurut Sastrohamidjojo (2001), silika gel digunakan untuk memisahkan asam-asam amino, alkaloid, gula, asam-asam lemak, lipid, minyak, anion dan kation organik, sterol dan terpenoid. Fase gerak adalah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut/ solven/eluen. Karena ekstrak yang diperoleh adalah ekstrak heksan (mengandung senyawa non polar) maka eluen yang dibuat adalah eluen yang cenderung non polar, yaitu heksan: kloroform = 1:1 dan heksan: etil asetat = 8:2.

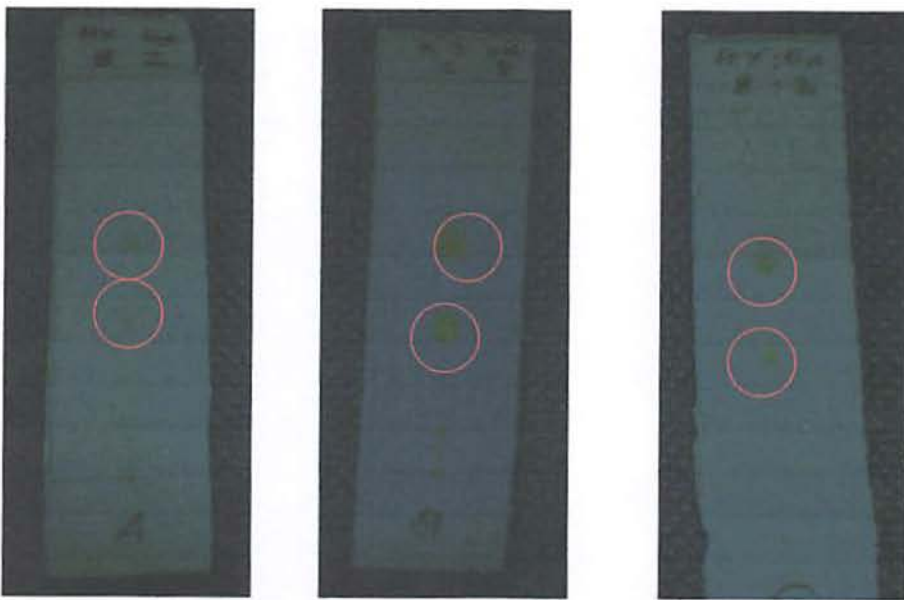
Setelah ekstrak dipisahkan dengan KLT, akan diperoleh noda yang berbeda antara eluen heksan-kloroform dan heksan-etil asetat. Jumlah noda yang dihasilkan mempunyai nilai Rf yang berbeda-beda, seperti yang terdapat pada tabel 6 dan gambar 12 dan 13 di bawah ini.

Tabel 6. Nilai Rf ekstrak dari berbagai metode elisitasi dan berbagai eluen

Jenis Ekstrak	Heksan:Kloroform	Heksan:Etil asetat
Ekstrak A (1)	$5,6 \times 10^{-2}$	$3,89 \times 10^{-1}$
Ekstrak A (2)	$2,2 \times 10^{-1}$	$5,42 \times 10^{-1}$
Ekstrak B (1)	$6,94 \times 10^{-2}$	$3,47 \times 10^{-1}$
Ekstrak B (2)	$2,36 \times 10^{-1}$	$5,56 \times 10^{-1}$
Ekstrak C (1)	$1,1 \times 10^{-1}$	$3,89 \times 10^{-1}$
Ekstrak C (2)	$3,19 \times 10^{-1}$	$5,97 \times 10^{-1}$



Gambar 12. Hasil kromatografi ekstrak dari berbagai metode elisitasi dengan fasa fase gerak heksan: kloroform (1:1)



Gambar 13. Hasil kromatografi ekstrak dari berbagai metode elisitasi dengan fasa fase gerak heksan: etil asetat (8:2)

Berdasarkan kromatogram terlihat bahwa pada fraksi heksan : kloroform dan heksan : etil asetat tampak adanya dua noda, hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak A



Gambar 12. Hasil komposisi warna dan kontras pada tingkat keabstrakan rendah (1)



Gambar 13. Hasil komposisi warna dan kontras pada tingkat keabstrakan sedang (5)

Perbedaan komposisi warna dan kontras pada tingkat keabstrakan rendah dan sedang dapat dilihat pada Gambar 12 dan Gambar 13. Pada tingkat keabstrakan rendah, komposisi warna dan kontras pada tingkat keabstrakan rendah dan sedang dapat dilihat pada Gambar 12 dan Gambar 13.

tersebut terdiri atas dua senyawa atau dua komponen utama. Demikian pula yang terjadi pada ekstrak B dan ekstrak C.

### 5.8 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif

Untuk menentukan golongan senyawa yang ada didalam masing-masing ekstrak dari berbagai metode elisitasi, dilakukan skrining fitokimia. Skrining fitokimia dilakukan dengan uji warna. Untuk pengujian warna digunakan pereaksi Liebermann Burchard.

