

SKRIPSI

AKTIVITAS ANTIMIKROBA JAMUR ENDOFIT *Penicillium oxalicum* DARI SPONS GENUS *Homaxinella*



NI PUTU DIAH PARWITA SARI
051211133026

FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN FARMAKOGNOSI DAN FITOKIMIA
SURABAYA
2016

ADLN-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

SKRIPSI

AKTIVITAS ANTIMIKROBA JAMUR ENDOFIT *Penicillium oxalicum* DARI SPONS GENUS *Homaxinella*

NI PUTU DIAH PARWITA SARI
051211133026

FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN FARMAKOLOGI DAN FITOKIMIA
SURABAYA
2016

**LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/karya ilmiah saya, dengan judul:

AKTIVITAS ANTIMIKROBA JAMUR ENDOFIT

Penicillium oxalicum* DARI SPONS GENUS *Homaxinella

untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau media lain yaitu Digital Library Perpustakaan Universitas Airlangga untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, September 2016



Ni Putu Diah Parwita Sari

NIM. 051211133026

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Ni Putu Diah Parwita Sari

NIM : 051211133026

Fakultas : Farmasi

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir yang saya tulis dengan judul :

AKTIVITAS ANTIMIKROBA JAMUR ENDOFIT

Penicillium oxalicum* DARI SPONS GENUS *Homaxinella

adalah benar-benar merupakan karya saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa skripsi ini merupakan hasil plagiarisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, September 2016



Ni Putu Diah Parwita Sari

NIM. 051211133026



KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur senantiasa terpanjatkan kehadirat Ida Sang Hyang Widhi Wasa, atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga skripsi yang berjudul **“AKTIVITAS ANTIMIKROBA JAMUR ENDOFIT *Penicillium Oxalicum* DARI SPONS GENUS *Homoxinella*”** dapat terselesaikan sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Dr. Umi Athiyah, Apt.,M.S. atas kesempatan dan segala fasilitas yang diberikan selama menempuh pendidikan program Sarjana.
2. Prof. Dr. rer. nat. Gunawan Indrayanto, Apt selaku pembimbing utama, atas kesabaran, waktu, bimbingan, dan motivasi yang besar kepada penulis dalam menyusun dan menyelesaikan skripsi.
3. Suciati,S.Si.,M.Phil., Ph.D selaku pembimbing serta, atas kesabaran, waktu, bimbingan, dan motivasi yang besar kepada penulis dalam menyusun dan menyelesaikan skripsi.
4. Dr. Aty Widyawaruyanti, Apt.,M.Si dan Rice Disi Oktarina, S.Farm., Apt. selaku penguji, atas saran yang bermanfaat dalam menyusun naskah skripsi ini.
5. Dr. Aty Widyawaruyanti, Apt.,M.Si selaku Ketua Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Universitas Airlangga yang telah memberikan izin penggunaan fasilitas selama penelitian.
6. Ibu Prof. Dr. Hj. Noor Erma S. Apt., M.S. selaku Penanggung Jawab Ruang Praktikum Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan izin penggunaan fasilitas selama penelitian.

7. Setyo Prihantiningtyas, S.Farm., M.Sc. selaku dosen wali, atas bimbingan, saran, dan nasihatnya selama menjalani studi di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
8. Seluruh karyawan Departemen Farmakognosi dan Fitokimia serta bapak Subakir atas bantuan, waktu, dan tenaga selama penyelesaian skripsi.
9. Kedua orang tua, Bapak Drs. I Gede Ketut Partana dan Ibu Ni Putu Suliasih serta adik tercinta dan seluruh keluarga yang telah memberikan doa, dukungan dan seluruh perhatian kepada saya.
10. Sahabat-sahabat saya, Unikmah Wulan N A, Fatimatus Zuhro, Larisa Winu A, Indira Dhany K M, dan teman-teman saya yang lain yang tidak bisa saya sebutkan satu per satu yang selalu memberi saya semangat dan dorongan untuk segera menyelesaikan penelitian ini.
11. Teman-teman satu angkatan 2012 Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan teman-teman kelas B yang telah menemani selama ini.
12. Serta seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu hingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dari penelitian ini, oleh karena itu setiap upaya pengembangan hasil penelitian ini akan diterima dengan senang hati.

Semoga Ida Sang Hyang Widhi Wasa senantiasa memberikan rahmat dengan karunia-Nya. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan di masa kini dan yang akan datang

Surabaya, September 2016

Penulis

RINGKASAN

Aktivitas Antimikroba Jamur Endofit *Penicillium Oxalicum* Dari Spons Genus *Homaxinella*.

Ni Putu Diah Parwita Sari

Endofit adalah mikroba yang hidup dalam jaringan tanaman tanpa menyebabkan gejala yang merugikan bagi tanaman (Tejesvi *et al.*, 2007). Tidak hanya pada tanaman endofit juga ditemukan pada berbagai organisme laut (Holler *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2008; Paz *et al.*, 2010). Jamur adalah salah satu mikroba endofit yang sering diisolasi baik dari tanaman atau biota laut. Bagi tumbuhan inang jamur endofit memberikan keuntungan berupa proteksi terhadap herbivora, serangga, atau mikroorganisme yang bersifat patogen dengan menghasilkan metabolit sekunder (Santamarita *et al.*, 2007). Beberapa metabolit yang telah diisolasi dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba, immunosupresan, dan antikanker (Strobel dan Daisy, 2003).

Spons genus *Homaxinella* merupakan organisme laut yang menghasilkan berbagai senyawa bioaktif mixol, alkaloid bromopirrol, dan senyawa sterol sitotoksik. Spons genus *Homaxinella* juga dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba dan anti inflamasi (Amade *et al.*, 1982; Moles *et al.*, 2014; Umeyama *et al.*, 1998; Mansoor *et al.*, 2004). Schmidt *et al.*, (2000) menyatakan aktivitas biologi yang dihasilkan oleh spons dapat berasal dari mikroorganisme yang berasosiasi dengannya. Salah satu mikroba endofit yang telah diisolasi dari spons genus *Homaxinella* adalah jamur endofit *P. oxalicum*. Ekstak etanol dari jamur endofit *P. oxalicum* dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Suciati *et al.*, 2014).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimikroba dan menentukan kadar hambat minimum (KHM) serta golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum*. Jamur endofit ini diisolasi dari spons genus *Homaxinella* asal Pulau Barrang Lompo, Kecamatan Ujung Tanah, Makassar, Sulawesi Selatan, Indonesia. Mikroba uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 yang mewakili bakteri Gram positif, *Escherichia coli* ATCC 25922 yang mewakili Gram negatif dan Jamur *Candida albicans* ATCC 10231.

Pada penelitian ini uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan dua metode yaitu difusi cakram dan mikrodilusi. Difusi cakram digunakan untuk mengetahui adanya hambatan pertumbuhan mikroba dari ekstrak. Hasil uji difusi menunjukkan bahwa pada konsentrasi 500 µg/disk ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* memberikan hambatan pertumbuhan

terhadap bakteri *B. subtilis*, *E. coli*, dan *S. aureus*. Dengan diameter zona hambat sebesar 12,6 mm; 11,2 mm; dan 10,5 mm. Namun pada konsentrasi tersebut, ekstrak tidak menunjukkan hambatan pertumbuhan terhadap *C. albicans*.

Penentuan kadar hambat minimum (KHM) dari ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode mikrodilusi disertai penambahan pereaksi warna MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazolium bromid). Penambahan pereaksi warna MTT pada uji dilusi dilakukan untuk mengetahui adanya sel hidup pada sumuran. MTT yang ditambahkan akan direduksi oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat dalam mitokondria sel hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu (Green dan Narahara, 1980). Bila terjadi pertumbuhan bakteri pada uji mikrodilusi ini akan terjadi perubahan warna dari kuning menjadi ungu pada *well plate*. Dari hasil uji mikrodilusi diperoleh KHM sebesar 250 µg/ml untuk *B. subtilis* dan *E. coli* sementara untuk *S.aureus* 500 µg/ml. Ekstrak dikatakan memiliki aktivitas antimikroba yang poten jika memiliki KHM < 100 µg/ml (Marasini *et al.*, 2015). Skrining fitokimia ekstrak menunjukkan hasil positif terhadap uji terpenoid dan polifenol. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa senyawa golongan terpenoid dan polifenol memiliki aktivitas antimikroba terhadap berbagai jenis bakteri dan jamur (Sing *et al.*, 2003; Maria, 2012). Sehingga dapat diduga aktivitas antimikroba yang dihasilkan oleh ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* bersal dari senyawa golongan terpenoid dan polifenol.

ABSTRACT

Antimicrobial Activity Of Ethyl Acetate Extract Endophytic Fungus *Penicillium Oxalicum* From Sponge Genus *Homaxinella*

Ni Putu Diah Parwita Sari

Marine organisms such as sponges, algae and tunicate have been known as the source of bioactive metabolites. *Penicillium oxalicum* is an endophytic fungus isolated from sponge. Previous study showed that extract of endophytic fungus *P. oxalicum* inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*

The aims of the current study was to investigate antimicrobial activity of the ethyl acetate extract of endophytic fungus *P. oxalicum*. The fungus was isolated from sponge genus *Homaxinella*. The antimicrobial activity was examined against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, and *Candida albicans* ATCC 10231. The antimicrobial assay was conducted by using disc diffusion and microdilution methods. The later method was used to determine minimum inhibitory concentration (MIC). In the diffusion assay activity was evaluated by determinating diameter of inhibition zone, while the MIC was identified by color changes from yellow to purple in well plate upon addition of MTT reagent

The results showed that ethyl acetate extract of *P. oxalicum* inhibited the growth of *S. aureus* ATCC 6538, *B. subtilis* ATCC 6633, and *E. coli* ATCC 25922 at concentration of 500 µg/disc. The MIC against *B. subtilis* ATCC 6633 and *E. coli* ATCC 25922 were 250 µg/ml while for *S. aureus* ATCC 6538 was 500 µg/ml.

Keywords : Antimicrobial agent, endophytic fungi, *Penicillium oxalicum*, *Homaxinella*

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH.....	iii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
LEMBAR PENGESAHAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
RINGKASAN	viii
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN.....	xix
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian	6
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Tinjauan Tentang Spons	7
2.1.1 Hexactinellida (Hyalospongiae).....	10
2.1.2 Demospongiae	10
2.1.3 Sclerospongiae.....	11
2.1.4 Calcarea (Calcispongiae).....	12
2.2 Tinjauan Tentang Spons Genus <i>Homaxinella</i>	13
2.2.1 Klasifikasi dan deskripsi.....	13
2.2.2 Metabolit sekunder dan bioaktivitas.....	13
2.3 Tinjauan Tentang Jamur Endofit	14

2.3.1 Pengertian jamur	14
2.3.2 Jamur endofit.....	15
2.3.3 Simbiosis jamur endofit dengan spons	16
2.3.4 Jamur endofit dan metabolit sekunder.....	28
2.3.5 Jamur endofit <i>Penicillium oxalicum</i>	31
2.3.5.1 Klasifikasi	31
2.3.5.2 Metabolit sekunder dan bioaktivitas.....	31
2.4 Tinjauan Tentang Cara Penentuan Aktivitas Antimikroba	33
2.4.1 Metode difusi	34
2.4.2 Metode dilusi.....	34
2.4.3 Metode Bioautografi	35
2.4.3.1 Metode bioautografi Kontak.....	36
2.4.3.2 Metode bioautografi Peredaman	36
2.4.3.3 Metode bioautografi Langsung	37
2.5 Tinjauan Tentang Ekstrak	37
2.5.1 Definisi ekstrak	37
2.5.2 Faktor yang berpengaruh pada mutu ekstrak.....	38
2.5.3 Metode ekstraksi	38
2.5.3.1 Cara dingin	38
2.5.3.2 Cara panas.....	39
2.5.3.3 Cara lain.....	39
2.6 Tinjauan Tentang Kultur Media dan Organisme Uji	40
2.6.1 <i>Saphylococcus aureus</i>	40
2.6.2 <i>Eschericia coli</i>	41
2.6.3 <i>Bacillus subtilis</i>	41
2.6.4 <i>Candida ablicans</i>	42
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	
3.1 Uraian Kerangka Konseptual.....	44
3.2 Hipotesis Penelitian	47

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian	48
4.1.1 Jamur endofit.....	48
4.1.2 Bahan kimia	48
4.1.3 Bakteri dan jamur uji.....	48
4.2 Alat-alat Penelitian	49
4.3 Pelaksanaan Penelitian.....	49
4.3.1 Proses ekstraksi	49
4.3.2 Penyiapan media	51
4.3.2.1 Nutrient agar	51
4.3.2.2 Sabouraud dekstroza agar	51
4.3.2.3 Nutrient broth	51
4.3.3 Kultivasi mikroba uji.....	51
4.3.4 Pembuatan suspensi mikroba	52
4.3.5 Pembuatan pereaksi warna MTT.....	52
4.3.6 Pembuatan larutan uji difusi.....	53
4.3.7 Pembuatan larutan uji dilusi.....	53
4.3.8 Pewarnaan Gram bakteri uji.....	54
4.3.9 Uji aktivitas antimikroba dengan metode disk difusi	54
4.3.10 Penentuan nilai KHM dengan metode dilusi.....	56
4.3.11 Skrining fitokimia ekstrak etil asetat jamur endofit <i>P oxalicum</i>	57
4.3.11.1 Skrining untuk golongan terpenoid.....	57
4.3.11.2 Skrining untuk golongan flavonoid	58
4.3.11.3 Skrining untuk golongan polifenol	58
4.3.11.4 Skrining untuk golongan alkaloid.....	58
4.3.11.5 Skrining untuk golongan antrakinin.....	59

BAB V HASIL PENELITIAN

5.1 Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis Jamur Endofit <i>P. oxalicum</i>	60
5.2 Hasil Identifikasi Jamur Endofit <i>P. oxalicum</i> dan Spons Genus <i>Homaxinella</i>	60
5.3 Hasil Ekstraksi Jamur Endofit <i>P. oxalicum</i>	60
5.4 Preparasi Ekstrak Untuk Sampel	61
5.5 Hasil Pewarnaan Gram Bakteri Uji	61
5.6 Uji Aktivitas Antimikroba Dengan Metode Difusi	62
5.7 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Dengan Metode Dilusi	63
5.8 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit <i>P. oxalicum</i>	67
5.8.1 Skrining senyawa flavonoid, alkaloid, antrakinon, terpenoid, dan polifenol	67
5.9 ¹ H-NMR Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit <i>P. oxalicum</i>	69
BAB VI PEMBAHASAN	70
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan	76
7.2 Saran	76
DAFTAR PUSTAKA	77
LAMPIRAN	90

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel II.1 Simbiosis jamur endofit dan spons	17
Tabel II.2 Jamur endofit yang berasosiasi dengan spons dan metabolit sekundernya	29
Tabel V.1 Hasil pengujian ekstrak etil asetat <i>P. oxalicum</i> konsentrasi 500 µg/disk terhadap bakteri <i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 dan jamur <i>C. ablicans</i> ATCC 10231	62
Tabel V.2 Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat jamur endofit <i>P. oxalicum</i> dengan metode dilusi dan penambahn pereaksi warna MTT	64

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tipe-tipe spikula pada spons	8
Gambar 2.2 Tipe-tipe saluran air pada spons	9
Gambar 2.3 <i>Euplectella aspergillum</i>	10
Gambar 2.4 <i>Microciona sp.</i>	11
Gambar 2.5 <i>Sycon gelatinosum</i>	12
Gambar 2.6 Spons genus <i>Homaxinella</i>	13
Gambar 2.7 <i>Penicillium oxalicum</i>	31
Gambar 2.8 Ergosterol peroksida	31
Gambar 2.9 Penioxalamine A	32
Gambar 2.10 Penioxalicin	32
Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual	47
Gambar 4.1 Skema ekstraksi	50
Gambar 4.2 Skema kerja penentuan aktivitas antimikroba	55
Gambar 4.3 Skema kerja penentuan KHM	57
Gambar 5.1 Gambar makroskopi dan mikroskopi jamur endofit <i>P. oxalicum</i>	60
Gambar 5.2 Gambar kultivasi jamur endofit <i>P. oxallicum</i> pada media cair malt ekstrak usia 6 minggu	61
Gambar 5.3 Hasil pewarnaan Gram bakteri <i>S. aureus</i> , <i>E. Coli</i> , dan <i>B. Subtilis</i>	61
Gambar 5.4 Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat jamur endofit <i>P. oxallicum</i> konsentrasi 500 µg/disk terhadap bakteri <i>S. aureus</i> , <i>E.Coli</i> , <i>B. Subtilis</i> , dan Jamur <i>C.</i> <i>albicans</i>	63
Gambar 5.5 Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat jamur endofit <i>P.oxallicum</i> secara dilusi terhadap mikroba uji <i>S.</i> <i>aureus</i> , <i>E.Coli</i> , <i>B. Subtilis</i>	65

Gambar 5.6 Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat jamur endofit *P.oxalicum* secara dilusi setelah penambahan MTT terhadap mikroba uji *S. aureus*, *E. Coli*, *B.Subti*66

Gambar 5.7 Hasil KLT ekstrak setelah diekuasi dan dilihat di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm68

Gambar 5.8 Hasil KLT ekstrak setelah diekuasi dan dilihat di bawah lampu UV pada panjang gelombang 366 nm.68