Ekstrak yang diperoleh diambil sedikit dan dikeringkan di atas spot tes, ditambahkan tiga tetes anhidrida asetat dan kemudian satu tetes asam sulfat pekat. Adanya senyawa golongan terpenoid akan ditandai dengan timbulnya warna merah, sedangkan senyawa golongan steroid ditandai dengan munculnya warna biru. Hasil identifikasi golongan senyawa aktif disajikan pada tabel 7 di bawah ini.

Tabel 7. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Kalus *Dumortiera hirsuta* dari Berbagai Metode Elisitasi

Jenis EKstrak	Golongan Senyawa	
	Steroid	Terpenoid
Ekstrak A	+	-
Ekstrak B	+	-
Ekstrak C	-	+

Berdasarkan data-data pada hasil uji KLT dan skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak A dan ekstrak B mengandung dua senyawa, dan dua senyawa tersebut termasuk golongan steroid berdasarkan hasil skrining dengan pereaksi Liebermann Burchard dengan warna biru. Sedangkan pada ekstrak C juga mengandung dua senyawa dan dua senyawa tersebut termasuk golongan terpenoid berdasarkan hasil skrining dengan pereaksi Liebermann Burchard yang memberikan warna merah.



### 5.9 Uji Aktivitas Antimikroba

Tabel 8. Diameter Daerah Penghambatan Pertumbuhan Mikroba oleh Ketiga Jenis Ekstrak dengan Berbagai Metode Elisitasi

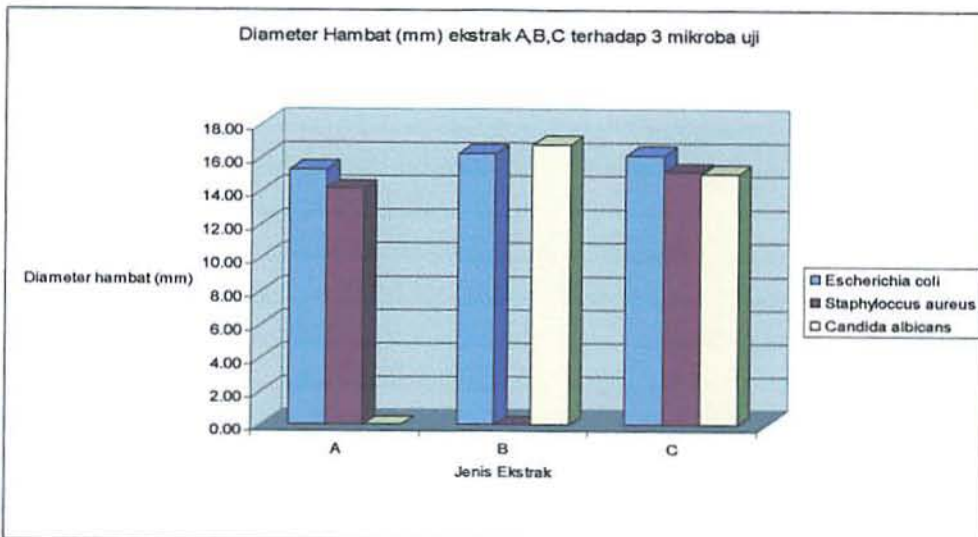
Jenis Ekstrak	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
A	15.7	13.97	0
	15.25	13.95	0
	14.85	14.52	0
Rata-rata	15.27	14.15	0.00
B	15.92	0	17.22
	16.6	0	17.65
	16.2	0	15.5
Rata-rata	16.24	0	16.79
C	15.65	14.7	14.92
	16.43	15.65	14.73
	16.48	15.12	15.53
Rata-rata	16.19	15.16	15.06

Keterangan:

A = elisitasi dengan elisitor abiotik

B = elisitasi dengan elisitor biotik

C = elisitasi dengan elisitor abiotik dan biotik



Gambar 11. Diagram batang diameter penghambatan mikroba oleh ketiga jenis ekstrak dengan berbagai metode elisitasi

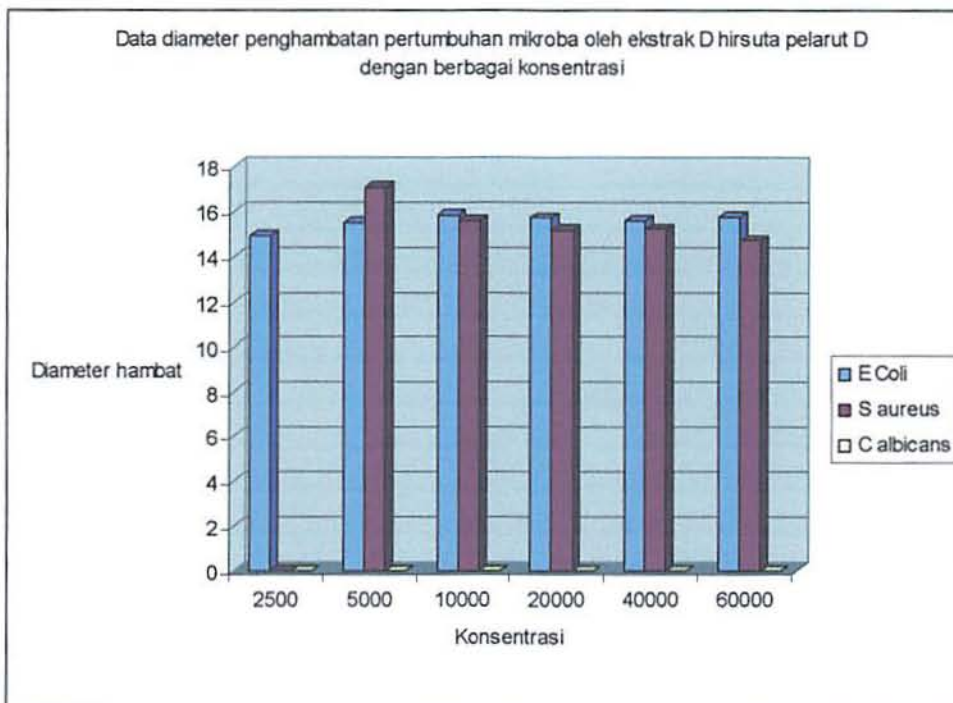


Tabel 9. Tipe Penghambatan Mikroba oleh Ketiga Jenis Ekstrak Dengan Berbagai Metode Elisitasi pada 80.000 ppm

Jenis Ekstrak	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Ekstrak A	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Ekstrak B	$\alpha$	$\gamma$	$\alpha$
Ekstrak C	$\alpha$	$\beta$	$\beta$

Tabel 10. Diameter Penghambatan Mikroba oleh Ekstrak C pada Berbagai Konsentrasi

Mikroba	Ulangan	2500	5000	10000	20000	40000	60000
<i>E. coli</i>	1	14.77	15.1	15.8	16.1	15.1	15.6
	2	15.5	15.6	15.9	15.7	15.9	15.8
	3	14.4	15.8	15.7	15.3	15.8	15.8
	Rerata	14.89	15.5	15.8	15.7	15.6	15.73
<i>S. aureus</i>	1	0	16.3	15.85	ND	ND	14.5
	2	0	20.07	15	ND	ND	14.9
	3	0	14.98	15.77	15.15	15.2	ND
	Rerata	0	17.12	15.54	15.15	15.20	14.70
<i>C. albicans</i>	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
	Rerata	0	0	0	0	0	0

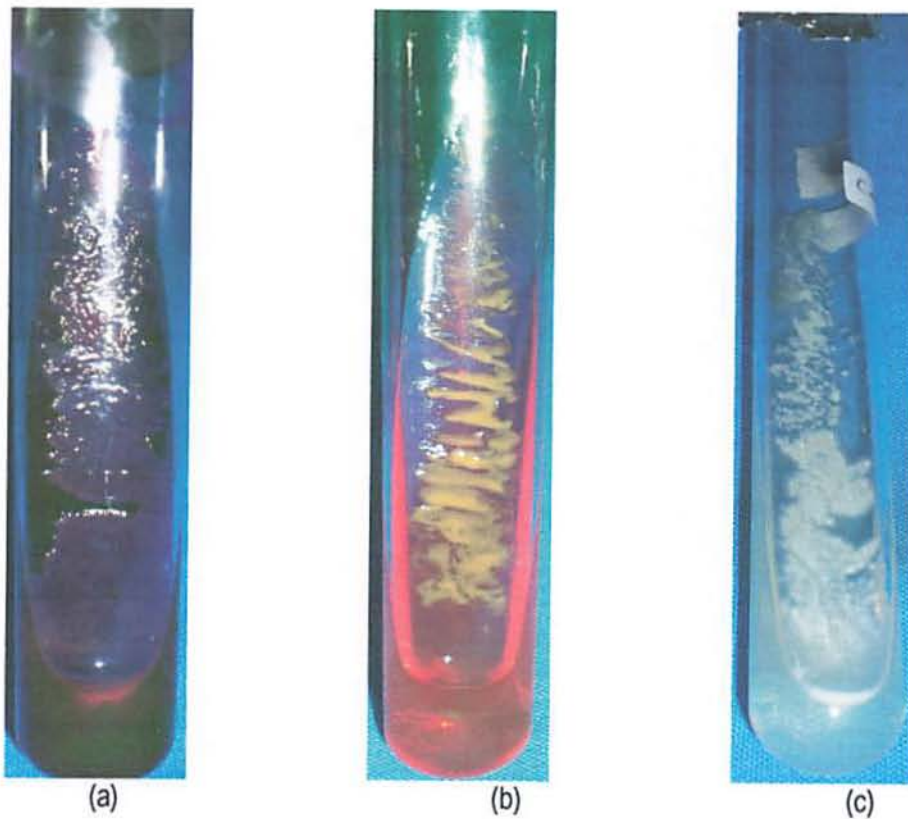


Gambar 12. Diagram batang diameter penghambatan mikroba oleh ekstrak C pada berbagai konsentrasi

Tabel 11. Tipe Penghambatan Mikroba oleh Ekstrak C pada Berbagai Konsentrasi (ppm)

Mikroba	2500	5000	10000	20000	40000	60000
<i>E. coli</i>	β	β	β	β	β	β
<i>S. aureus</i>	β	β	β	β	β	β
<i>C. albicans</i>	γ	γ	γ	γ	γ	γ

Pada uji aktivitas antimikroba ini digunakan tiga macam mikroba uji yaitu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*. Ketiga macam mikroba tersebut diharapkan dapat mewakili tiga kelompok mikroba yaitu bakteri Gram negatif, bakteri Gram positif dan yeast. Selain itu dibandingkan dengan bakteri dan fungi lain, mikroba tersebut lebih sering menyebabkan penyakit pada manusia.