Gambar 5.9 Hasil KLT setelah diekuasi dan disemprot dengan penampak noda69

Gambar 5. 10 Spektrum ¹H-NMR ekstrak etil asetat jamur endofit *P.oxalicum* 5969

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Surat keterangan identifikasi jamur endofit <i>P. oxalicum</i>	90
Lampiran 2 Hasil BLAST analisis jamur endofit <i>P. oxalicum</i>	91
Lampiran 3 Hasil identifikasi spons genus <i>Homaxinella</i>	92
Lampiran 4 Hasil pengukuran diameter zona hambat Ekstrak etil asetat <i>P. oxalicum</i> konsentrasi 500 µg/disk terhadap mikroba uji <i>S. aureus</i> ATCC 6538, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>B. subtilis</i> ATCC 6633, dan <i>C. albicans</i> ATCC 10231 dari tiga sisi yang berbeda	93
Lampiran 5 Sertifikat <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922	94
Lampiran 6 Sertifikat <i>Bacillus Subtilis</i> ATCC 6633	95
Lampiran 7 Sertifikat <i>Candida Albicans</i> ATCC 10231	96
Lampiran 8 Sertifikat <i>Staphylococcus Aures</i> ATCC 6538	97

DAFTAR SINGKATAN

ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
CFU	: <i>colony forming unit</i>
DNA	: <i>deoxyribonucleic acid</i>
ESBL	: <i>Extended-Spectrum Beta-Lactamase</i>
INT	: <i>p-iodonitrotetrazolium violet</i>
ISPA	: infeksi saluran pernafasan atas
Kemenkes	: Kementrian Kesehatan
KHM	: kadar hambat minimum
KLT	: kromatografi lapis tipis
MIC	: <i>minimal inhibitory concentration</i>
MRSa	: <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
MTT	: <i>3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolium bromid</i>
PCR	: <i>polymerase chain reaction</i>
PDA	: <i>potato dextrose agar</i>
Riskesdas	: Riset Kesehatan Dasar
RNA	: <i>ribonucleic acid</i>
SDA	: <i>sabouraud dextrose agar</i>
TCC	: <i>2,3,5-trifeniltetrazolium klorid</i>
VRE	: <i>Vancomycin-Resistant Enterococci</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Penyakit infeksi adalah penyakit yang terjadi akibat keberadaan dan pertumbuhan agen biologis patogenik pada organisme host individu. Patogen penginfeksi meliputi virus, bakteri, jamur, protozoa, parasit. Penularan patogen terjadi dengan berbagai cara yang meliputi kontak fisik, makanan yang terkontaminasi, cairan tubuh, benda, inhalasi yang ada di udara atau melalui organisme vektor. WHO menyatakan setiap tahunnya sembilan juta penduduk meninggal akibat penyakit infeksi banyak diantaranya anak-anak berusia dibawah lima tahun, penyakit infeksi juga menyebabkan cacat seumur hidup (WHO, 2012). Di Indonesia penyakit infeksi masuk dalam sepuluh besar penyakit yang sering terjadi (Kemenkes RI, 2011). Penyakit infeksi seperti saluran pernafasan dan diare merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di dunia (Jayalakhsmi, Ravesha dan Amruthes, 2011). Berdasarkan data Riskesdas tahun 2013 *periode prevalence* ISPA (infeksi saluran pernafasan atas) di Indonesia sebesar 25,0%. Selain itu, beberapa penyakit infeksi yang umum terjadi di Indonesia adalah pneumonia dengan prevalensi sebesar 4,5%, hepatitis dengan prevalensi sebesar 1,2%, tuberkulosis paru dengan prevalensi sebesar 0,4%, dan diare dengan *periode prevalence* 3,5% (Riskesdas, 2013).

Upaya pengobatan terhadap penyakit infeksi telah banyak dilakukan, penanganan yang umum dilakukan adalah penggunaan antimikroba. Tetapi, penggunaan antimikroba secara tidak rasional baik dalam dosis maupun jangka waktu penggunaan dapat memicu terjadinya resistensi terhadap antimikroba (Kemenkes RI, 2011). Beberapa kuman

resisten antibiotik sudah banyak ditemukan di seluruh dunia yaitu: *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA), *Vancomycin-Resistant Enterococci* (VRE), *Penicillin Resistant Pneumococci*, *Klebsiella pneumoniae* yang menghasilkan *Extended-Spectrum Beta-Lactamase* (ESBL), (Stevenson *et al.*, 2005). Hasil penelitian *Antimicrobial Resistant in Indonesia* (AMRIN Study) menunjukkan terjadinya resistensi *Escherichia coli* terhadap berbagai jenis antibiotik seperti ampisilin sebesar 34%, kotrimoksazol sebesar 29% dan kloramfenikol sebesar 25%. Kasus ini terjadi pada 43% dari 2.494 individu di masyarakat (Kemenkes RI, 2011). Oleh sebab itu diperlukan alternatif dalam mengatasi masalah ini dengan memanfaatkan bahan-bahan aktif antimikroba dari bahan alam baik dari tumbuhan, biota laut dan endofit.

Indonesia merupakan negara bahari yang kaya hasil laut. Salah satu kekayaan alam laut Indonesia adalah spons (Yuliaty *et al.*, 2011). Spons merupakan salah satu biota laut yang dilaporkan menghasilkan berbagai senyawa bioaktif diantaranya antimikroba, antikanker, dan analgesik (Blunt *et al.*, 2009; Abubakar *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012). Schmidt *et al.*, (2000) menyatakan aktivitas biologi yang dihasilkan oleh spons biasanya berasal dari mikroorganisme yang berasosiasi dengannya. Mikroorganisme yang berasosiasi dengan organisme laut akan mensintesa metabolit sekunder seperti organisme inangnya (Pringgenies, 2010). Hal ini dibuktikan melalui penelitian tentang aktivitas biologi yang dihasilkan dari spons *Tethya aurantium* yang menunjukkan aktifitas antifungi. Jamur endofit *Fusarium larvarum* yang diisolasi dari *T. aurantium* juga dilaporkan memiliki aktivitas antifungi (Wiese *et al.*, 2011; Amade *et al.*, 1982). α -piron merupakan senyawa antikanker yang diperoleh dari jamur *Paecilomyces illacinus* yang berasosiasi dengan spons *Petrosia sp.*

(Elbandy *et al.*, 2009). Handayani *et al.*, (2012) melaporkan bahwa spons *Petrosia sp* memiliki aktivitas sitotoksik.

Pertumbuhan spons yang relatif lambat sangat berpengaruh terhadap keterbatasan pasokan biomassa untuk mengekstraksi senyawa metabolit sekundernya. Sehingga, pencarian senyawa bioaktif dari mikroorganisme yang berasosiasi dengan spons (endofit) dapat mengurangi eksploitasi berlebihan terhadap spons. Sehingga kelestariannya di alam dapat tetap terjaga dengan baik dan penggunaan produk yang dihasilkan lebih ramah lingkungan. Selain itu, mikroba endofit dapat dikultivasi di laboratorium sehingga tidak perlu mengoleksinya dari alam, serta dapat diperbanyak dalam waktu yang lebih cepat, dan relatif lebih mudah dimanipulasi.

Potensi jamur yang berasal dari biota laut (*marine-derived fungi*) sebagai antibiotika sudah dikenal sejak ditemukannya cephalosporin C, yang diisolasi dari jamur *Acremonium chrysogenum* pada tahun 1946 di perairan Sardinia. Namun penelitian terhadap *marine-derived fungi* baru berkembang sejak 10 tahun terakhir (Suciati *et al.*, 2014). Beberapa penelitian yang telah dilakukan terkait aktivitas antimikroba jamur endofit pada spons diantaranya senyawa xestodekalakton dari jamur *Penicillium cf. montanense* M. yang berasosiasi dengan spons *Xestospongia exigua* dilaporkan memiliki bioaktivitas sebagai antibakteri dan antijamur (Edrada *et al.*, 2002). Penelitian lain menyatakan roquefortin C, leucinostatins, dan equisetin dari jamur *Penicillium spp.*, *Paecilomyces sp.*, *Fusarium sp.* yang berasosiasi dengan spons *Tethya aurantium* memiliki aktivitas antimikroba (Wiese *et al.*, 2011). *Hortaea werneckii* yang diisolasi dari spons *Aplysina aerophoba* juga dinyatakan memiliki aktivitas antijamur dan antibakteri (Brauers *et al.*, 2000). Penelitian yang dilakukan Santamarina menunjukkan ekstrak diklorometana jamur endofit *P. oxalicum* yang dikultivasi pada media *potato dextrose agar* (PDA)

memberikan hambatan pertumbuhan terhadap *E.coli* sebesar 19,00 mm pada konsentrasi 100 µg/disk (Santamarina *et al.*, 2002). Jamur *P. oxalicum* yang diisolasi dari tanah perkembunan anggur juga dilaporkan memberikan hambatan pertumbuhan terhadap *S. aureus*, *B. subtilis*, dan *C. albicans* (Larrondo dan Calvo, 1999 dalam Santamarina *et al.*, 2002).

Suciati *et al.*, (2014) telah melakukan isolasi jamur endofit dari spons *Homaxinella* asal perairan Pulau Barrang Lompo, Kecamatan Ujung Tanah, Makassar, Sulawesi Selatan, Indonesia. Dari penelitian tersebut diperoleh tiga isolat jamur endofit dengan kode F17-5-14-1a, F17-5-14-1b dan F17-5-14-3. Berdasarkan hasil pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis ketiga isolat jamur berasal dari kelas Deuteromycetes. Ketiga isolat diekstraksi menggunakan etanol 96%. Berdasarkan hasil uji bioaktivitas dari ekstrak etanol 96% dengan metode difusi agar hanya isolat dengan kode F17-5-14-3 yang memberikan hasil positif. Hambatan pertumbuhan terjadi pada bakteri *S. aureus*, *E. coli* pada konsentrasi 60 µg/disk dan 120 µg/disk sementara *Vibrio Cholerae* hanya pada konsentrasi 120 µg/disk (Suciati *et al.*, 2014). Dari hasil identifikasi secara biologi molekuler diketahui bahwa jamur endofit kode F17-5-14-3 adalah *Penicillium oxalicum*.

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan diketahui bahwa *P. oxalicum* dapat ditumbuhkan pada media malt ekstrak padat maupun cair. Tetapi, ekstrak *P. oxalicum* yang dihasilkan dari media padat yang diekstraksi dengan etanol 96% lebih sedikit dibandingkan ekstrak yang diperoleh dari media cair yang diekstraksi dengan etil asetat. Kemungkinan hal ini disebabkan karena koloni *P. oxalicum* hanya dapat tumbuh pada permukaan media padat. Sehingga biomasa *P. oxalicum* yang dihasilkan lebih sedikit dibandingkan media cair. Pada media cair *P. oxalicum* dapat tumbuh di seluruh bagian media. Beberapa penelitian

menunjukkan dari hasil ekstraksi jamur *P. oxalicum* menggunakan etil asetat diperoleh senyawa kromon dan xanthon serta senyawa penioksalisin (*3-nor-2,3-seco-labdane diterpene*) yang dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba (Bao *et al.*, 2014; Bian *et al.*, 2015)

Pada penelitian ini dilakukan penentuan aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* dari spons genus *Homaxinella*. Jamur endofit ditumbuhkan pada media cair. Uji dilakukan terhadap beberapa jenis bakteri yaitu: *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* dan jamur *C. albicans*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* dari spons genus *Homaxinella* memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* dan jamur *C. albicans*?
2. Senyawa golongan apa yang terdapat pada ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* dari spons genus *Homaxinella*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* dari spons genus *Homaxinella* terhadap bakteri *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* dan jamur *C. albicans*.
2. Mengetahui kadar hambat minimum (KHM) ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* dari spons genus *Homaxinella*.
3. Mengetahui golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* dari spons genus *Homaxinella*.

1.4 Manfaat Penelitian

Dari penelitian ini dapat diketahui potensi ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* dari spons genus *Homaxinella* sebagai penghasil zat antimikroba. Serta golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum*.

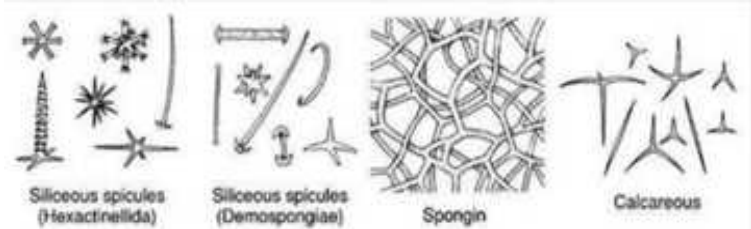
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Spons

Spons termasuk hewan metazoa multiseluler yang tergolong ke dalam Filum Porifera. Porifera berasal dari kata Pori = pori-pori, Fera/Faro = memiliki (Ahmad dan Suryati, 1996). Spons merupakan invertebrata laut multi sel yang fungsi jaringan dan organnya sangat sederhana yang hidup pada ekosistem terumbu karang. Biota laut ini dikenal dengan *filter feeder*, yaitu mencari makanan dengan mengisap dan menyaring air melalui sel cambuk dan memompakan air keluar melalui oskulum. Partikel-partikel makanan seperti bakteri, mikroalga dan detritus terbawa oleh aliran air ini (Rosmiati dan Suryati, 2001; Amir dan Budiyanto, 1996). Hidupnya selalu melekat pada substrat (sesil) dan tidak dapat berpindah tempat secara bebas. Untuk mempertahankan diri dari serangan predator dan infeksi bakteri patogen, spons mengembangkan system *biodefense* yaitu dengan menghasilkan zat racun dari dalam tubuhnya, zat ini umumnya dapat dimanfaatkan sebagai bahan farmasi (Motomasa, 1998).

Semua spons, kecuali mereka yang termasuk ordo kecil *Myxospongia*, dilengkapi dengan kerangka. Kerangka ini ada yang terdiri dari kapur karbonat atau silikon dalam bentuk spikula. Spikula adalah gambaran karakteristik dari spons. Ukran, bentuk dan susunan masing-masing spikula yang dikandung spons dapat digunakan untuk menentukan klasifikasinya. Pada Demospongia spikula silikon selalu menempel pada spongin. Sekresi spikula baru atau spongin memungkinkan secara reatif perubahan secara cepat arsitektur pada saluran air untuk merespon perubahan tekanan dan aliran air (Haris, 1991).

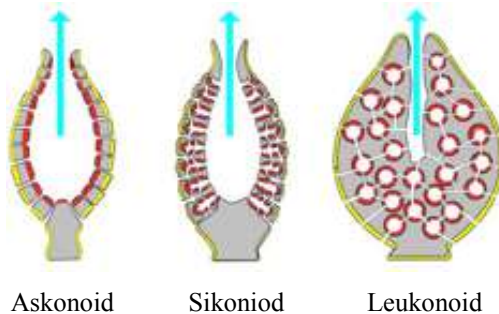


Gambar 2.1 Tipe-tipe spikula pada spons (asalam02.wordpress.com)

Tubuh spons dipenuhi oleh lubang kecil atau pori-pori yang disebut ostia (singular: ostium) yang dilalui sejumlah besar air. Air masuk ke tubuh spons melalui ostia mengalir masuk ke rongga besar yang disebut spongosol, kemudian air keluar melalui lubang besar yang disebut oskulum (Karlenskit, 1998). Spons memiliki saluran air yang berfungsi sebagai jalan masuknya air ke spongosol lalu dari spongosol dikeluarkan melalui oskulum. Saluran ini memiliki tiga bentuk sikon, askon, dan leukon (Ruppert dan Barnes, 1991; Romimohtarto dan Juwana, 1999). Sistem saluran ini bertindak seperti halnya sistem sirkulasi pada hewan tingkat tinggi. Pada spons tipe askonoid terdapat dinding tipis yang menutupi rongga tengah yang disebut spongosol, yang terbuka kearah luar melalui oskulum tunggal. Pergerakan air yang melalui spons tipe askonoid, struktuutya sebagai berikut: ostium – spongosol (diatas koanoderm) – oskulum.

Pada spons tipe sikonoid, koanosit dibatasi oleh ruang spesifik yang disebut ruang berflagella. Setiap ruang koanosit terbuka kearah spongosol oleh lubang luas yang disebut *apopyle*. Pada spons tipe sikonoid air bergerak dari permukaan spons ke aliran tubuh melalui struktur sebagai berikut: ostium– *intercurrent canals* – prosopil – ruang koanosit – *apopyle* – spongosol – oskulum. Pada spons tipe leukonoid ditemukan peningkatan jumlah dan penurunan ukuran ruang koanosit yang secara khusus mengelompok pada mesohil yang tebal. Aliran air

yang melalui spons leukonoid adalah sebagai berikut: dermal pore – *incurrent canals* – prosopil – ruang koanosit – *apopyle* – *excurrent canals* – oskulum. Tipe leukonoid adalah ciri khas kebanyakan spons tipe *Calcarea* dan semua anggota kelas *Demospongia* (Brusca dan Brusca, 1990).



Gambar 2.2 Tipe-tipe saluran air pada spons (www.slideshare.net)

Spons memiliki perbedaan yang sangat beragam antara spesiesnya dalam hal ukuran, bentuk dan warna. Beberapa spons ada yang berukuran kecil sekecil butiran beras sampai berukuran besar dengan ukuran panjang lebih dari empat kaki. Dalam pertumbuhannya, bentuk luar spons sangat bervariasi. Bentuk luar ini dapat berupa tabung, pengebor, merambat, *massive*, bola, semi bola, jari, bercabang-cabang, tugu dan sebagainya. Bentuk luar spons laut sangat dipengaruhi oleh faktor fisik, kimiawi, dan biologis lingkungannya.

Terdapat sekitar 5000 jenis spons di dunia. Sebarannya sangat luas spons dapat hidup di air laut dan air tawar, tetapi kebanyakan hidup di laut mulai dari daerah perairan pantai yang dangkal hingga kedalaman 5,5 km. Spons bahkan dapat dijumpai di bawah tutupan es dari kutub selatan. Spons dewasa biasanya hidup menetap sedangkan spons muda bergerak aktif dan terbawa arus sebelum mereka menempel (Romimohtarto dan Juwana, 1999). Filum Porifera terdiri dari empat

kelas, yaitu: Calcarea, Demospongiae, Hexactinellida, dan Sclerospongia (Kozloff, 1990; Warren, 1982; Pechenik, 1991).