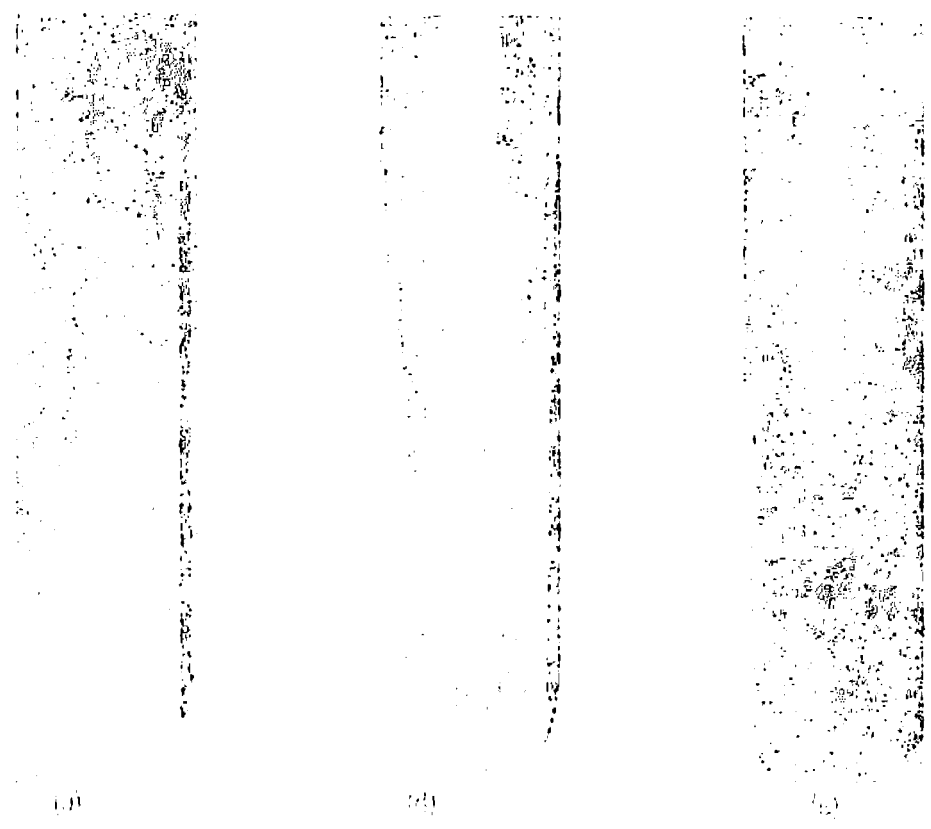
Gambar 13. Mikroba uji (a) *E. Coli*, (b) *S. Aureus*, (c) *C. albicans*

Tiga macam ekstrak yaitu ekstrak A (kalus dengan elisitor abiotik), ekstrak B (kalus dengan elisitor biotik) dan ekstrak C (kalus dengan elisitor abiotik dan biotik) digunakan untuk uji aktivitas antimikroba dalam penelitian ini. Hasil uji aktivitas antimikroba

Tabel 1.1. Karakteristik umum dari spesies ikan yang diteliti

No	Nama Spesies	Ordo	Familia	Genus	Spesies
1	ikan mas	Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Cyprinus</i>	<i>Cyprinus carpio</i>
2	ikan bawal	Cypriniformes	Cyprinidae	<i>Mystus</i>	<i>Mystus siamensis</i>
3	ikan gurami	Poeyaceae	Poeyaceae	<i>Oryzias</i>	<i>Oryzias latipes</i>

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan ikan mas, ikan bawal, dan ikan gurami. Penelitian ini dilakukan di laboratorium akuakultur Universitas Indonesia. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode percobaan. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode percobaan. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode percobaan.



Gambar 1.1. Karakteristik umum dari spesies ikan yang diteliti (a) ikan mas, (b) ikan bawal, (c) ikan gurami

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan ikan mas, ikan bawal, dan ikan gurami. Penelitian ini dilakukan di laboratorium akuakultur Universitas Indonesia. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode percobaan. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode percobaan.

ketiga ekstrak tersebut terhadap ketiga mikroba uji disajikan pada tabel 8, sedangkan tipe penghambatan mikroba disajikan pada tabel 9.

Ketiga jenis ekstrak tersebut diujikan pada konsentrasi 80.000 ppm. Pemilihan konsentrasi 80.000 ppm merupakan konsentrasi tertinggi yang bertujuan untuk melakukan penapisan mana diantara ketiga jenis ekstrak tersebut yang mempunyai aktivitas antimikroba tertinggi. Hal ini merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Ilhan *et al* (2006) bahwa aktivitas antimikroba dari ekstrak aseton dan metanol *Palustriella commutata* diujikan pada konsentrasi 80.000 ppm. Tahapan ini nantinya akan dipakai untuk mengetahui kemampuan penghambatan yang tinggi dengan konsentrasi yang telah ditentukan.