2.1.1 Hexactinellida (Hyalospongiae)

Kelas Hexactinellida sering disebut dengan spons gelas. Mereka kebanyakan hidup di laut dalam dan tersebar luas. Spikulanya terdiri dari silikat (Kozloff, 1990). Ujung spikula berjumlah enam seperti bintang. Spikulanya berbentuk bidang "triaxon", dimana masing-masing bidang terdapat dua jari-jari (Hexactinal). Tubuhnya kebanyakan berwarna pucat dengan bentuk vas bunga atau mangkuk. Tinggi tubuhnya rata-rata 10-30 cm dengan saluran tipe sikonoid. Contoh Hexactinellida adalah *Euplectella* (Amir dan Budiyanto, 1996). Contoh spons ini adalah *Euplectella* sp dan *Aspergillum* sp. Terdiri dari 2 ordo yaitu: Ordo *Hexastorophora* dan Ordo *Amphidiscophora*.



Gambar 2.3 *Euplectella aspergillum* (wikipedia.org/wiki/Euplectella)

2.1.2 Demospongiae

Demospongiae adalah kelompok spons yang paling dominan diantara filum porifera. Seluruh Demospongiae memiliki saluran air tipe leukonoid. Mereka tersebar luas di alam, jumlah jenis maupun organismenya sangat banyak. Habitat Demospongiae umumnya di laut dalam maupun dangkal, meskipun ada yang di air tawar (Pechenik, 1991).

Mereka sering berbentuk masif dan berwarna cerah dengan sistem saluran yang rumit, dihubungkan dengan kamar-kamar bercambuk kecil yang bundar. Tubuh spons ini berwarna cerah karena mengandung pigmen yang terdapat pada amoebosit. Fungsi warna diduga untuk melindungi tubuhnya dari sinar matahari. Spikulanya ada yang terdiri dari silikat berbentuk monoaxon, teraxon dan ada dari beberapa ordo yaitu Dictyoceratida, Dendroceratida dan Verongida spikulanya hanya terdiri serat spongin, serat kolagen atau spikulanya tidak ada. Bentuk tubuh spons ini tidak beraturan dan bercabang. (Suparno, 2005). Contoh Demospongiae adalah *Spongia*, *Hippospongia* dan *Niphates digitalis*.



Gambar 2.4 *Microciona sp.* (<http://de-fairest.blogspot.com/>)

2.1.3 Sclerospongiae

Kelas Sclerospongiae merupakan spons yang kebanyakan hidup pada perairan dalam di terumbu karang atau gua-gua, celah-celah batuan bawah laut atau terowongan di terumbu karang. Semua jenis ini adalah tipe leuconoid yang kompleks yang mempunyai spikula silikat dan serat spongin. Elemen-elemen ini dikelilingi oleh jaringan hidup yang terdapat pada rangka basal kalsium karbonat yang kokoh atau pada rongga yang ditutupi oleh kalsium karbonat (Warren, 1982; Kozloff, 1990; Harrison dan De Vos, 1991).

2.1.4 Calcareia (Calcispongiae)

Calcareia merupakan spons yang seluruh anggota kelasnya hidup di laut. Spons ini mempunyai struktur sederhana dibandingkan jenis lainnya. Spikula terdiri dari kalsium karbonat dalam bentuk kalsit dan tidak akan berdiri tegak tanpa adanya spikula atau sponging yang membentuk kerangka untuk menopang tubuhnya sehingga memungkinkan adanya saluran dan ruangan berflagela. Tubuhnya kebanyakan berwarna pucat dengan bentuk seperti vas bunga, dompet, kendi, atau silinder. Tinggi tubuh kurang dari 10 cm. Struktur tubuh ada yang memiliki saluran air askonoid, sikonoid, atau leukonoid. Spons dari kelas ini sangat sedikit jumlahnya, lebih kurang hanya 10% dari jumlah semua hewan spons yang ada di laut. Calcareia hidup di laut dangkal (Romimohtarto dan Juwana, 1999; Hickman, Roberts dan Larson, 1997)



Gambar 2.5 *Sycon gelatinosum* (museum.wa.gov.au)

2.2 Tinjauan Tentang Spons Genus *Hoxaminella*

2.2.1 Kalsifikasi dan Deskripsi

Kingdom	: Animalia
Filum	: Porifera
Kelas	: Demospongiae
Sub-Kelas	: Heteroscleromorpha
Bangsa	: Suberitida
Suku	: Suberitidae
Marga	: <i>Homaxinella</i>



Gambar 2.6 Spons genus *Homaxinella*

Homaxinella merupakan spons dari kelas demospongiae yang melekat pada batu dan tidak memiliki percabangan memiliki oskulum kecil yang terbuka dan tajam. Skeletonnya tersusun dari inti aksial atau ikatan dari spikula yang tersusun longitudinal dan rapat. Dengan bentuk spikula yang panjang, tipis, lembut, lurus atau bengkok (Tanita, 1968; Hoshino, 1981).

2.2.2 Metabolit Sekunder dan Bioaktivitas *Homaxinella*

Beberapa penelitian tentang genus *Homaxinella* telah dilakukan. Salah satunya oleh Yokoyama dan Miki pada tahun 1994 yang mengisolasi bakteri *Flavobacterium sp.* dari spons *Honaxinella sp.* kemudian dilakukan ekstraksi dan diperoleh keratonoid yang

diidentifikasi sebagai mixol (Yokoyama dan Miki, 1994). Pada penelitian yang dilakukan Amade *et al.*, (1982) spons *Homaxinella trachys* menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap beberapa jenis bakteri garam positif, gram negatif dan jamur seperti *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Neisseria flava*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus morgani*, *Flavobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Candida ablicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*.

Ekstrak etanol dari spons *Homaxinella cf. balfouren-sis* dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi dengan menurunkan pelepasan dari IL-1 β dan PGE₂ pada konsentrasi 250 μ g/mL (Moles *et al.*, 2014). Dilakukan juga isolasi senyawa alkaloid bromopirol dari spons *Homaxinella sp.* asal perairan Tokoshima (Umeyama *et al.*, 1998). Mansoor *et al.*, (2004) melakukan ekstraksi spons *Homaxinella sp.* asal Pulau Jeju, Korea menggunakan metanol setelah dianalisis menggunakan NMR dan spektroskopi MS diperoleh beberapa senyawa sterol sitotoksik diantaranya: 6-O-alkylated sterols; 3 β ,5 α ,6 β -trihydroxy sterol; 5 α ,8 α -epidioxy sterols.

2.3 Tinjauan Tentang Jamur Endofit

2.3.1 Pengertian Jamur

Jamur merupakan mikroorganisme eukariota, memiliki dinding sel yang sebagian besar tersusun atas berbagai polisakarida dan kitin (Kavanagh, 2005). Jamur disebut organisme heterotrof karena memanfaatkan senyawa karbon organik sebagai sumber nutrisi melalui penyerapan. Kingdom Fungi atau Eumycota digolongkan menjadi lima filum, yaitu *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, dan *Glomeromycota*. Penggolongan jamur menjadi filum-filum tersebut dilakukan berdasarkan alat reproduksi (spora) seksual yang dihasilkan.

Alat reproduksi seksual yang dalah zoospora oleh *Chytridiomycota*; zigospora oleh *Zygomycota*; askospora oleh *Ascomycota*; dan basidiospora oleh *Basidiomycota* (Carlile *et al.*, 2001)

Berdasarkan morfologi, jamur dapat berupa filamen (*filamentous fungi*) atau sel tunggal (*unicellular fungi*). *Filamentous fungi* terbagi menjadi kapang (*mold*) dan cendawan (*mushroom*), sedangkan fungi yang berupa sel tunggal disebut khamir (*yeast*). Kapang merupakan *filamentous* jamur dan tersusun atas filamen-filamen yang disebut hifa. Jamur yang hidup sebagai saprofit menyerap nutrien dari bahan organik yang telah mati, menguraikannya menjadi zat-zat kimia yang lebih sederhana. Sedangkan, jamur yang hidup sebagai parasit yang menyerap nutrien dari sel-sel inang yang masih hidup. Jamur juga dapat ditemukan hidup bersimbiosis mutualisme dengan tumbuhan. Asosiasi antara fungi dan tumbuhan antara lain berupa lichen, mikoriza, dan endofit (Kavanag, 2005)

2.3.2 Jamur Endofit

Jamur endofit adalah Jamur yang terdapat di dalam sistem jaringan tumbuhan, seperti daun, bunga, ranting ataupun akar tumbuhan. Jamur menginfeksi tumbuhan sehat pada jaringan tertentu dan mampu menghasilkan mikotoksin, enzim serta antibiotika (Tombe, 2008). Menurut Simarmata *et al.*, (2007), hubungan antara jamur endofit dengan tumbuhan inangnya merupakan simbiosis yang saling menguntungkan (mutualisme). Tumbuhan inang memberikan nutrien berupa materi organik dan proteksi bagi Jamur endofit (Tan dan Zou, 2001). Bagi tumbuhan inang, jamur endofit memberikan keuntungan berupa proteksi terhadap herbivora, serangga, atau mikroorganisme yang bersifat patogen (Simarmata *et al.*, 2007). Menurut Bhagotaby *et al.*, (2011), metabolit cadanga yang dihasilkan jamur endofit telah beradaptasi dengan masing-

masing hostnya untuk membentuk biomolekul yang tidak hanya penting bagi dirinya tapi juga bagi hostnya.

Beberapa jamur endofit yang telah dilaporkan yaitu: *Penicillium spp.* dari Green alga, *Caulerpa racemosaa*, *C. scalpelliformisa*. *Fusarium spp.* dari Green algae, *Caulerpa racemosaa*, *C. sertularioides* (Suryanarayana *et al.*, 2012). *Penicillium chrysogenum* dari spons *Gelliodes carnosa*, *Aspergillus versicolor* dari spons *Haliclona simulans* (Liu *et al.*, 2010). Senyawa Alkaloid 2-Pyridone (*N*-hydroxy-2-Pyridine) dari jamur endofit *Penicillium sp.* yang berasosiasi dengan alga coklat *Xiphophora gladiata* dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba terhadap *B. subtilis* dan *C. ablicans* dengan zona hambat sebesar 8 mm dan 11 mm (30 µg/disk) selain itu senyawa ini juga menunjukkan aktivitas pada uji leukemia dengan $IC_{50} = 1.8 \mu\text{g/ml}$ (Silva *et al.*, 2009). Jamur endofit *Aspergillus niger* yang diisolasi dari Tunicate *Aplindium sp.* dilaporkan menghasilkan senyawa *epoxycylohexenones*, *yanuthones A–E*, *1-hydroxy-yanuthone A*, *1-hydroxy-yanuthone C* and *22-deacetyl-yanuthone A*. Walaupun kebanyakan *yanuthones* menunjukkan aktivitas antimikroba tetapi, *yanuthone D* merupakan senyawa yang paling aktif terhadap *methicillin-resistant S. aureus*, dibandingkan dengan *methicillin-sensitive S. aureus* dan menunjukkan aktivitas terhadap *vancomycin-resistant E. faecium* (Bugni and Ireland, 2004).

2.3.3 Simbiosis Jamur Endofit Dan Spons

Berdasarkan tabel dibawah diketahui bahwa simbiosis jamur endofit tidak spesifik hanya pada spons dari spesies yang sama tetapi, hubungan simbiosis tersebut dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain lingkungan tempat tumbuh, cahaya, nutrisi, dan waktu pengambilan. Hal ini dapat dilihat dari data yang disajikan pada tabel sebagai contoh spons *Halichondria panacea H - 8** dan *Halichondria panacea H - 4**

merupakan spon dari spesies yang sama tetapi diperoleh dari tempat koleksi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan keragaman jamur endofit dimana pada spon *H. panacea H - 8** ditemukan jamur endofit *Alternaria sp.* sementara pada *H. panacea H - 4** tidak ditemukan justru jamur endofit yang sama ditemukan pada spon *Tethya. Aurantium* yang berasal dari spesies yang berbeda.

Islam *et al.*, 2010; Juwita, (2010) juga menyatakan keanekaragaman jamur endofit yang berasosiasi dengan spon tidak hanya dipengaruhi oleh jenis spon banyak faktor yang mempengaruhi jenis endofit seperti kondisi lingkungan, patogen dari hostnya, waktu pengambilan dan temperatur. Kondisi lingkungan mungkin membentuk keanekaragaman endofit yang hidup di dalam inangnya (Vega *et al.*, 2010). Derajat variabilitas komposisi endofit dari individu tanaman inang berdasarkan tingkat takson biasanya diamati berdasarkan pengaruh terhadap kondisi fisiologis inangnya, bahkan dalam daerah pengamatan yang sama sekalipun (Ghimire *et al.*, 2011; González dan Tello, 2011)

Tabel II.1 Simbiosis Jamur Endofit dan Spons

Jamur	Spons	Asal Spons	Referensi
<i>Acremonium implicatum</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Acremonium sp.</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
	<i>Callyspongia sp. (cf. C. ammea)</i>	Bear Island, Sydney, Australia	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Callyspongia vaginalis</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Ectyplasia perox</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Neofibularia nolintangere</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Halichondria panacea H- 4*</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Myxilla incrustans</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Leucosolenia sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000

	<i>Sycon sp.</i> <i>Halichondria panacea</i> <i>H - 8*</i> <i>Ircinia variabilis</i> <i>Aplysina aerophoba</i> <i>Petrosia ficiformis</i> <i>Oscarella lobularis</i> <i>Tethya aurantium</i>	Helgoland, Germany Malta Tenerife, Spain Tenerife, Spain Tenerife, Spain European waters	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Alternaria sp.</i>	<i>Tethya aurantium</i> <i>Gelliodes carnosa</i> <i>Callyspongia vaginalis</i> <i>Neofibularia</i> <i>Sycon sp.</i> <i>Halichondria panacea</i> <i>H - 8*</i>	European waters South China Lauro Club Reef, Dominica Lauro Club Reef, Dominica Helgoland, Germany Helgoland, Germany	Wiese <i>et al.</i> , 2011 Liu <i>et al.</i> , 2010 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Aplosporella sp.</i>	<i>Callyspongia vaginalis</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Arthrinium sp.</i>	<i>Halichondria panacea</i> <i>H- 4*</i> <i>Myxilla incrustans</i> <i>Leucosolenia sp.</i> <i>Sycon sp.</i> <i>Halichondria panacea</i> <i>H - 8*</i> <i>Ircinia oros</i>	Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany Malta	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Ascomycete</i>	<i>Psammocinia sp.</i>	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Ascomycete sp.</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus insuetus</i>	<i>Psammocinia sp.</i>	Sedot-Yam, Israel	Cohen <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Tethya aurantium</i>	European waters	Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus caesiellus</i>	<i>Haliclona simulans</i> <i>Gelliodes carnosa</i>	South China South China	Liu <i>et al.</i> , 2010 Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus japonicus</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Gelliodes carnosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus penicillioides</i>	<i>Haliclona simulans</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus restrictus</i>	<i>Haliclona simulans</i> <i>Gelliodes carnosa</i>	South China South China	Liu <i>et al.</i> , 2010 Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus sp.</i>			
<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Psammocinia sp.</i>	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010

	<i>Halichondria panacea</i> H - 8* <i>Ircinia oros</i> <i>Ircinia variabilis</i> <i>Petrosia ficiformis</i> <i>Tethya aurantium</i>	Helgoland, Germany Malta Malta Tenerife, Spain European waters	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Psammocinia sp.</i> "	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus tamarii</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Psammocinia sp.</i> "	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus ustus</i>	<i>Psammocinia sp.</i> "	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Psammocinia sp.</i> " <i>Gelliodes carnosa</i> <i>Haliclona simulans</i>	Sedot-Yam, Israel South China South China	Paz <i>et al.</i> , 2010 Liu <i>et al.</i> , 2010 Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Aspergillus/Petro-myces</i>	<i>Tethya aurantium</i>	European waters	Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Asteromyces sp.</i>	<i>Halichondria panacea</i> H- 4* <i>Myxilla incrustans</i>	Helgoland, Germany Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Beauveria sp.</i>	<i>Calyspongia vaginalis</i> <i>Myxilla incrustans</i> <i>Halichondria panacea</i> H - 8* <i>Suberites zeteki</i>	Lauro Club Reef, Dominica Helgoland, Germany Helgoland, Germany Hawaii	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Bipolaris australiensis</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Gelliodes carnosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Botrytis sp.</i>	<i>Calyspongia sp. (cf. C. ammea)</i> <i>Leucosolenia sp.</i> <i>Tethya aurantium</i>	Bear Island, Sydney, Australia Helgoland, Germany European waters	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Candida etchellsii</i>	<i>Gelliodes carnosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Chaetomium sp.</i>	<i>Halichondria panacea</i> H- 4* <i>Sycon sp.</i> <i>Ircinia oros</i> <i>Ircinia variabilis</i>	Helgoland, Germany Helgoland, Germany Malta Malta	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Calyspongia vaginalis</i> <i>Ectyplasia perox</i>	Lauro Club Reef, Dominica Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000

	<i>Myxilla incrustans</i> <i>Sycon sp.</i> <i>Ircinia oros</i> <i>Aplysina aerophoba</i> <i>Oscarella lobularis</i> <i>Tethya aurantium</i> <i>Psammocinia sp.</i> "	Helgoland, Germany Helgoland, Germany Malta Tenerife, Spain Tenerife, Spain European waters Sedot-Yam, Israel	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Wiese <i>et al.</i> , 2011 Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Haliclona simulans</i> <i>Gelliodes carnosa</i>	South China South China	Liu <i>et al.</i> , 2010 Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Cladosporium lignicola</i>	<i>Haliclona simulans</i> <i>Gelliodes carnosa</i>	South China South China	Liu <i>et al.</i> , 2010 Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	<i>Haliclona simulans</i> <i>Psammocinia sp.</i> "	South China Sedot-Yam, Israel	Liu <i>et al.</i> , 2010 Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Cladospotium oxysporum</i>	<i>Psammocinia sp.</i> "	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Clamropygnis sp.</i>	<i>Sycon sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Clavicipitace</i>	<i>Psammocinia sp.</i> "	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Clavicipitace</i>	<i>Psammocinia sp.</i> "	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Clonostachys sp.</i>	<i>Tethya aurantium</i>	European waters	Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Cochliobolus sp.</i>	<i>Psammocinia sp.</i> "	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Coniothyrium sp.</i>	<i>Ectyplasia perox</i> <i>Neofibularia nolitangere</i> <i>Halichondria panacea H- 4*</i> <i>Myxilla incrustans</i> <i>Sycon sp.</i> <i>Halichondria panacea H - 8*</i>	Lauro Club Reef, Dominica Lauro Club Reef, Dominica Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Coniothyrium sporulosum</i>	<i>Suberites zeteki</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Coprinellus sp</i>	<i>Psammocinia sp.</i> "	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Cryptococcus foliicola</i>	<i>Gelliodes carnosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Curvularia affinis</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Cytospora nitschkii</i>	<i>Suberites zeteki</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Didymella sp.</i>	<i>Psammocinia sp.</i>	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Doratomyces sp.</i>	<i>Calyspongia vaginalis</i> <i>Ectyplasia perox</i>	Lauro Club Reef, Dominica Lauro Club Reef,	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000

	<i>Halichondria panacea</i> <i>H- 4*</i> <i>Myxilla incrustans</i> <i>Leucosolenia sp.</i>	Dominica Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Dothideomycetes sp.</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Drechslera sp.</i>	<i>Halichondria panacea</i> <i>H- 4*</i> <i>Myxilla incrustans</i> <i>Halichondria panacea</i> <i>H - 8*</i>	Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Emericella sp.</i>	<i>Calyspongia sp. (cf. C. ammea)</i>	Bear Island, Sydney, Australia	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Emericellopsis sp.</i>	<i>Halichondria panacea</i> <i>H- 4*</i> <i>Myxilla incrustans</i> <i>Leucosolenia sp.</i> <i>Sycon sp.</i> <i>Psammocinia sp.</i> ”	Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany Sedot-Yam, Israel	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Epicoccum sp.</i>	<i>Tethya aurantium</i> <i>Myxilla incrustans</i>	European waters Helgoland, Germany	Wiese <i>et al.</i> , 2011 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Tethya aurantium</i>	European waters	Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Eupenicillium sp</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ” <i>Calyspongia sp. (cf. C. ammea)</i>	Sedot-Yam, Israel Bear Island, Sydney, Australia	Paz <i>et al.</i> , 2010 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Eurotium sp.</i>	<i>Tethya aurantium</i> <i>Ircinia oros</i> <i>Ircinia variabilis</i>	European waters Malta Malta	Wiese <i>et al.</i> , 2011 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Exophiala sp.</i>	<i>Halichondria panacea</i>	Jeonnam, Korea	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Fusarium incarnatum</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Gelliodes carnosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Haliclona simulans</i> <i>Psammocinia sp.</i> ”	South China Sedot-Yam, Israel	Liu <i>et al.</i> , 2010 Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Fusarium solani</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Fusarium solani</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010

<i>Fusarium sp.</i>	<i>Callyspongia sp. (cf. C. amnea)</i> <i>Callyspongia vaginalis</i>	Bear Island, Sydney, Australia Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Ectyplasia perox</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Halichondria panacea</i> H- 4*	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Myxilla incrustans</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Leucosolenia sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Sycon sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Halichondria panacea</i> H - 8*	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Petrosia ficiformis</i> <i>Tethya aurantium</i>	Tenerife, Spain European waters	Holler <i>et al.</i> , 2000 Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Fusicocum mangiferum</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Geomyces sp.</i>	<i>Halichondria panacea</i> H- 4*	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Myxilla incrustans</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Halichondria panacea</i> H - 8* <i>Ircinia oros</i>	Helgoland, Germany Malta	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Geotrichum sp.</i>	<i>Sycon sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Gliocladium sp.</i>	<i>Ectyplasia perox</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Halichondria panacea</i> H- 4*	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Sycon sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Halichondria panacea</i> H - 8*	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Gliomastix sp.</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Gonatobotrys sp.</i>	<i>Leucosolenia sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Gymnoascus sp.</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Helvella lacunosa</i>	<i>Suberites zeteki</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Hortaea wernecki</i>	<i>Haliclona simulans</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
	<i>Gelliodes carnosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Hypocrea atroviridis</i>	<i>Psammocinia sp.</i>	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Hypocrea lixii</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
	<i>Suberites zeteki</i>	Hawaii.	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Hypocrea orientalis</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010

<i>Hypocreales sp.</i>	<i>Gelliodes carnosa</i> <i>Psammocinia sp.</i> ”	South China Sedot-Yam, Israel	Liu <i>et al.</i> , 2010 Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Kondoa malvinella</i>	<i>Haliclona simulans</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Leptosphaeria sp.</i>	<i>Callyspongia vaginalis</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Massarina sp.</i>	<i>Gelliodes carnosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Microascus sp.</i>	<i>Sycon sp.</i> <i>Ircinia variabilis</i>	Helgoland, Germany Malta	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	<i>Gelliodes carnosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Microsphaeropsis sp.</i>	<i>Myxilla incrustans</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Monascus sp.</i>	<i>Ircinia variabilis</i>	Malta	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Moniliella sp.</i>	<i>Ircinia variabilis</i>	Malta	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Monochaetia sp.</i>	<i>Callyspongia vaginalis</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Mucor hiernalis</i>	<i>Tethya aurantium</i>	European waters	Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Mucor sp.</i>	<i>Halichondria panacea</i> H- 4* <i>Myxilla incrustans</i> <i>Sycon sp.</i>	Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Mucoraceae</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Tethya aurantium</i>	European waters	Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Mycosphaerella sp.</i>	<i>Haliclona simulans</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Myrothecium cinctum</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Myrothecium sp.</i>	<i>Callyspongia vaginalis</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Myxotrichum sp.</i>	<i>Ircinia variabilis</i>	Malta	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Nectria cinnabarina</i>	<i>Gelliodes carnosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Nectria sp.</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Nielsia sp.</i>	<i>Halichondria panacea</i> H- 4* <i>Myxilla incrustans</i> <i>Leucosolenia sp.</i> <i>Sycon sp.</i> <i>Halichondria panacea</i> H - 8*	Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Nigrospora</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008

<i>oryzae</i>			
<i>Oidiodendron</i> <i>sp.</i>	<i>Ircinia oros</i>	Malta	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Paecilomyces</i> <i>sp.</i>	<i>Tethya aurantium</i> <i>Psammocinia sp.</i> ”	European waters Sedot-Yam, Israel	Wiese <i>et al.</i> , 2011 Paz <i>et al.</i> , 2010
	<i>Ectyplasia perox</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Myxilla incrustans</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Leucosolenia sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Halichondria panacea</i> H - 8*	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Petrosia ficiformis</i> <i>Oscarella lobularis</i>	Tenerife, Spain Tenerife, Spain	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Paraconiothyri</i> <i>um</i> <i>cyclothyrioides</i>	<i>Suberites zeteki</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Paraphaeospha</i> <i>eria sp.</i>	<i>Gelliodes carnosa</i> <i>Psammocinia sp.</i> ”	Hawaii Sedot-Yam, Israel	Wang <i>et al.</i> , 2008 Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Penicillium</i> <i>spp.</i>	<i>Tethya aurantium</i>	European waters	Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium</i> <i>brevicompectu</i> <i>m</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i> <i>Suberites zeteki</i> <i>Psammocinia sp.</i> ”	Hawaii Hawaii Sedot-Yam, Israel	Wang <i>et al.</i> , 2008 Wang <i>et al.</i> , 2008 Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Penicillium</i> <i>chrysogenum</i>	<i>Gelliodes carnosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Penicillium</i> <i>citrinum</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Penicillium</i> <i>glabrum</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Penicillium</i> <i>granulatum</i>	<i>Hymeniacion sp</i>	Northern China	Wei <i>et al.</i> , 2009
<i>Penicillium</i> <i>olsonii</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008

<i>Penicillium</i> sp.	<i>Callyspongia</i> sp. (cf. <i>C. ammea</i>) <i>Callyspongia vaginalis</i> <i>Ectyplasia perox</i> <i>Myxilla incrustans</i> <i>Leucosolenia</i> sp. <i>Sycon</i> sp. <i>Halichondria panacea</i> H - 8* <i>Ircinia oros</i> <i>Ircinia variabilis</i> <i>Aplysina aerophoba</i> <i>Petrosia ficiformis</i>	Bear Island, Sydney, Australia Lauro Club Reef, Dominica Lauro Club Reef, Dominica Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany Malta Malta Tenerife, Spain Tenerife, Spain	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Penicillium verruculosum</i>	<i>Haliclona simulans</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Penicillium vina-ceum</i>	<i>Haliclona angulata</i>	Eastern China	Wei <i>et al.</i> , 2009
<i>Pezizomycotina</i> sp.	<i>Suberites zeteki</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Phialophorophoma</i> sp.	<i>Aplysina aerophoba</i>	Tenerife, Spain	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Phoma</i> sp.	<i>Suberites zeteki</i> <i>Callyspongia vaginalis</i> <i>Ectyplasia perox</i> <i>Halichondria panacea</i> H- 4* <i>Myxilla incrustans</i> <i>Leucosolenia</i> sp. <i>Halichondria panacea</i> H - 8*	Hawaii Lauro Club Reef, Dominica Lauro Club Reef, Dominica Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany	Wang <i>et al.</i> , 2008 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Phoma leveillei</i>	<i>Psammocinia</i> sp. ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Psammocinia</i> sp. ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	<i>Suberites zeteki</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Plectosphaerella</i> sp.	<i>Psammocinia</i> sp. ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Pleosporales</i>	<i>Psammocinia</i> sp. ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010

<i>Preussia sp.</i>	<i>Myxilla incrustans</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Leucosolenia sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Rhizopus sp.</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Scolecobasidium sp.</i>	<i>Aplysina aerophoba</i>	Tenerife, Spain	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Scolecobasidium terreum</i>	<i>Gelliodes carnosa</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	<i>Tethya aurantium</i>	European waters	Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Scopulariopsis sp.</i>	<i>Myxilla incrustans</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Leucosolenia sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Sycon sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Ircinia oros</i>	Malta	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Sporormiella sp.</i>	<i>Callyspongia sp. (cf. C.ammea)</i>	Bear Island, Sydney, Australia	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Sporothrix sp.</i>	<i>Ectyplasia perox</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Stachybotrys sp.</i>	<i>Sycon sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Ircinia oros</i>	Malta	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Psammocinia sp.</i> ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Stachylidium sp. (cf. C.ammea)</i>	<i>Callyspongia sp. (cf. C.ammea)</i>	Bear Island, Sydney, Australia	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	<i>Haliclona simulans</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
	<i>Gelliodes carnosa</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Sterile mycelia sp.</i>	<i>Callyspongia sp. (cf. C. ammea)</i>	Bear Island, Sydney, Australia	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Callyspongia vaginalis</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Ectyplasia perox</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Neofibularia nolitangere</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Halichondria panacea H- 4*</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Leucosolenia sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Sycon sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Halichondria panacea H- 8*</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Stilbella byssiseda</i>	<i>Suberites zeteki</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008

<i>Syncephalastrum</i> sp.	<i>Ircinia oros</i> <i>Ircinia variabilis</i>	Malta Malta	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>T. harzianum</i>	<i>Psammocinia</i> sp. ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>T. longibrachhiatu mz</i>	<i>Psammocinia</i> sp. ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Talaromyces</i>	<i>Ectyplasia perox</i> <i>Ircinia oros</i>	Lauro Club Reef, Dominica Malta	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Tolypocladium</i> sp.	<i>Myxilla incrustans</i> <i>Leucosolenia</i> sp. <i>Sycon</i> sp. <i>Halichondria panacea</i> H - 8*	Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000
<i>Trichoderma atroviride</i>	<i>Psammocinia</i> sp. ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Trichoderma aureoviride</i>	<i>Gelliodes fibrosa</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Callyspongia vaginalis</i> <i>Ectyplasia perox</i> <i>Myxilla incrustans</i> <i>Sycon</i> sp. <i>Halichondria panacea</i> H - 8* <i>Tethya aurantium</i> <i>Suberites zeteki</i> <i>Psammocinia</i> sp. ”	Lauro Club Reef, Dominica Lauro Club Reef, Dominica Helgoland, Germany Helgoland, Germany Helgoland, Germany European waters Hawaii Sedot-Yam, Israel	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000 Wiese <i>et al.</i> , 2011 Liu <i>et al.</i> , 2010 Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Trichoderma viride</i>	<i>Suberites zeteki</i>	Hawaii	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Trichosporon</i> sp.	<i>Psammocinia</i> sp. ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Trichurus</i> sp.	<i>Psammocinia</i> sp. ”	Sedot-Yam, Israel	Paz <i>et al.</i> , 2010
<i>Tritirachium</i> sp.	<i>Tethya aurantium</i>	European waters	Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Ulocladium</i> sp.	<i>Callyspongia vaginalis</i> <i>Neofibularia nolitangere</i>	Lauro Club Reef, Dominica Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000 Holler <i>et al.</i> , 2000

<i>Verticillium sp.</i>	<i>Psammocinia sp.</i> ” <i>Callyspongia vaginalis</i>	Sedot-Yam, Israel Lauro Club Reef, Dominica	Paz <i>et al.</i> , 2010 Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Ectyplasia perox</i>	Lauro Club Reef, Dominica	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Halichondria panacea</i> H- 4*	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Myxilla incrustans</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Leucosolenia sp.</i>	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Sycon sp.</i> <i>Halichondria panacea</i> H - 8*	Helgoland, Germany	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Ircinia oros</i>	Malta	Holler <i>et al.</i> , 2000
	<i>Volutella sp.</i>	<i>Tethya aurantium</i>	European waters
<i>Walleimia sebi</i>	<i>Haliclona simulans</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
	<i>Gelliodes carnosa</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Xylaria sp.</i>	<i>Haliclona simulans</i>	South China	Liu <i>et al.</i> , 2010

H- 4* dan H- 8* diisolasi dari tempat koleksi yang berbeda,” diambil pada bulan yang berbeda.

2.3.4 Jamur Endofit dan Metabolit Sekunder

Dari data pada tabel dibawah dapat diketahui bahwa spesies jamur endofit bila diperoleh dari spesies spons yang berbeda menghasilkan metabolit sekunder dan bioaktivitas yang berbeda pula hal serupa juga dikemukakan Jadulco *et al.*, (2002) spesies jamur yang sama bila diisolasi dari spesies spons yang berbeda akan menghasilkan profil metabolit yang berbeda. Oleh karena itu sangat penting dilakukan skrining terhadap spesies spons dari daerah yang berbeda karena akan mempengaruhi metabolit yang dihasilkan oleh jamur yang berasosiasi dengannya. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur sangat dipengaruhi oleh faktor kimia dan fisika seperti sumber karbon, nitrogen, pH, temperature dan cahaya (Yu dan Keller, 2005). Amagata *et al.*, (2007) melaporkan perubahan sumber karbon akan menginduksi jamur

endofit yang berasosiasi dengan spons untuk memproduksi metabolit sekunder berupa senyawa steroid.

Tabel II.2 Jamur Endofit Yang Berasosiasi Dengan Spons dan Metabolit Sekundernya.

Jamur	Spons	Metabolit	Bioaktivitas	Pustaka
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Stelletta</i> sp. Desmospongiae <i>Teichaxinella</i> sp.	Sesquiterpenoids 2 Novel glycosyl benzenediols <i>N</i> -methylated peptides	<i>Anti-inflammatory Cytotoxicity against cancer cells</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2009 Izumikawa <i>et al.</i> , 2009 Boot <i>et al.</i> , 2006
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Tethya aurantium</i> (Pallas) <i>Geodia cydonium</i>	Phomenin A, B	<i>Phytotoxin</i>	Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Arthrimum</i> sp.	<i>Geodia cydonium</i> (Jameson, 1811)	Norlichexanthone, anomalin A	<i>Antitumor</i>	Ebada <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus insuetus</i> (Bainier) Thom and Church	<i>Petrosia ficiformis</i> (Poiret) <i>Psammocinia</i> sp.	Terretonins E, F Three novel meroterpenoids	<i>Inhibitors of mammalian mitochondrial respiratory chain</i> <i>Antifungal</i>	Lopez-Gresa <i>et al.</i> , 2009 Cohen <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus niger</i> van Tiegham	<i>Hyrtios</i> sp. <i>Axinella damicornis</i> (Esper)	Asperazine Aspernigrin B, bicoumanigrin	<i>Cytotoxicity</i> <i>Neuroprotective against glutamate, anticancer</i>	Varoglu <i>et al.</i> , 1997 Hiort <i>et al.</i> , 2004
<i>Aspergillus</i> spp.	Unidentified sponge Unidentified sponge <i>Tethya aurantium</i>	Tropolactones Compounds related to Roquefortine Sterigmatocystin Cinereain	<i>Cytotoxicity against human colon carcinoma</i> <i>Mycotoxin Plant growth regulator,</i>	Cueto <i>et al.</i> , 2006 Takagi <i>et al.</i> , 2010 Wiese <i>et al.</i> , 2011