Berdasarkan data hasil penelitian (tabel 8 dan gambar 11) menunjukkan bahwa ketiga jenis ekstrak mempunyai kemampuan penghambatan yang berbeda-beda terhadap mikroba uji. Aktivitas penghambatan terbesar terdapat pada *E. Coli* (ekstrak B), *S. aureus* (ekstrak C), dan *Candida albicans* (ekstrak B). Hal ini menunjukkan bahwa ketiga jenis ekstrak dengan berbagai metode elisitasi berdampak pada kualitas dan kuantitas bahan aktif yang dihasilkan, sehingga dapat dikatakan bahwa ketiga jenis elisitor mempengaruhi penghambatan mikroba uji.

Perbedaan kemampuan aktivitas antimikroba juga dipengaruhi oleh (1) jenis senyawa aktif yang ada pada masing-masing ekstrak, (2) konsentrasi senyawa aktif antimikroba dalam 80.000 ppm pada masing-masing ekstrak, (3) kemampuan difusi dari senyawa aktif antimikroba pada medium agar, (4) jenis mikroba uji yang digunakan, (5) mekanisme penghambatan pertumbuhan mikroba dari senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak, (6) sensitivitas ketahanan mikroba uji terhadap serangan antimikroba.

Tipe penghambatan mikroba dari ekstrak yang diujikan bervariasi, dari tipe  $\alpha$  (halo yang terbentuk samar),  $\beta$  (halo yang terbentuk jernih), dan  $\gamma$  (tidak terbentuk halo). Perbedaan tersebut terkait dengan mekanisme penghambatan dari senyawa aktif antimikroba yang ada dalam ekstrak.

Menurut Namdeo (2007) sel-sel tanaman menunjukkan respon fisiologi dan morfologi terhadap mikroba, faktor-faktor fisik dan kimia yang dikenal sebagai elisitor. Elisitasi adalah proses menginduksi atau penambahan sintesis metabolit sekunder oleh tanaman untuk menjamin kelangsungan hidup dan daya saing suatu tanaman. Elisitor terdiri atas abiotik dan biotik atau berdasarkan asalnya terdiri atas elisitor eksogen dan

endogen. Elisitor abiotik adalah substansi yang berasal dari non biologi, misalnya ion Cu, Cd, Ca dan pH tinggi. Elisitor biotik adalah substansi yang berasal dari makhluk hidup, meliputi polisakarida yang berasal dari dinding sel tanaman (protein atau selulosa) dan mikroorganisme (kitin atau glukan, protein gliserol atau G protein atau protein interseuler). Elisitor eksogen adalah zat yang dihasilkan dari luar sel, misalnya polisakarida, poliamin, dan asam lemak. Sedangkan elisitor endogen adalah zat yang dihasilkan dari dalam sel.

Pada penelitian ini, elisitor yang digunakan adalah KNO<sub>3</sub> dan ekstrak yeast. Bagaimana mekanisme elisitor tersebut dalam mempengaruhi penghambatan mikroba uji, dipengaruhi oleh jenis senyawa aktif yang terkandung dalam masing-masing ekstrak yang diujikan. Berdasarkan hasil skrining identifikasi golongan senyawa aktif menunjukkan bahwa ekstrak A dan B mengandung steroid, sedangkan ekstrak C mengandung terpenoid. Beberapa pustaka menunjukkan bahwa golongan senyawa steroid dan terpenoid mempunyai aktivitas sebagai antimikroba. Subhisha dan Subramoniam (2005) melaporkan bahwa sterid dari *Pallavicinia lyelli* mempunyai aktivitas antifungi terhadap *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, dan *Candida albicans*. Peoloengan (2006) melaporkan steroid dari *Pittosporium ferrugineum* mempunyai aktivitas antibakteri. Sterid dan terpenoid dari tanaman *Plumeria rubra* dan *Eucalyptus globules* mempunyai aktivitas antimikroba (Egwaikhide *et al.*, 2007) Steroid dan terpenoid tanaman *Plectranthus glandulosus* mempunyai aktivitas antimikroba (Egwaikhide dan Gimba, 2007). Steroid dan triterpen dari *Jatropha podagrica* mempunyai aktivitas antimikroba (Bhaskarwar *et al.*, 2008). Steroid dari *Cassia nigracans* mempunyai aktivitas antimikroba (Ayo *et al.*, 2009).

Benigna *et al.*, (2002) melaporkan bahwa telah diteliti aktivitas antimikroba dari terpenoid tanaman *Copaivera paupera*. Islam *et al* (2003) melaporkan senyawa terpenoid tanaman *Caesalpinia pulcherrima* berpotensi sebagai antibakteri terhadap *Bacillus cereus* dan *Shigella dysenteriae*. Jasmin *et al* (2007) menyatakan bahwa terpenoid dari tanaman *Elephantopus scaber* mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Acinobacter baumannii*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*. Mathabe *et al* (2007) menyatakan bahwa terpenoid yang diisolasi dari tanaman *Spirotachys africana* mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* dan *Shigella dysenteriae*.