	<i>Cliona chilensis</i> Thiele <i>Xestospongia testudinaria</i> (Kirkpatrick)	Stephacidin A Sydonic acid Aspochalasin Five new meroterpenoids Butyrolactone Three new phenolic bisabolane	<i>phytotoxin</i> <i>Cytotoxic</i> <i>Antibacterial</i> <i>Antibiotic, cytotoxic</i> <i>Antitumor</i> <i>Cytotoxic panel of tumor cell lines</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2011 San-Martin <i>et al.</i> , 2011 Sun <i>et al.</i> , 2012
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuillemin) Tiraboschi	<i>Petrosia</i> sp.	Fellutamide F	<i>Cytotoxicity against several tumor cell lines</i>	Lee <i>et al.</i> , 2010
<i>Clonostachys</i> sp.	<i>Tethya aurantium</i>	Bionectin B Verticillin C	<i>Antibacterial against MRSA</i> <i>Antibiotic</i>	Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn	<i>Niphates olemda</i> (de Laubenfels)	A new 1,3,8-trihydroxy-6-methoxyanthraquinone	<i>Antimicrobial</i>	Jadulco <i>et al.</i> , 2002
<i>Exophiala</i> sp.	<i>Halichondria panicea</i> (Pallas)	Chlorohydroaspirones A (1) and B (2)	<i>Antibacterial</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>Fusarium</i> sp.	Unidentified sponge <i>Tethya aurantium</i>	New β -resorcylic macrolide Equisetin Enniatine	<i>Antibacterial activity, inhibition of HIV-1 integrase</i> <i>Ionophore, insecticidal, ACAT inhibition, GABA receptor binding</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2008 Wiese <i>et al.</i> , 2011
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	<i>Petrosia</i> sp.	Two new α -pyrones		Elbandy <i>et al.</i> , 2009

2.3.5 Jamur Endofit *Penicillium oxalicum*

2.3.5.1 Klasifikasi

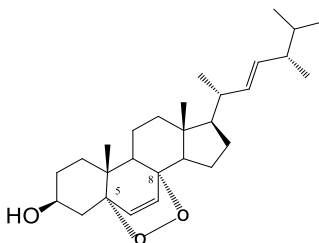
Kingdom	: Fungi
Ordo	: Eurotiales
Family	: Thrichocomaceae
Genus	: <i>Penicillium</i>
Spesies	: <i>P. oxalicum</i>



Gambar 2.7 *P. oxalicum*

2.3.5.2 Metabolit Sekunder dan Bioaktivitas

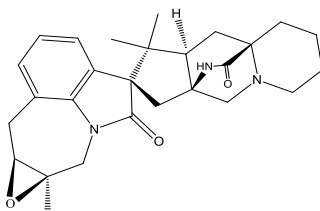
Menurut Kou *et al.*, (2005) senyawa ergosterol peroksida dari ekstrak metanol *P.oxalicum* menunjukkan aktivitas hambatan terhadap DNA Topoisomerase I yang berperan dalam ekspresi sel tumor dari sel normal sehingga berpotensi sebagai antikanker. Pada penelitian ini ergosterol peroksida (*5 α ,8 α -epidioxy-24(R)-metylcholesta-6,22-diene-3 β -ol*) menunjukkan aktivitas sitotoksik yang spesifik terhadap sel tumor kolon [COLO-205 (ED50) = 8,58 μ g/ml]



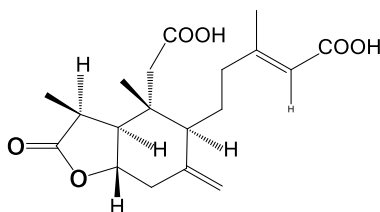
Gambar 2.8 Ergosterol peroksida (*5 α ,8 α -epidioxy-24(R)-metylcholesta-6,22-diene-3 β -ol*)

Endofit *P.oxalicum* juga dilaporkan menghasilkan metabolit *dihydrothiophene-condensed chromones* terhadap cell A375 dan SW-620 IC_{50} = 11.7 dan 22.6 μ M (Sun *et al.*, 2012). Hu *et al.*, (2014) dalam penelitiannya menemukan senyawa alkaloid baru *prenylated spiro-*

oxindole Penioxalamine A (bicycle [2.2.2] diazaoctane) dari *P. oxalicum* TW01-1 yang menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap HL-60 (*human promyelocytic leukemia cells*) dengan $IC_{50} = 28,12 \mu M$ (5-FU; $IC_{50} = 2,48 \mu M$). Bian *et al.*, (2015) kemudian melakukan isolasi metabolit sekunder dari jamur yang sama yaitu *P. oxalicum* TW01-1 dan diperoleh suatu senyawa baru Penioksalisin (*3-nor-2,3-seco-labdane diterpene*) yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap HL-60 (*human promyelocytic leukemia cells*) cell line dengan $IC_{50} = 73,02 \mu M$ (5-FU; $IC_{50} = 2,80 \mu M$)



Gambar 2.9 Penioxalamine A (*bicycle[2.2.2] diazaoctane*)



Gambar 2.10 Penioxalicin (*3-nor-2,3-seco-labdane diterpene*)

Penelitian terhadap potensi antibakteri *P. oxalicum* menunjukkan adanya zona hambat sebesar 12 mm pada jamur *Asperillus sydowii* (Zhang *et al.*, 2012). Dalam penelitian yang dilakukan Paul *et al.*, (2011) didapatkan hasil jamur endofit *P.oxalicum* dapat menghambat pertumbuhan dari jamur *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora sapsici*. *P.oxalicum* juga menunjukkan hasil positif pada pengujian aktivitas antimikroba menggunakan bakteri dengan jumlah 100 μg /disk menunjukkan zona hambat terhadap *Pseudomonas*

solanacearum, *Xanthomonas campestris*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* sementara pada pengujian aktivitas antimikroba dengan menggunakan jamur dilakukan perbedaan kuantitas ekstrak pada masing-masing disk yaitu: 100 µg/disk dan 50 µg /disk hasil yang diperoleh menunjukkan kedua ekstrak memberikan zona hambat. Pengujian dengan menggunakan jamur *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus candidus*, *Curvularia trifoli* menunjukkan peningkatan jumlah ekstrak memberikan zona hambat yang semakin lebar. Sementara pada *Penicillium griseofulvum* dan *Botrytis cynerea* zona hambat yang dihasilkan oleh *P.oxalicum* sama (Santamarina *et al.*, 2002).

2.4 Tinjauan Tentang Cara Penentuan Aktivitas Antimikroba

Untuk dapat mendeteksi aktivitas antimikroba suatu tanaman, ada tiga kondisi yang harus dipenuhi. Pertama, ekstrak tanaman harus kontak dengan dinding sel mikroorganisme. Kedua, kondisi harus diatur sedemikian rupa agar organisme dapat tumbuh pada media mengandung antimikroba. Ketiga, penggunaan antimikroba yang diujikan memberikan hasil yang berarti selama waktu yang diujikan (Berghe dan Vlietinck, 1991).

Aktivitas antimikroba dari tanaman dapat dideteksi dengan pengamatan respon pertumbuhan beberapa jenis mikroorganisme terhadap jaringan tanaman atau ekstrak yang dibiarkan kontak dengannya. Terdapat beberapa metode untuk menentukan aktivitas antimikroba namun hasil yang didapatkan tidak hanya tergantung pada metode yang digunakan tetapi juga tergantung pada mikroba uji. Secara umum dikatakan bahwa evaluasi biologis tersebut lebih efisien dilakukan terhadap senyawa yang larut air dan senyawa murni dibandingkan dengan

ekstrak (Berghe dan Vlietinck, 1991). Metode uji antimikroba dapat dikelompokkan sebagai berikut.

2.4.1 Metode Difusi

Metode ini umum digunakan untuk pengujian antimikroba pada zat murni, lebih dipertimbangkan untuk senyawa yang bersifat polar. Salah satu metode yang digunakan adalah metode disk dengan menggunakan cakram kertas filter yang diletakkan di permukaan media agar yang sebelumnya telah diinokulasi mikroorganisme uji. Agen antibakteri akan berdifusi dari kertas filter menuju media agar dan melakukan penghambatan pertumbuhan dan perkecambahan mikroorganisme yang diuji. Kemudian cawan diinkubasi pada kondisi yang sesuai dan diukur zona penghambatan pertumbuhan yang terbentuk. Dalam metode silinder, pada media agar ditempatkan silinder, *stainless steel* atau porselen ukuran seragam (biasanya 8mm x 6mm x 10mm) berisi sampel atau standar. Setelah inkubasi, silinder diambil dan diukur zona penghambatannya.

Pada metode difusi cetak lubang, dibuat lubang pada media agar dengan ukuran yang sama kemudian diisi dengan sampel yang diuji, senyawa akan berdifusi dan menyebabkan penghambatan pertumbuhan. Zona penghambatan dapat diukur setelah inkubasi. Metode difusi kurang cocok untuk menentukan MIC nilai-nilai dari yang pengenceran, karena tidak mungkin untuk mengukur jumlah senyawa uji yang menyebar ke media agar (Choma dan Grzelak, 2010).

2.4.2 Metode Dilusi

Dilusi padat dan dilusi cair adalah metode yang sering digunakan untuk menentukan kadar hambat minimum (KHM) dari suatu senyawa antimikroba. Kadar hambat minimum adalah konsentrasi terkecil dari

antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme setelah diinkubasi selama 24 jam. Pada dilusi padat suspensi bakteri dikultur pada media nutrient agar yang telah berisi antimikroba dengan konsentrasi yang berbeda. Sementara pada dilusi cair media yang digunakan adalah nutrien broth yang berisi antimikroba dengan konsentrasi yang meningkat secara geometris. Metode dilusi cair sendiri dibedakan menjadi makrodilusi dan mikrodilusi. Pada makrodilusi volume total yang digunakan 2 ml sementara pada mikrodilusi volume total $\leq 500 \mu\text{l/well}$. Sumuran pertama yang tidak menunjukkan kekeruhan dinyatakan sebagai KHM.

Selain dengan mengamati kekeruhan beberapa penelitian melakukan penentuan KHM pada uji mikrodilusi dengan spektrofometri, indikator rezasurin dye atau garam tetrazolium (Das *et al.*, 2010). Garam tetrazolium yang dapat digunakan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazolium bromide). Pada penambahan indikator MTT pertumbuhan sel bakteri dapat diamati dengan terbetuknya warna ungu pada *well plate*. MTT yang ditambahkan akan direduksi oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat dalam mitokondria sel hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu. 2,3,5-trifeniltetrazolium klorid (TTC) dan p-iodonitrotetrazolium violet (INT) juga merupakan garam tetrazolium yang dapat digunakan sebagai indikator sel hidup dimana kristal formazan yang dibentuk berwarna merah (Green dan Narahar, 1980).

2.4.3 Metode Bioautografi

Penerapan metode ini menggunakan kombinasi dengan kromatografi, dalam hal ini digunakan kromatografi lapis tipis. Keuntungan yang didapat dengan metode ini adalah terjadinya pemisahan komponen ekstrak setelah melalui kromatografi sehingga akan diketahui

aktivitas antimikroba dan antijamur senyawa yang relatif lebih spesifik dibandingkan dengan metode lainnya. Berdasarkan sifat antibakteri atau antijamur yang diamati, terdapat tiga macam cara bioautografi yaitu kontak, perendaman, dan langsung (Choma dan Grzelak, 2010).

2.4.3.1 Metode Bioautografi Kontak

Prosedur dalam metode bioautografi kontak mirip dengan metode difusi agar. Senyawa yang diuji ditempatkan di atas permukaan media pertumbuhan bakteri atau jamur selama beberapa jam menggunakan pelat kromatografi lapis tipis (KLT) yang telah diekspansi menggunakan fase gerak tertentu. Proses yang diharapkan adalah terjadinya difusi dari pelat KLT menuju media pertumbuhan bakteri atau jamur selanjutnya pelat KLT diambil dan aktivitas dalam menghambat pertumbuhan akan terlihat setelah dilakukan inkubasi pada media pertumbuhan bakteri atau jamur tersebut. Zona penghambatan pertumbuhan akan muncul di tempat kontak senyawa antibakteri dengan media uji (Choma dan Grzelak, 2010).

2.4.3.2 Metode Bioautografi Perendaman

Pada metode perendaman, merupakan metode gabungan antara metode bioautografi kontak dan metode bioautografi langsung. Pelat KLT yang telah diekspansi dengan fase gerak yang sesuai direndam atau ditutupkan pada media uji yang berisi bakteri atau jamur kemudian diinkubasi tanpa mengambil pelat KLT yang telah diletakkan pada media uji. Prinsip difusi senyawa dari pelat KLT menuju media uji sama seperti metode bioautografi kontak, namun pelat KLT tetap berada pada media uji selama proses inkubasi dan visualisasi seperti pada metode bioautografi langsung. Untuk memungkinkan difusi yang lebih baik dari senyawa yang diuji ke permukaan media uji, pelat KLT dapat didiamkan

dalam media uji pada suhu rendah selama beberapa jam sebelum inkubasi (Choma dan Grzelak, 2010).

2.4.3.3 Metode Bioautografi Langsung

Metode bioautografi langsung merupakan metode yang paling sering digunakan. Pada prinsipnya metode ini menggunakan pelat KLT yang telah dieluasi dengan fase gerak yang sesuai, dicelupkan pada suspensi bakteri atau jamur dengan konsentrasi tertentu kemudian diinkubasi. Permukaan pelat KLT dilapisi dengan media yang menjadi sumber nutrisi bagi bakteri atau jamur yang diujikan sehingga memungkinkan pertumbuhan secara langsung di atasnya. Aktivitas antimikroba atau antijamur terlihat ketika terbetuk zona hambatan pertumbuhan. Untuk memperlihatkan hasil uji, dilakukan visualisasi dengan menggunakan reagen yang mendeteksi aktivitas dehidrogenase seperti garam tetrazolium. Dehidrogenase mikroorganisme hidup mengubah garam tetrazolium menjadi formazan yang berwarna. Akibatnya, noda putih bintik-bintik muncul dengan latar belakang ungu pada permukaan pelat KLT, menunjukkan adanya aktivitas antibakteri atau antijamur (Choma dan Grzelak, 2010).

2.5 Tinjauan Tentang Ekstrak

2.5.1 Definisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan masa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. Ekstrak tumbuhan obat yang dibuat dari simplisia nabati dapat dipandang sebagai bahan awal, bahan antara atau bahan produk jadi (DepKes RI, 2009).

2.5.2 Faktor Yang Berpengaruh Pada Mutu Ekstrak

Faktor yang mempengaruhi mutu ekstrak terdiri atas faktor biologis dan faktor kimia. Faktor biologis yang mempengaruhi terdiri dari Species yang berperan dalam informasi generik yang dibawa, lokasi asal tumbuhan terkait dengan faktor eksternal seperti tanah, temperature, cuaca, air, dan faktor lain yang mempengaruhi. Sedangkan, faktor kimia yang mempengaruhi terdiri atas faktor internal seperti jenis senyawa aktif dalam bahan, komposisi kualitatif dan kuantitatif senyawa aktif, dan kadar total rata-rata, serta faktor eksternal meliputi metode ekstraksi, ukuran alat, bahan ekstraksi (ukuran, kekerasan, dan kekeringan), pelarut, kandungan logam berat dan kandungan pestisida (DepKes RI, 2009).

2.5.3 Metode ekstraksi

Metode yang dipergunakan untuk ekstraksi dapat mempengaruhi mutu ekstrak yang dihasilkan. Ada beberapa metode yang dapat dipergunakan, diantaranya adalah:

2.5.3.1 Cara Dingin

1. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperature kamar. Metode ini termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada kesetimbangan.

2. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada temperature kamar. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap

perkolasi sebenarnya (penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh perkolat yang jumlahnya 1-5 kali bahan.

2.5.3.2 Cara Panas

1. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperature titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relative konstan dengan adanya pendinginan balik. Umumnya dilakukan pengulangan 3-5 kali sehingga proses ekstraksi sempurna.

2. Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relative konstan dengan adanya pendingin balik.

2.5.3.3 Cara Lain

1. Ekstraksi Ultrasonik

Getaran ultrasonik (>20.000 Hz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelembung spontan sebagai stress dinamik serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekuensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi.

2. Superkritikal karbondioksida

Penggunaan prinsip superkritik untuk ekstraksi serbuk simplisia, dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan variable tekanan dan temperatur akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan tertentu. Penghilangan cairan pelarut dengan mudah dilakukan karena karbondioksida mudah menguap (DepKes RI, 2009).

2.6 Tinjauan Tentang Kultur Media Dan Organisme Uji

Sebagian besar bakteri tumbuh pada *Standart Mueller Hinton Agar* atau *Diagnostic Sensitivity Test Agar* (DST). Sedangkan, jamur umumnya tumbuh pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA). Mikroorganisme yang umum digunakan dalam pengujian aktivitas senyawa antimikroba antara lain adalah bakteri Gram negatif *E. coli*, bakteri Gram positif *B. subtilis* dan khamir *C. albicans*. Penggunaan mikroorganisme uji yang berasal dari kelompok berbeda dapat digunakan untuk mengetahui spektrum aktivitas dari suatu senyawa antimikroba (Wikler *et al.*, 2009).

2.6.1 *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Micrococcus
Marga	: <i>Staphylococcus</i>
Jenis	: <i>Staphylococcus aureus</i>

(Bailey, 1974)

S. aureus adalah bakteri fakultatif aerob yang memiliki sel berbentuk bola, gram positif, biasanya tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur. Pada biakan cair yang terlihat kokus tunggal, berpasangan, tetrad, dan berbentuk rantai. Kokus muda bersifat gram positif. Bakteri ini menginfeksi manusia terutama pada mukosa daerah nasal, saluran pernafasan atas, saluran cerna, dan kulit. Sifat khas infeksiya adalah pembentukan nanah. Keracunan makanan disebabkan oleh enterotoksin *Staphylococcus* ditandai oleh masa inkubasi 1-8 jam, mual-mual hebat, muntah, diare dan konvulsi (Ryan dan Ray, 2004).

2.6.2 *Eschericia coli*

Klasifikasi

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Enterobacteriaceae
Marga	: <i>Eschericia</i>
Jenis	: <i>Eschericia coli</i>

(Dwidjoseputro, 1987)

E. coli merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek berukuran $0,5 \mu\text{m} \times (1,0-3,0) \mu\text{m}$, mampu memfermentasi berbagai macam gula (glukosa, galaktosa, fruktosa, laktosa, maltosa) menghasilkan asam dan gas. Secara alami *E. coli* dapat ditemukan berada pada saluran pencernaan manusia. Secara biokimia, *E. coli* menunjukkan hasil positif dalam uji *Indol* dan *Methyl Red*, namun untuk uji *Voges Proskauer* dan uji sitrat hasilnya negatif. *E. coli* diketahui dapat menyebabkan infeksi pada saluran pencernaan manusia seperti penyakit diare dan muntah-muntah (Ryan dan Ray, 2004).

2.6.3 *Bacillus subtilis*

Klasifikasi

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Bacillaceae
Marga	: <i>Bacillus</i>
Jenis	: <i>Bacillus subtilis</i>

(Dwidjoseputro, 1987)

B. subtilis hidup pada kondisi aerobik dan memiliki pH optimum 5,5-8,5 dengan suhu optimum 20-45°C. *B. subtilis* termasuk bakteri gram positif, berbentuk batang silinder, dengan diameter 1 µm dan panjang 3-4 µm, lurus atau sedikit melengkung dengan ujung membulat tunggal atau membentuk rantai panjang, memfermentasi glukosa menghasilkan asam dan aseton, selain itu juga mampu menghidrolisis pati. *B. subtilis* menghasilkan racun ekstraseluler yang dikenal sebagai subtilisin. Meskipun sifat racun ini sangat rendah, senyawa protein ini mampu menyebabkan reaksi alergi pada inividu yang berulang kali terinfeksi bakteri (Jawetz *et al.*, 1986).

2.6.4 *Candida albicans*

Klasifikasi

Divisi	: Ascomycota
Kelas	: Saccaromycetes
Bangsa	: Saccaromycetales
Suku	: Saccaromycetaceae
Marga	: <i>Candida</i>
Jenis	: <i>Candida albicans</i>

(Novak, 2002)

C. albicans merupakan jamur dimorfik karena kemampuannya untuk tumbuh dalam dua bentuk yaitu tunas dan menghasilkan kecambah yang akan membentuk hifa semu. *C. albicans* berbentuk bulat hingga oval, memiliki diameter sel 3-6 µm dan memiliki koloni berwarna putih hingga krem (Barnett *et al.*, 2000). Jamur *C. albicans* adalah khamir yang dapat tumbuh pada lingkungan dengan kisaran pH 2-8. *Candida albicans* memiliki kemampuan memfermentasi berbagai jenis gula (glukosa, maltosa, sukrosa, dan xilosa). Khamir tersebut merupakan khamir dimorfik yang dapat tumbuh dalam fase uniselular atau fase filamen

tergantung pada kondisi lingkungan sekitarnya (Mc Creath *et al.*, 1994). Contoh media agar yang dapat digunakan untuk tumbuh adalah *sabouraud maltose* agar, *sabouraud dekstrose* agar, *czapex dox* agar, *brilliance candida* agar, *darmasel agar base*. *C. albicans* dapat menyebabkan infeksi mulut (sariawan) terutama pada bayi, pada vagina menyebabkan vulvovaginitis, infeksi pada kulit dan paru – paru (Jawetz *et al.*, 1986).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Uraian Kerangka Konseptual

Di negara-negara yang sedang berkembang urutan penyakit-penyakit utama nasional masih ditempati oleh berbagai penyakit infeksi (Nelwan, 2006). Penggunaan antimikroba secara tidak rasional memicu terjadinya resistensi terhadap antimikroba sehingga menyebabkan morbiditas dan mortalitas (Kemenkes RI, 2011). Beberapa kuman resisten antibiotik sudah banyak ditemukan di seluruh dunia (Stevenson *et al.*, 2005).

Oleh sebab itu, diperlukan alternatif dalam mengatasi masalah ini dengan memanfaatkan bahan-bahan aktif antimikroba baru. Spons merupakan salah satu biota laut yang dilaporkan menghasilkan berbagai senyawa bioaktif diantaranya sebagai antimikroba, antikanker, analgesik (Blunt *et al.*, 2009; Abubakar *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012). Schmidt *et al.*, (2009) menyatakan aktivitas biologi yang dihasilkan oleh spons dapat berasal dari mikroorganisme yang berasosiasi dengan spons (mikroba endofit).

Dalam penelitiannya Watermann, (1999) menyatakan bahwa mikroorganisme yang berasosiasi dengan organisme laut dapat mensintesa metabolit sekunder seperti organisme inangnya (Pringgenies, 2010). Mikroba endofit mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, terpen, steroid, flavonoid, kuinon, fenol dan lain sebagainya. Senyawa-senyawa ini sebagian besar mempunyai potensi yang besar sebagai senyawa bioaktif (Tan dan Zou, 2001).

Pada penelitian yang dilakukan Amade *et al.*, (1982) spons *Homaxinella trachys* menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap beberapa jenis bakteri Gram positif, Gram negatif dan jamur seperti *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Neisseria flava*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus morgani*, *Flavobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*.

Ekstrak etanol dari spons *Homaxinella cf. balfourensis* dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi dengan menurunkan pelepasan dari IL-1 β and PGE₂ pada konsentrasi 250 μ g/ml (Moles *et al.*, 2014). Dalam penelitiannya Mansoor melakukan ekstraksi spons *Homaxinella sp.* asal Pulau Jeju, Korea menggunakan metanol setelah dianalisis menggunakan NMR dan spektroskopi MS diperoleh beberapa senyawa sterol sitotoksik diantaranya: 6-*O*-alkylated sterols; 3 β ,5 α ,6 β -trihydroxy sterol; 5 α ,8 α -epidioxy sterols (Mansoor *et al.*, 2004).

Salah satu mikroorganisme yang ditemukan bersimbiosis dengan organisme laut adalah *Penicillium oxalicum* (Zhang *et al.*, 2012). Beberapa penelitian terkait potensi antimikroba dari *P. oxalicum* telah dilakukan diantaranya, *P. oxalicum* menunjukkan adanya zona hambat sebesar 12 mm pada jamur *Aspergillus sydowii* (Zhang *et al.*, 2012). Selain itu jamur endofit *P. oxalicum* dapat menghambat pertumbuhan dari jamur *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora sapsici* (Paul *et al.*, 2011). Endofit *P. oxalicum* juga memberikan hasil positif pada pengujian aktivitas antimikroba terhadap beberapa bakteri dan jamur diantaranya *Pseudomonas solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *E. coli*, *Aspergillus versicolor*, *A. candidus*, (Santamarina *et al.*, 2002).

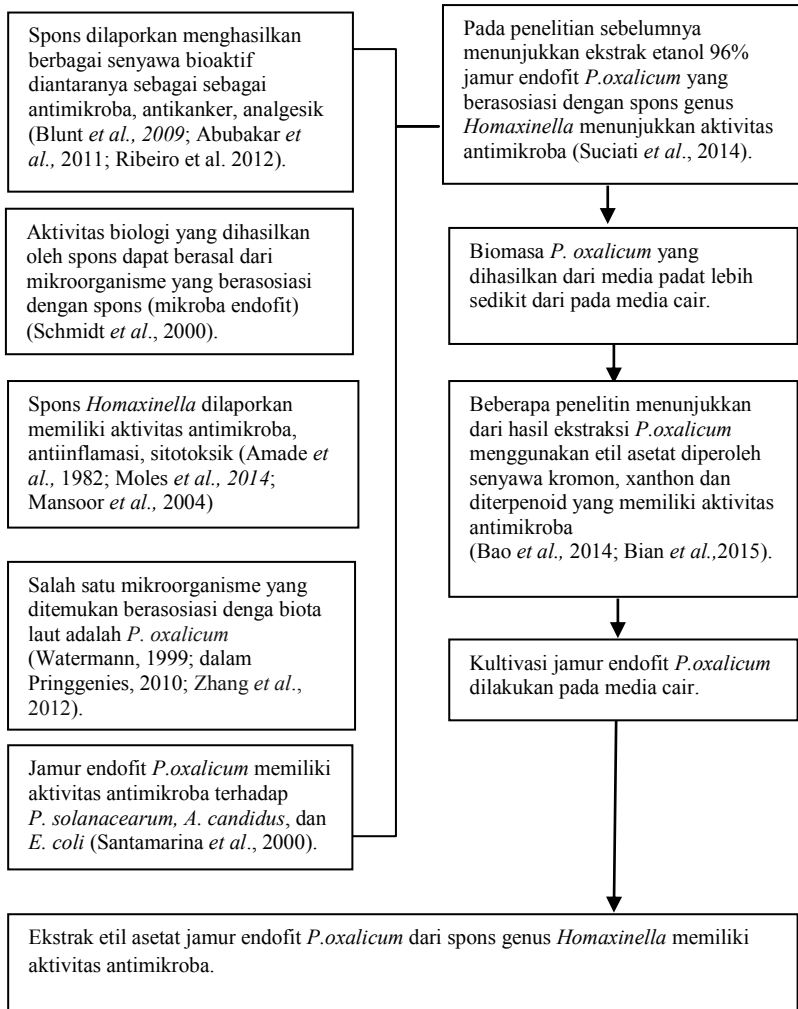
Pada penelitian sebelumnya Suciati *et al.*, (2014) telah melakukan isolasi jamur endofit *P. oxalicum* yang berasosiasi dengan

spons genus *Homaxinella*. Spons diperoleh dari perairan Pulau Barrang Lompo, Kecamatan Ujung Tanah, Makassar, Sulawesi Selatan, Indonesia. Berdasarkan hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etanol 96% menunjukkan hambatan pertumbuhan terhadap *S. aureus*, *E. coli* dan *V. Cholerae*.

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan diketahui bahwa *P. oxalicum* dapat ditumbuhkan pada media malt ekstrak padat maupun cair. Tetapi, ekstrak *P. oxalicum* yang dihasilkan dari media padat yang diekstraksi dengan etanol 96% lebih sedikit dibandingkan ekstrak yang diperoleh dari media cair yang diekstraksi dengan etil asetat. Beberapa penelitian menunjukkan dari hasil ekstraksi jamur *P. oxalicum* menggunakan etil asetat diperoleh senyawa kromon dan xanthon serta senyawa penioksalisin (*3-nor-2,3-seco-labdane diterpene*) yang dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba (Bao *et al.*, 2014; Bian *et al.*, 2015).

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etil asetat jamur endofit *P.oxalicum* dari spons genus *Homaxinella* memiliki aktivitas antimikroba.



Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Jamur Endofit

Jamur Endofit yang digunakan adalah *Penicillium oxalicum* strain FEC-128. Dari spons genus *Homaxinella* asal Pulau Barrang Lompo, Kecamatan Ujung Tanah, Makassar, Sulawesi Selatan, Indonesia, pada tanggal 17 Mei 2014. Identifikasi jamur endofit dilakukan oleh Balai Pengkajian Bioteknologi-BPPT Serpong, Tangerang, Indonesia tanggal 5 Oktober 2015. Jamur endofit tersebut kemudian dikultur pada media malt ekstrak yang dibuat dengan air laut buatan.

4.1.2 Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah n-heksana, metanol, etil asetat, barium klorida, asam sulfat (Merck), dimetilsulfoxid (DMSO), larutan kristal violet, larutan lugol, larutan safranin, pereaksi warna MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazolium bromid), siprofloksasin *pharmaceutical grade* (kontrol positif untuk bakteri), mikonazol *pharmaceutical grade* (kontrol positif untuk jamur), sabouraud dekstrosa agar, malt ekstrak, agar, nutrien broth.

4.1.3 Bakteri dan Jamur Uji

Bakteri yang akan diuji pada penelitian kali ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Sedangkan, jamur yang akan digunakan

untuk penelitian kali ini adalah *Candida albicans* ATCC 10231 yang diperoleh dari Unit Layanan Pengujian, Universitas Airlangga.

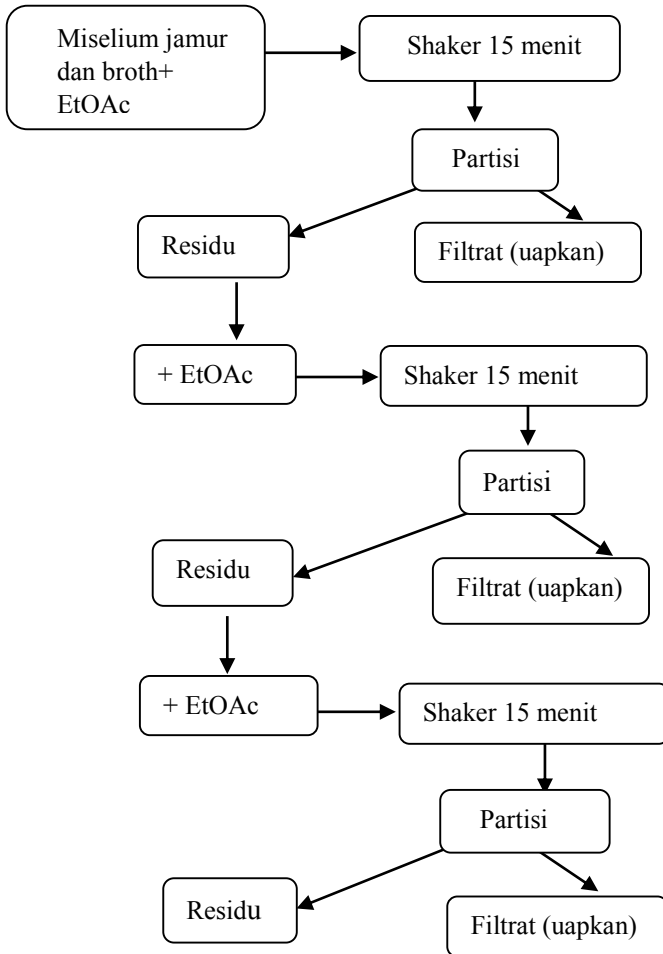
4.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah ultrasonik, *rotary evaporator*, *Laminary Air Flow Cabinet*, mikropipet, timbangan analitik, autoklaf, *96-well microtiter plates* steril, mikroskop, eppendorf steril, *vortex mixer*, spektrofotometer serta berbagai alat gelas.

4.3 Pelaksanaan Penelitian

4.3.1 Proses ekstraksi

Jamur endofit yang telah diisolasi dikultivasi pada media malt ekstrak yang dibuat dengan air laut buatan. Fermentasi dilakukan pada suhu (22-25°C) selama enam minggu. Pada akhir minggu ke enam dilakukan ekstraksi pada campuran miselium jamur dan broth dengan menggunakan etil asetat. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan *shaker* selama 15 menit tiap ekstraksi. Selanjutnya dipisahkan antara fase air dan etil asetat menggunakan corong pisah. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali. Selanjutnya filtrat dikumpulkan kemudian pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental.



→ ketiga filtrat dicampur dan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental.

Gambar 4.1 Skema ekstraksi

4.3.2 Penyiapan Media

4.3.2.1 Media Nutrien Agar

Media nutrient agar didapat dengan melarutkan 28 g nutrient agar dalam 1000 ml aquades kemudian dilarutkan dan dipanaskan sampai melarut sempurna. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, tekanan 1 atm.

4.3.2.2 Media Sabouraud Dekstrosa Agar

Media sabouraud dextrose agar didapat dengan memanaskan 65 g sabouraud dekstrosa agar dalam 1000 ml aquadest. Pengadukan dilakukan hingga satu menit setelah mendidih agar didapatkan medium yang terlarut secara sempurna. Kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, tekana 1 atm.

4.3.2.3 Media Nutrien Broth

Media nutrient broth didapat dengan memanaskan 8 g nutrien broth dalam 1000 ml aquadest dengan pengadukan hingga satu menit setelah mendidih agar didapatkan medium yang terlarut secara sempurna. Kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, tekana 1 atm.

4.3.3 Kultivasi Mikroba Uji

Diambil sejumlah tertentu koloni mikroba uji dengan ose dari biakan persediaan, kemudian masing-masing koloni dibiakkan dalam media nutrien agar (untuk bakteri) dan media sabouraud dekstrosa agar (untuk jamur). Kultur bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sedangkan, kultur jamur diinkubasi pada suhu 25°C selama 48 jam (Ilic *et al.*, 2015).

4.3.4 Pembuatan Suspensi Mikroba

Suspensi mikroorganisme dibuat setara dengan standar 0,5 McFarland. Berdasarkan metode dari *Clinical and Laboratory Standard Institute*, pembuatan standar 0,5 McFarland dilakukan dengan mencampur barium sulfat dari 0,5 ml barium klorida 0,048 M dan 99,5 ml asam sulfat 0,18 M kemudian mengukur absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm. Rentang absorbansi dari suspensi standar 0,5 McFarland yang dibuat harus berkisar antara 0,08 - 0,13.

Suspensi dibuat dengan membandingkan tingkat kekeruhan dari masing-masing suspensi dengan standar 0,5 McFarland secara visual kemudian dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625nm dan absorbansi yang didapatkan harus berada pada rentang yang telah ditetapkan (0,08-0,13). Jumlah koloni yang terkandung dalam suspensi dapat ditentukan dengan konversi terhadap standar 0,5 McFarland jumlah koloni $1-2 \times 10^8$ CFU/ml (Wikler *et al.*, 2009) untuk uji difusi.

Untuk uji dengan metode dilusi suspensi mikroba yang setara dengan standar 0,5 McFarland dengan jumlah koloni $1-2 \times 10^8$ CFU/ml kemudian dipipet sebanyak 1 ml dan ditambahkan dengan 9 ml media nutrisi broth sehingga diperoleh suspensi mikroba dengan jumlah koloni $1-2 \times 10^7$ CFU/ml. Suspensi harus digunakan kurang dari 30 menit setelah pembuatan (Andrews., 2006).

4.3.5 Pembuatan Pereaksi Warna MTT

Pereaksi warna yang digunakan pada uji dilusi adalah pereaksi MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazolium bromid) dengan kadar 0,2 mg/ml. Larutan dibuat dengan menimbang 10 mg MTT kemudian dilarutkan dengan aquades steril ad 50 ml.

4.3.6 Pembuatan Larutan Uji Difusi

Pada uji difusi digunakan larutan uji dengan konsentrasi 10.000 ppm sebanyak 50 µl pada masing-masing disk. Larutan uji dibuat dengan menimbang 30 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 ml etil asetat.