Sedangkan Gunawan *et al* (2008) telah mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa terpenoid yang aktif antibakteri pada herba meniran (*Phyllanthus niruri*). Rajasrkan *et al* (2009) melaporkan bahwa terpenoid dari tanaman *Rhinacanthus nasutus* mempunyai aktivitas antibakteri dan antifungi. Lenny (2006) menyatakan bahwa senyawa metabolit sekunder seperti terpenoid dan steroid merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai bioaktivitas dan berfungsi sebagai pelindung tumbuhan tersebut dari gangguan hama penyakit atau lingkungan sekitarnya.

Berdasarkan penelusuran literatur mekanisme elisitor  $KNO_3$  dan ekstrak yeast memacu pembentukan bahan aktif belum bisa diungkapkan dengan jelas. Menurut Eilert (1987) senyawa aktif yang bersifat antibiotik yaitu metabolit sekunder yang ditimbun oleh tanaman sebagai jawaban atas serangan mikroba disebut fitoaleksin. Penimbunan dalam tumbuhan ini mengakibatkan tumbuhan tahan terhadap senyawa kimia yang berasal dari mikroba yang bersangkutan. Hal ini merupakan sistem pertahanan tanaman terhadap mikroba tersebut dan telah ditunjukkan pada beberapa varietas dari berbagai jenis tanaman tertentu. Bila dipelajari lebih lanjut, pengimbasan penimbunan fitoaleksin karena adanya senyawa yang berasal dari patogen merupakan sebab timbulnya jawaban yang serupa dalam tanaman seperti pada patogen tanaman itu sendiri. Senyawa tersebut dinamakan elisitor, sedangkan senyawa yang dikeluarkan oleh mikroba disebut elisitor biotik. Berdasarkan penelitian yang dilakukan selama ini ada empat jenis interaksi dan pengenalan tumbuhan terhadap elisitor yaitu (1) pembebasan secara langsung elisitor oleh mikroba dan pengenalan oleh tumbuhan, (2) enzim mikroba membebaskan komponen dinding sel tanaman, (3) enzim tumbuhan membebaskan komponen dinding sel mikroba, dan (4) senyawa elisitor yang bersifat endogen.

Telah disebutkan bahwa berdasarkan hasil skrining ekstrak kalus *Dumortiera hirsuta* mengandung golongan senyawa yang berupa steroid dan terpenoid. Mekanisme penghambatan steroid dan terpenoid dalam penelitian ini belum terungkap dengan jelas, namun berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Subhisa dan Subramoniam (2005) menyebutkan bahwa senyawa aktif yang berperan sebagai antifungi dari ekstrak lumut hati *Pallavicinia lyelli* adalah steroid yang lipofilik yang bekerja secara intraseluler. Di samping itu seperti agen antimikroba lainnya, mekanisme penghambatan steroid terjadi dengan cara menghalangi proses germinasi spora. Daisy *et al* (2008) melaporkan adanya aktivitas antimikroba dari *Elephantopus scaber*, di mana mekanisme antimikroba dari

komponennya yaitu 1,8 cineole, terpinen-4-ol dan terpinol terhadap *Staphylococcus aureus* yaitu dengan merusak membran dan menyebabkan sel secara keseluruhan mengalami lisis.

Difusi cakram merupakan salah satu metode untuk mengetahui aktivitas antimikroba secara *in vitro*. Selain dapat digunakan untuk mengukur daya hambat suatu senyawa uji terhadap mikroba patogen, uji difusi dapat pula digunakan untuk memperkirakan adanya nilai MIC. Berdasarkan hasil uji difusi, menunjukkan bahwa nilai MIC untuk *E. Coli* diperkirakan kurang dari 2500 ppm. Sedangkan untuk *Staphylococcus aureus* dan *C. albicans* antara 2500 ppm sampai 5000 ppm.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa

1. Metode sterilisasi untuk mendapatkan eksplan steril adalah dengan menggunakan sublimat dan sodium hipoklorit dengan konsentrasi rendah
2. Formulasi media yang sesuai untuk induksi dan perbanyakan kalus adalah medium MS dengan zat pengatur tumbuh 2,4 D 1 mg/l.
3. Ketiga jenis elisitor yaitu abiotik, biotik, abiotik dan biotik dapat memacu terbentuknya senyawa aktif antimikroba
4. Golongan senyawa aktif antimikroba yang terdapat dalam kalus lumut hati *Dumortiera hirsuta* adalah steroid (ekstrak A dan B) serta terpenoid (ekstrak C).
5. Ekstrak kalus lumut hati *Dumortiera hirsuta* dari berbagai metode elisitasi mempunyai aktivitas antimikroba yang berbeda-beda tergantung pada jenis mikroba yang diujikan.

#### 6.2 SARAN

1. Dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan berbagai macam medium dan zat pengatur tumbuh dengan berbagai konsentrasi untuk mendapatkan kalus yang baik.
2. Dilakukan elisitasi dengan berbagai jenis elisitor
3. Isolasi dan pemurnian senyawa aktif antimikroba yang ada pada ekstrak kalus dari berbagai metode elisitasi
4. Ekstraksi dan uji aktivitas antimikroba terhadap mikroba patogen yang lain yang belum dilakukan pada penelitian ini
5. Dilakukan pengkajian mekanisme elisitor dalam pemacuan bahan aktif
6. Mengungkap mekanisme penghambatan senyawa antimikroba lumut terhadap mikroba patogen



## DAFTAR PUSTAKA

- Ayo RG, Amupitan JO, Oyewale AO. 2009. Isolation, Characterisation and Antimicrobial Activity Of a Steroidal Ester From of Leaves of *Cassia nigricans*. *Research Journal of Medical Plant* 3 (2):69-74
- Abu Shahab B, Adwan G, Abu Safiya D *et al.*, 2004. Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Utilized in Populer Medicine in Palestine. *Turk J. Biol* 28: 99-1.
- Bailey W.R. dan Scott, E.G. 1994. *Diagnostic Microbiology*, 4 edition. The CV Mosby Company, Saint Louis.p: 168-187.
- Basile A, Vuotto, M.L, dan Lelpo, M.T. 1998. Antibacterial Activity In *Rhynchostegium riparioides*. *Phytoter. Res.* 12: 146-148.
- Basile A, Giordono, S, Lopez. 1999. Antibacterial Activity of Pure Flavonoids Isolated from Mosses. *Phytochemistry.* 52: 1479-1482.
- Bastari YF. 2008. Pengaruh Pemberian Ekstrak Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) Terhadap Metabolit Sekunder Pada Kultur Kalus Sambiloto (*Andrographis paniculata*). Farmasi-UNAIR
- Benigna TM, Jimenez IA, Bazzocchi IL. 2002. Antimicrobial Terpenoids From The Oleorosin of the Peruvian Medical Plant *Copaivera paupera*. *Planta Medica* Vol 68 No 9.pp 808-812
- Bhaskawar B, Itankar P, Fulke A. 2008. Evaluation of antimicrobial activity of medical plants *Jatropha podagrica*. *Roumannian Biotechnological Letters* Vol 13. No 5, pp 3873-3877
- Bonjar, G.H.S., Fooladi, M.H., Mahdavi, M.J., dan Shahgahsi, A. 2004. Broad-Spectrum, A Novel Antibacterial from *Streptomyces sp.* *Biotechnol.* Vol 3.Issue.p: 126-130
- Daisy P, Mathew S, Suveena S, Rayan NA. 2008. A Novel Terpenoid from *Elephantopus Scaber* Antibacterial Activity on *Staphylococcus aureus*: A substantiate Computational Approach. *International Journal of Biomedical Science.* Vol 4 No 3
- Egwakhide PA., Okeniyi SO., Gimba CE. 2007. Screening For Anti-Microbial and Phytochemical Constituents of Some Nigerian Medical Plants. *Biological Research* 1 (5-6):155-158): 135-138
- Egwakhide PA and Gimba CE. 2007. Analysis of the Phytochemical Content of *Plectranthus glandulosis* Whole Plant. *Middle East Journal of Scientific Research* 2 (3-4

- Evans DE, Coleman JOD and Kearns A. 2003. **Plant Cell Culture**. Bios Scientific Publishers. New York
- Gritter, R.J., Bobbit, J.M., Schwarting, A.F., 1991, **Pengantar Kromatografi**, Terbitan ke-2, ITB, Bandung
- Gunawan IW, Gede Bawa IGA, Sutrisnayani NI. 2008. **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid Yang Aktif Antibakteri Pada Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn)**. *Jurnal Kimia* 2 (1).
- Haba E, Pinazo, A, Jauregui, O. dan Espuny, M.I. 2002. **Physicochemical Characterization and Antimicrobial Properties of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa*** . Willey Periodicals Inc, Spain. [http://www.google.com/toxicity assay of \*Pseudomonas\*](http://www.google.com/toxicity%20assay%20of%20Pseudomonas).
- Harborne, J.B., (diterjemahkan oleh K. Padmawinata dan Iwoeng Soediro), 1987, **Metode Fitokimia, Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan**, Terbitan kedua, ITB, Bandung
- Ihan S, Savarosgku, Colar F. 2006. **Antimicrobial Activity of *Palustriella commutata* (Hedw) Ochyra Extracts (Bryophyta)**. *Turk J Biol* 30: 1-3.
- Indrianto A. 2003. **Bahan Ajar Kultur Jaringan Tumbuhan**. Fakultas Biologi. UGM. Yogyakarta.
- Islam AKM, Ali MA, Sayeed A, Salam SMA. 2003. **An antimicrobial Terpenoid From *Caesalpinia pulcherrima* Swartz Its Characterization, Antimicrobial and Cytotoxic Activities**. *Asian Journal of Plant Sciences* 2 (17-24):1162-1165
- Jasmine r, Daisy P Selvakumar BN. 2007. **A Novel Terpenoid scaber with Antibacterial Activity Against Beta lactamase Producing Clinical Isolates**. *Research Journal of Microbiology* 2(10):770-775
- Junairiah, Fatimah, dan Ni'matuzahroh. 2007. **Eksplorasi dan Uji Aktivitas Ekstrak Bryophyta (Tumbuhan Lumut) Sebagai Bahan Antimikroba**. Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Universitas Airlangga. Surabaya
- Lestari EG. 2008. **Kultur Jaringan**. Penerbit Akademia. Bogor
- Madigan M, Matinko J.M. dan Parker J. 2003. **Brock Biology of Microorganism**. 9 edition. Southern.
- Markham K.M. 1988. **Cara Mengidentifikasi Flavonoid**. Penerbit ITB. Bandung.city of Terpenoids Isolated from *Spirotachys africana*. Department of Botany, University of Limpopo