4.3.7 Pembuatan Larutan Uji Dilusi

Pada uji dilusi digunakan larutan uji dengan delapan macam konsentrasi yaitu: 10.000 ppm, 7.500 ppm, 5.000 ppm, 2.500 ppm, 2.000 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, dan 200 ppm sebanyak 50µl pada masing-masing sumuran.

(1) Pembuatan larutan ekstrak uji 10.000 ppm

Ditimbang 30 mg ekstrak uji dilarutkan dengan 3 ml DMSO 5%, kemudian ultrasonik sampai larut sempurna sehingga didapatkan larutan induk dengan kadar 10.000 ppm.

(2) Pembuatan larutan ekstrak uji 7.500 ppm

Dari larutan uji konsentrasi 10.000 ppm diambil menggunakan mikropipet 750 µl + DMSO 5% 250 µl

(3) Pembuatan larutan ekstrak uji 5.000 ppm

Dari larutan uji konsentrasi 10.000 ppm diambil menggunakan mikropipet 500 µl + DMSO 5% 500 µl

(4) Pembuatan larutan ekstrak uji 2.500 ppm

Dari larutan uji konsentrasi 10.000 ppm diambil menggunakan mikropipet 250 µl + DMSO 5% 750 µl

(5) Pembuatan larutan ekstrak uji 2.000 ppm

Dari larutan uji konsentrasi 10.000 ppm diambil menggunakan mikropipet 200 µl + DMSO 5% 800 µl

(6) Pembuatan larutan ekstrak uji 1.000 ppm

Dari larutan uji konsentrasi 10.000 ppm diambil menggunakan mikropipet 100 µl + DMSO 5% 900 µl

(7) Pembuatan larutan ekstrak uji 500 ppm

Dari larutan uji konsentrasi 10.000 ppm diambil menggunakan mikropipet 50 μl + DMSO 5% 950 μl .

(8) Pembuatan larutan ekstrak uji 200 ppm

Dari larutan uji konsentrasi 10.000 ppm diambil menggunakan mikropipet 20 μl + DMSO 5% 980 μl .

4.3.8 Pewarnaan Gram Bakteri Uji

Gelas objek dibersihkan dengan alkohol 70% dan diberi aquades, kemudian dipanaskan di atas nyala api. Diambil secara aseptik satu ose biakan bakteri, diratakan pada kaca objek dan difiksasi di atas nyala api. Kemudian ditetesi dengan larutan kristal violet (Gram A), dan didiamkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya ditetesi dengan larutan yodium (Gram B) dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan.

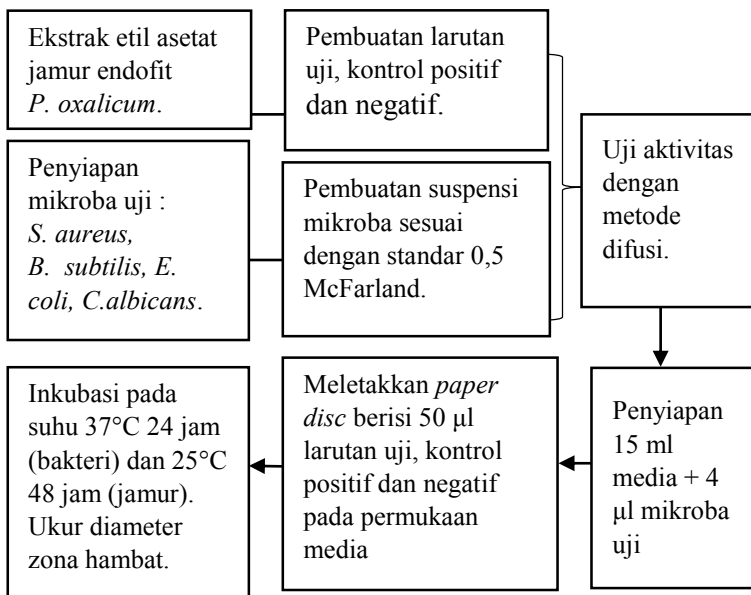
Kemudian dicuci dengan larutan pemucat/alkohol (Gram C) selama 30 detik, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Setelah itu ditetesi dengan larutan safranin (Gram D) atau zat penutup dan didiamkan selama 2 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya diamati dengan menggunakan mikroskop pada pembesaran kuat. Indikasi pewarnaannya yaitu bakteri Gram positif akan berwarna violet dan bakteri Gram negatif akan berwarna merah. Diamati pula bentuk dari sel bakteri tersebut apakah bulat (*coccus*), batang (*basil*), maupun bergelombang (*spiral*) (Lim., 1998).

4.3.9 Uji Aktivitas Antimikroba Dengan Metode Disk Difusi

Kontrol positif untuk uji antibakteri digunakan larutan 50 $\mu\text{g/ml}$ siprofloksasin dalam metanol, dan larutan 100 $\mu\text{g/ml}$ mikonazol dalam etanol untuk uji antijamur. Sedangkan untuk kontrol negatif digunakan etil asetat. Pada uji aktivitas digunakan larutan ekstrak dengan konsentrasi

10.000 ppm dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Cawan petri sebelumnya telah diisi dengan media yang berisi 4 μ l suspensi mikroba setara dengan 0,5 McFarland dikeringkan selama 10-15 menit pada suhu kamar.

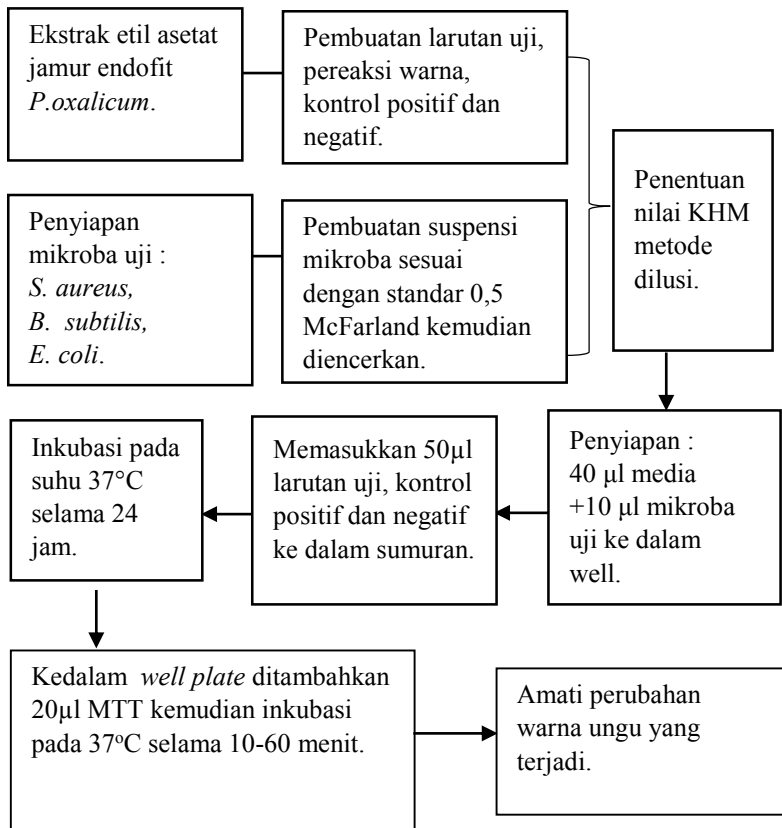
Setelah permukaan media kering, *paper disc* dengan diameter 6 mm masing-masing diinjeksikan 50 μ l kontrol positif, kontrol negatif, dan larutan sampel ekstrak kemudian diletakkan dipermukaan media (Quiroga *et al.*, 2001). Selanjutnya inkubasi pada 37°C selama 24 jam untuk bakteri sedangkan kultur jamur diinkubasi pada suhu 25°C selama 48 jam (Ilic *et al.*, 2015). Hambatan pertumbuhan oleh sampel ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar disk. Zona bening yang terbentuk di sekitar disk diukur dengan jangka sorong sebanyak tiga kali pada tiga bagian yang berbeda.



Gambar 4.2 Skema kerja penentuan aktivitas antimikroba.

4.3.10 Penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) Dengan Metode Dilusi

Larutan uji yang sudah disiapkan masing - masing diambil sebanyak 50 µl kemudian dimasukkan ke dalam *96-well plates* yang telah berisi 10 µl mikroba uji yang sesuai dan 40 µl media sesuai dengan labelnya. Sehingga diperoleh jumlah koloni mikroba dalam sumuran sebanyak $1-2 \times 10^6$ CFU/ml. Konsentrasi sampel uji menjadi setengah dari konsentrasi awal replikasi dilakukan empat kali. Selanjutnya, *96-well plates* diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Amati apakah terjadi kekeruhan pada sumuran. Kemudian kedalam sumuran ditambahkan 20 µl MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazolium bromid) yang dilarutkan dalam aquades steril lalu inkubasi selama 10-60 menit pada 37°C. (Ilic *et al.*, 2015). Apabila terjadi kekeruhan disertai dengan perubahan warna menjadi ungu setelah penambahan MTT menandakan adanya pertumbuhan sel bakteri.



Gambar 4.3 Skema kerja penentuan KHM

4.3.11 Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit *P. oxalicum*

4.3.11.1.1 Skrining Untuk Golongan Terpenoid

- Sedikit ekstrak ditambah beberapa tetes etil asetat, diaduk sampai larut, kemudian ditotolkan pada fase diam.
- Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan:

Fase diam : Kiesel gel GF 254

Fase gerak : n-heksana – etil asetat (6:4)

Penampak noda : Pereaksi anisaldehida asam sulfat

- c. Adanya terpenoid atau steroid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah ungu atau ungu. (Anonim, 2013).

4.3.11.2 Skringing Untuk Golongan Flavonoid

- a. Sedikit ekstrak ditambah beberapa tetes etil asetat, diaduk sampai larut, kemudian ditotolkan pada fase diam.
- b. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan:
 - Fase diam : Kiesel gel GF 254
 - Fase gerak : n-heksana – etil asetat (6:4)
 - Penampak noda : Pereaksi uap amoniak
- c. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan terjadinya warna kuning intensif.

4.3.11.3 Skringing Untuk Golongan Polifenol

- a. Sedikit ekstrak ditambah beberapa tetes etil asetat, diaduk sampai larut, kemudian ditotolkan pada fase diam.
- b. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan:
 - Fase diam : Kiesel gel GF 254
 - Fase gerak : n-heksana – etil asetat (4:6)

 - Penampak noda : FeCl_3
- c. Adanya polifenol ditunjukkan dengan terjadinya warna hitam.

4.3.11.4 Skringing Untuk Golongan Alkaloid

- a. Timbang sebanyak 0,3 g masukkan dalam tabung reaksi tambahkan 5 ml HCl 2N kemudian panaskan di atas penangas air selama 2-3 menit sambil diaduk. Setelah dingin tambahkan 0,3 g NaCl diaduk rata kemudian disaring. Filtrat ditambah 5 HCL 2N

kemudian tambahkan NaOH 28% sampai larutan menjadi basa. Cek dengan kertas lakmus jika filtrat sudah basa maka lakmus merah akan berubah menjadi warna biru. Larutan diekstraksi dengan kloroform bebas air lalu disaring. Filtrat diuapkan sampai kering lalu dilarutkan dalam metanol, kemudian ditotolkan pada fase diam.

- b. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan:
 - Fase diam : Kiesel gel GF 254
 - Fase gerak : metanol – etil asetat – air (16,5 : 100 : 13,5)
 - Penampak noda : Pereaksi Dragendorf
- c. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terjadinya warna jingga.

4.3.11.5 Skrining Untuk Golongan Antrakinin

- a. Sedikit ekstrak ditambah beberapa tetes etil asetat, diaduk sampai larut, kemudian ditotolkan pada fase diam.
- b. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan:
 - Fase diam : Kiesel gel GF 254
 - Fase gerak : n-heksana – etil asetat (6:4)
 - Penampak noda : larutan 10% KOH dalam metanol
- c. Adanya antrakinin ditunjukkan dengan timbulnya warna kuning coklat, kuning, merah ungu atau hijau ungu.

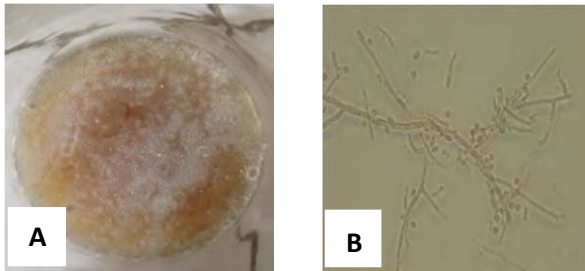
BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis Jamur Endofit

P. oxalicum

Jamur endofit *P. oxalicum* dikultivasi pada media malt ekstrak agar kemudian diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x



Gambar 5.1 A (gambar makroskopis jamur endofit *P. oxalicum*), B (gambar mikroskopis jamur endofit *P. oxalicum*).

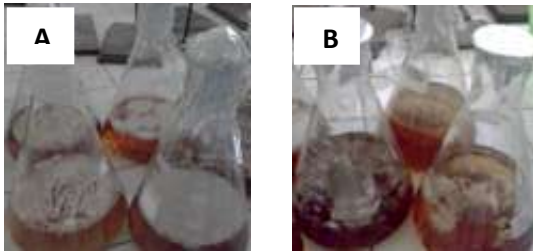
5.2 Hasil Identifikasi Jamur Endofit *P. oxalicum* dan Spons Genus

Homaxinella

Sertifikat Hasil uji jamur endofit *P. oxalicum* dan hasil BLAST analisis tersaji pada lampiran 1 dan 2. Hasil identifikasi spons genus *Homaxinella* pada lampiran 3.

5.3 Hasil Ekstraksi Jamur Endofit *P. oxalicum*

Jamur endofit *P. oxalicum* dari spons genus *Homaxinella* dikultivasi selama 6 minggu pada media cair malt ekstrak. Volume media yang digunakan masing-masing sebanyak 500 ml dalam Elenmayer 1 L. Untuk menghasilkan ekstrak kental dengan berat 1,9458 gram dibutuhkan 24 L jamur dan broth (48 Erlenmayer) hasil kultivasi dapat dilihat pada gambar 5.2.



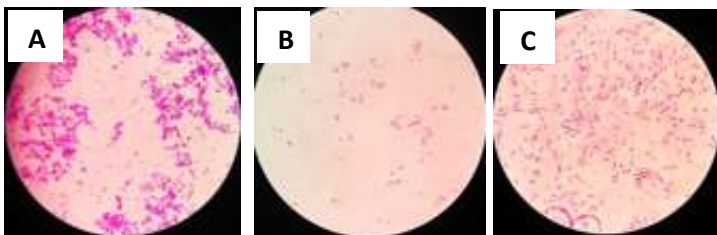
Gambar 5.2 Hasil kultivasi jamur endofit *P. oxalicum* pada media cair malt ekstrak usia 6 minggu. A (sebelum penambahan etil asetat), B (setelah penambahan etil asetat).

5.4 Preparasi Ekstrak Untuk Sampel

Sebanyak 500 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 ml etil asetat kemudian disaring dengan kertas saring. Larutan selanjutnya diuapkan dalam lemari asam kemudian dioven pada suhu 40°C hingga diperoleh berat konstan 149,8 mg.

5.5 Hasil Pewarnaan Gram Bakteri Uji

Pewarnaan Gram dilakukan dengan pemberian larutan kristal violet, lugol, alkohol, dan safranin. Koloni bakteri Gram positif akan berwarna violet/ungu, dan koloni bakteri Gram negatif akan berwarna merah jingga. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop perbesaran 1000x.



Gambar 5.3 Hasil pewarnaan Gram bakteri A (*S. aureus*), B (*E. coli*), dan C (*B. subtilis*).

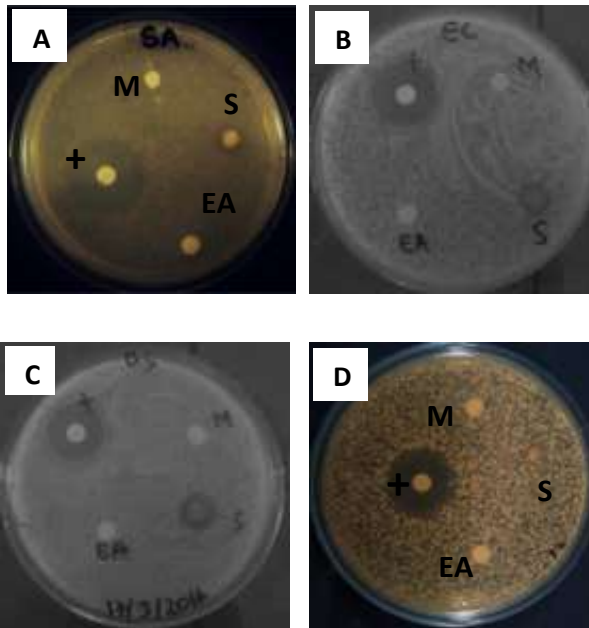
5.6 Uji Aktivitas Antimikroba Dengan Metode Difusi

Uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* dilakukan pada konsentrasi 500 µg/disk dan diperoleh hasil positif terlihat pada gambar 5.4. Selanjutnya diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong sebanyak tiga kali pada sisi yang berbeda. Data hasil pengukuran disajikan pada lampiran 4. Rata-rata hasil pengukuran diameter zona hambat disajikan pada tabel V.1.

Tabel V.1 Hasil pengujian ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* konsentrasi 500 µg/disk terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633 dan jamur *C. albicans* ATCC 10231.

Mikroba Uji	Diameter Hambatan (mm)							
	Ekstrak Etil Asetat				+ S	+ Mi	- E A	- M
	Replikasi							
	I	II	III	$\bar{X} \pm SD$				
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10,2	10,1	11,13	10,5 ± 0,6	26,4	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	12,8	13,1	11,9	12,6 ± 0,6	20,1	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	11,3	11,8	10,6	11,2 ± 0,6	20,8	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	0 ± 0	-	19,7	-	-

Keterangan: EA: Etil asetat, M: Metanol, S: Siprofloksasin, Mi: Mikonazol, +: kontrol positif, -: kontrol negatif.