- Mathabe MC, Hussein AA, Roumiana V. 2007. **Antibacterial Activities and Cytotoxicity of Terpenoids Isolated from *Splrotachys africana***. Department of Botany. University of Limpopo
- Muspiah A. 2002. **Pengaruh Penambahan Ekstrak Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) Pada Produksi Ajmalisin Dari Kultur Agregat Sel Dalam Bioreaktor**. ITB
- Pieri, RLM. 1987. **In Vitro Culture of Higher Plants**. Martinus Nijhoff Publisher. USA
- Pelczar M.J. dan Chan E.C.S. 1988. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Poeloengan M., Chairul, Komala I., Salmah S, Susan MN.,2006. **Aktivitas Antimikroba Dan Fitokimia Dari Beberapa Tanaman Obat**. Seminar Nasional Teknologi dan Veteriner
- Qu, J., Xie, C., Guo, H., Yu, W., dan Lou, H. 2006. **Antifungal Dibenzofuran Bis (Bibenzyl)s from The Liverwort *Asterella angusta***. *Phytochemistry*. Volume 68. Issue 13. p: 1767-1774.
- Rahayu DS. 2008. **Peningkatan Kandungan Produksi Artemisinin Dalam Kultur Suspensi Sel *Artemisia annua* L. Melalui Elicitasi Dengan Ekstrak Ragi**. Farmasi-UNAIR
- Rajasekaran A, Sundarandavalli S, Marugesan S. 2009. **Antibacterial and Antifungal Evaluation of The Leaves of *Rhinacanthus nastus* Linn**. *International Journal of Chem Tech Research*. Vol 1, No 3, pp 574-576
- Saxena D.K. and Harinder. 2004. **Uses of Bryophyta**. Department of Botany Bareilly Collage. India
- Salvat A, Antonacci L, Fortunato R.H. 2004. **Antimicrobial Activity in methanolic extracts of several Plant species from northern Argentina**. *Phytomedicine* 11: 230-234.
- Salisbury FB and Ross CW. 1992. **Fisiologi Tumbuhan**. ITB. Bandung
- Saritas Y, Sonwa M.M., Iznaguen H. 2001. **Volatile Constituen Mosses (Musci)**. *Phytochemistry* 57: 443.
- Scher, J.M, Zapp, J., Schmidt, A., dan Becker, H. 2003. **Bazzanin L-R, Chlorinated Macrocyclic Bisbibenzyls from The Liverwort *Lepidozia incurvata***. *Phytochemistry*. Volume 64. Issue 3. p: 791-796.
- Schinor, E.C., Salvador, M.J., Ito, I.Y., and Dias, D.A. 2007. **Evaluation of The Antimicrobial of Crude Extracts and Isolated Constituens from *Chresta scapigera***. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vo. 38. p: 145-149

- Sitinjak, RR. 1999. Pengaruh Pemberian Ekstrak Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) Terhadap Kandungan Gossipol Pada Kultur Kalus *Gossypium hirsutum* L. ITB
- Stern. 2003. *Introductory Plant Biology*. Mc Graw Hill Companies.
- Subhisha, S. and Subramoniam A. 2005. Antifungal Activities of A Steroid from *Pallavicinia lyellii*, A Liverwort. *Indian Journal of Pharmacology*. Vol. 37. Num. 5. p: 304-308
- Sudirga, SK. 2002. Peningkatan Kandungan Azadirachtin Dalam Kultur Suspensi Sel *Azadirachta Indica* A Juss Melalui Elisitasi Dengan Ekstrak Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*). ITB
- Sujadmiko, H. 1999. *Bryologi*. UGM. Yogyakarta.
- Tjitrosoepomo G. 2005. *Taksonomi Tumbuhan Spermatophyta*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Tjondronegoro P.D. 1989. *Botani Umum II*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. DIKTI. PAU-IPB Bogor.
- Wattimena, GA. 1988. *Zat Pengatur Tumbuh*. PAU. IPB. Bogor
- Wistreich G.A. 2003. *Microbiology Laboratory Fundamentals and Applications*. Pearson Education Inc. Los Angeles.
- Xiao jian-Bo, RenFeng-Liand dan Ming Xu. 2005. Antihepatitis B. Virus Activity of Flavonoids from *Marchantia convoluta*. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*.
- Yudianto SA. 1992. *Pengantar Cryptogamae*. Penerbit Tarsito. Bandung.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan*. Agromedia Pustaka. Jakarta