Gambar 5.4 Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* konsentrasi 500 $\mu\text{g}/\text{disk}$ A (*S. aureus*), B (*E. coli*), C (*B. subtilis*), dan D (*C. albicans*).

5.7 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Dengan Metode Dilusi

Ekstrak etil asetat jamur *P. oxalicum* dilarutkan dengan DMSO 5% kemudian dibuat menjadi delapan macam konsentrasi yaitu: 10000 ppm, 7500 ppm, 5000 ppm, 2500 ppm, 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, dan 200 ppm. Kedalam sumuran dimasukkan masing-masing larutan sampel sebanyak 50 μl selanjutnya ditambah dengan media dan bakteri uji yang sesuai hingga volume total dalam sumuran menjadi 100 μl . Sehingga konsentrasi akhir sampel pada masing-masing sumuran menjadi 5.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3.750 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2.500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

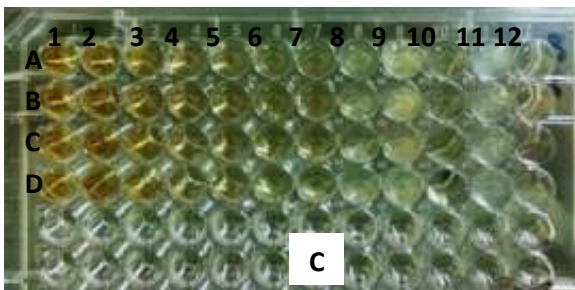
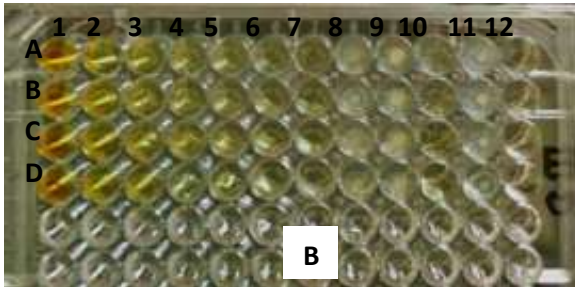
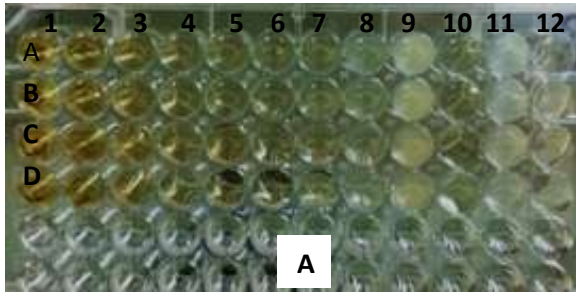
Masing-masing sumuran diamati apakah terjadi kekeruhan yang menandakan pertumbuhan bakteri. Selanjutnya kedalam sumuran ditambahkan pereaksi warna MTT yang akan membentuk warna ungu bila terdapat pertumbuhan bakteri. Dari hasil pengamatan seperti terlihat pada gambar 5.5 sebelum penambahan MTT dan gambar 5.6 setelah penambahan MTT, pada uji dengan menggunakan bakteri *B. subtilis* dan *E. coli* konsentrasi 100 µg/ml tidak menghambat pertumbuhan bakteri ditandai dengan terjadi kekeruhan atau terbentuk warna ungu pada sumuran. Sementara pada uji menggunakan bakteri *S. aureus* kekeruhan atau terbentuknya warna ungu masih terlihat pada konsentrasi 250 µg/ml dan 100 µg/ml.

Tabel V.2 Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* dengan metode dilusi dan penambahn pereaksi warna MTT.

Konsentrasi (µg/ml)	Kekeruhan/Warna Ungu											
	SA				EC				BS			
	R I	R II	R III	R IV	R I	R II	R III	R IV	R I	R II	R III	R IV
5.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.750	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
250	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan:

+: keruh/berubah menjadi warna ungu, -: jernih/ tidak berubah warna, KP: kontrol pertumbuhan, KM: kontrol media, K+: Kontrol positif siprofloksasin 25 ppm K-: kontrol negatif DMSO 2,5%, R I: replikasi 1, R II: replikasi 2, R III: replikasi 3, R IV: replikasi.



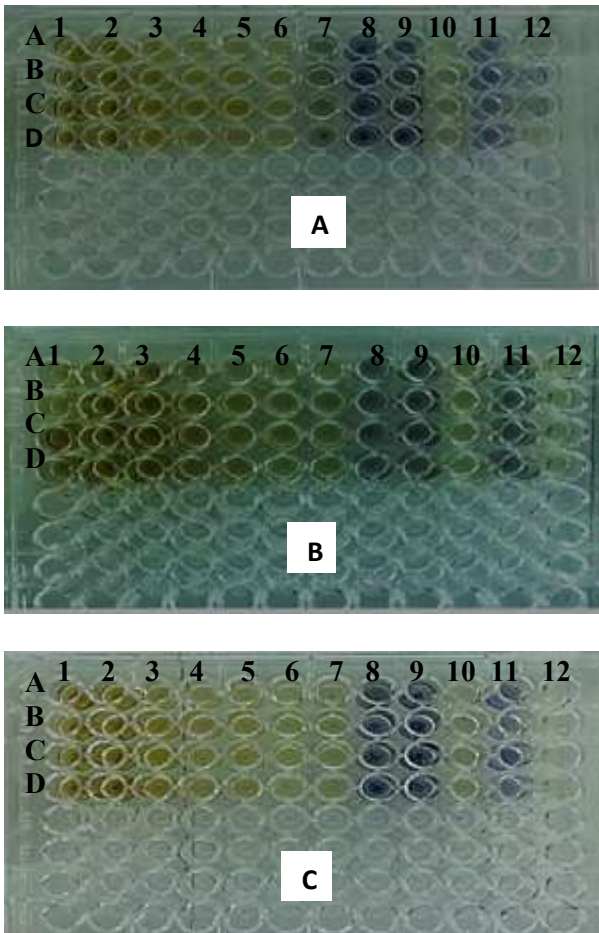
Gambar 5.5 Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat jamur endofit *P.oxalicum* secara dilusi pada bakteri uji A (*S.aureus*), B (*E. coli*), C (*B. subtilis*).

Keterangan:

A, B, C, D: replikasi.

1-8 (konsentrasi sampel uji)

1: 5.000 $\mu\text{g/ml}$, 2: 3.750 $\mu\text{g/ml}$, 3: 2.500 $\mu\text{g/ml}$, 4: 1.250 $\mu\text{g/ml}$, 5: 1.000 $\mu\text{g/ml}$, 6: 500 $\mu\text{g/ml}$, 7: 250 $\mu\text{g/ml}$, 8: 100 $\mu\text{g/ml}$, 9: kontrol pertumbuhan, 10: kontrol media, 11: kontrol negatif DMSO 2,5% , 12: kontrol positif siprofloksasin 25 ppm.



Gambar 5.6 Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* secara dilusi setelah penambahan MTT pada mikroba uji A (*S.aureus*), B (*E. coli*), C (*B. subtilis*).

Keterangan:

A, B, C, D: replikasi.

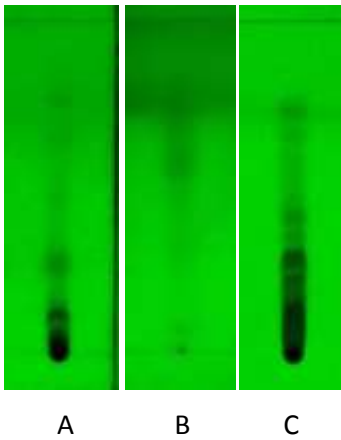
1-8 (konsentrasi sampel uji)

1: 5.000 $\mu\text{g/ml}$, 2: 3.750 $\mu\text{g/ml}$, 3: 2.500 $\mu\text{g/ml}$, 4: 1.250 $\mu\text{g/ml}$, 5: 1.000 $\mu\text{g/ml}$, 6: 500 $\mu\text{g/ml}$, 7: 250 $\mu\text{g/ml}$, 8: 100 $\mu\text{g/ml}$, 9: kontrol pertumbuhan, 10: kontrol media, 11: kontrol negatif DMSO 2,5% , 12: kontrol positif siprofloksasin 25 ppm.

5.8 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit *P. oxalicum*

5.8.1 Skrining Senyawa Flavonoid, Alkaloid, Antrakinin, Terpenoid, dan Polifenol.

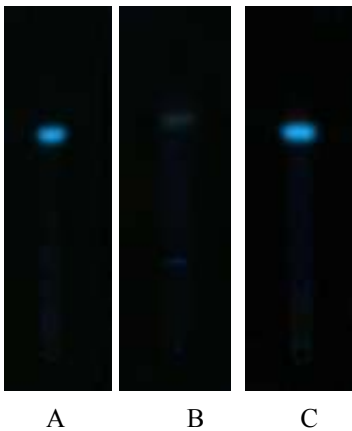
Pada skrining fitokimia ini digunakan eluen n-heksana : etil asetat (6 : 4) untuk skrining senyawa golongan flavonoid, antrakinin dan terpenoid. Untuk skrining senyawa golongan alkaloid digunakan eluen metanol – etil asetat – air (16,5 : 100 : 13,5) sementara skrining senyawa golongan polifenol menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (4 : 6). Uji flavonoid menunjukkan hasil negatif ditandai dengan tidak munculnya noda berwarna kuning intensif setelah plat KLT diberi penampakan uap amonia. Pada uji alkaloid dan antrakinin yang masing-masing menggunakan penampakan noda Dragendorff dan larutan 10% KOH dalam metanol juga memberikan hasil negatif dengan tidak terbentuknya warna jingga pada uji alkaloid dan kuning coklat pada uji antrakinin. Pada uji terpenoid menggunakan penampakan noda anisaldehyda asam sulfat menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya merah ungu. Uji polifenol juga memberikan hasil positif dengan munculnya noda berwarna hitam setelah disemprot dengan penampakan noda FeCl_3 .



Keterangan:

- A. Skrining senyawa golongan flavonoid, terpenoid, antrakinon dengan eluen n-heksana : etil asetat (6 : 4).
- B. Skrining senyawa golongan alkaloid dengan eluen metanol – etil asetat – air (16,5 : 100 : 13,5).
- C. Skrining senyawa golongan polifenol dengan eluen n-heksana : etil asetat (4 : 6).

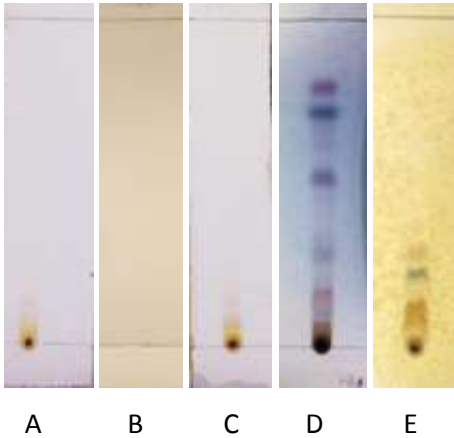
Gambar 5.7 Hasil KLT ekstrak setelah dieluasi dan dilihat di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm.



Keterangan:

- A. Skrining senyawa golongan flavonoid, terpenoid, antrakinon dengan eluen n-heksana : etil asetat (6 : 4).
- B. Skrining senyawa golongan alkaloid dengan eluen metanol- etil asetat – air (16,5 : 100 : 13,5).
- C. Skrining senyawa golongan polifenol dengan eluen n-heksana : etil asetat (4 : 6).

Gambar 5.8 Hasil KLT ekstrak setelah dieluasi dan dilihat di bawah lampu UV pada panjang gelombang 366 nm.



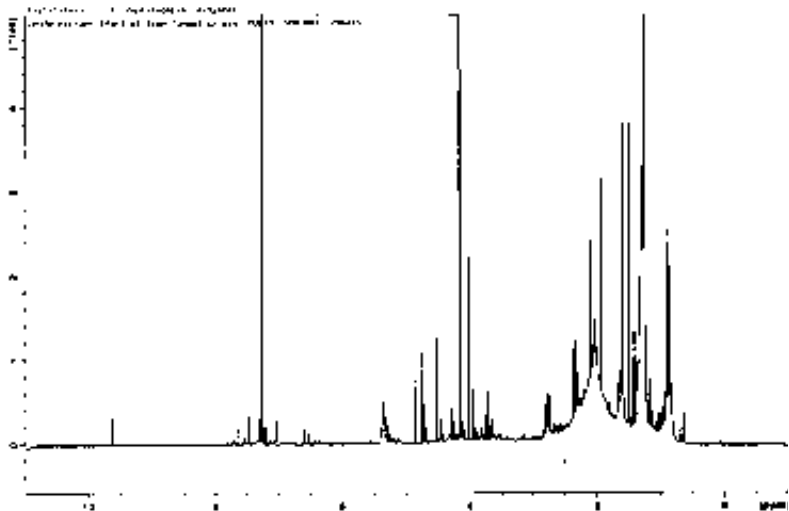
Keterangan:

- A. Skrining senyawa golongan flavonoid (uap ammonia)
- B. Skrining senyawa golongan alkaloid (Dragendorf)
- C. Skrining senyawa golongan antrakinon (larutan KOH 10% dalam metanol)
- D. Skrining senyawa golongan terpenoid (anisaldehida asam sulfat)
- E. Skrining senyawa golongan polifenol (FeCl_3)

Gambar 5.9 Hasil KLT setelah dieluasi dan disemprot dengan penampak noda.

5.9 $^1\text{H-NMR}$ Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit *P. oxalicum*

Eluen yang digunakan adalah *deuterated chloroform* (CDCl_3). Spektrum diukur pada Bruker Avance 500 dengan probe SEI 5 mm.



Gambar 5.10 Spektrum $^1\text{H-NMR}$ ekstrak etil asetat jamur endofit *P.oxalicum*

BAB VI

PEMBAHASAN

Jamur endofit diketahui menghasilkan berbagai macam metabolit yang memiliki aktivitas biologi salah satunya sebagai antimikroba. *Penicillium oxalicum* merupakan salah satu jamur endofit yang berasosiasi dengan spons genus *Homaxinella*. Endofit *P. oxalicum* juga ditemukan berasosiasi dengan gorgonian *Muricella flexuosa* dan menghasilkan senyawa sitotoksik (Sun *et al.*, 2013). Selain dengan biota laut jamur endofit *P. oxalicum* juga ditemukan berasosiasi dengan tumbuhan *Juniperus procera* dan kopi serta dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba (Gherbawy *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014).

Sebelumnya telah dilakukan penelitian terhadap aktivitas antibakteri *P. oxalicum* dari spons genus *Homaxinella* asal Pulau Barrang Lompo. Jamur endofit dikultivasi pada media malt ekstrak agar kemudian ekstrak diuji dengan menggunakan metode difusi. Didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol jamur endofit *P. oxalicum* memberikan hambatan terhadap pertumbuhan bakteri uji. Zona hambat yang dihasilkan sebesar 11,00 mm pada konsentrasi 60 µg/disk dan 13,61 mm pada konsentrasi 120 µg/disk terhadap *S. aureus*. Zona hambat yang terbentuk pada bakteri *E. coli* sebesar 10,00 mm pada konsentrasi 60 µg/disk dan 13,56 mm pada konsentrasi 120 µg/disk (Suciati *et al.*, 2014). Dikarenakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur endofit dipengaruhi oleh faktor fisika dan kimia seperti sumber karbon, nitrogen, pH, cahaya dan temperature. Sehingga perbedaan tempat tumbuh dan media pertumbuhan akan mempengaruhi metabolit sekunder dan aktivitas yang dihasilkan jamur endofit (Yu dan Kaller, 2005).

Berdasarkan hal tersebut maka membuka peluang untuk dilakukan penelitian terkait aktivitas antimikroba jamur endofit *P. oxalicum* dari spon genus *Homaxinella* asal Pulau Barrang Lompo, Kecamatan Ujung Tanah, Makassar, Sulawesi Selatan, Indonesia. Kultivasi *P. oxalicum* dilakukan pada media cair selama enam minggu selanjutnya dilakukan ekstraksi cair-cair. Hal yang perlu diperhatikan pada proses ekstraksi cair-cair adalah diluen dan solven harus *immiscible* dan solut memiliki kelarut yang besar dalam solven (Wankat, 1988). Pada penelitian ini digunakan pelarut pengekstraksi etil asetat yang *immiscible* dengan air dan dapat melarutkan metabolit sekunder dari jamur endofit *P. oxalicum*. Beberapa penelitian juga menunjukkan ekstraksi *P. oxalicum* dengan etil asetat menghasilkan senyawa baru diantaranya kromon, xanthon dan senyawa penioksalisin (*3-nor-2,3-seco-labdane diterpene*) yang memiliki aktivitas antimikroba (Bao *et al.*, 2014; Bian *et al.*, 2015).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimikroba dan menentukan kadar hambat minimum (KHM) serta golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* dari spons genus *Homaxinella*. Jamur endofit diperoleh dengan melakukan kultivasi di laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Jamur yang telah dikultivasi pada media malt ekstrak selama enam minggu selanjutnya diamati secara mikroskopis. Sebanyak 1 ose jamur endofit *P. oxalicum* diletakkan di atas objek gelas yang sudah berisi sedikit air kemudian diamati. Dari hasil pengamatan mikroskopi terdapat miselia dan spora terlihat jelas. Selanjutnya jamur endofit diidentifikasi oleh Balai Pengkajian Bioteknologi-BPPT Serpong, Tangerang, Indonesia. Identifikasi dilakukan menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) – 28S-rRNA kemudian BLAST analisis. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa jamur endofit adalah *Penicillium oxalicum* strain FEC-128.

Dari hasil kultivasi jamur endofit *P. oxalicum* sebanyak 24 L media malt ekstrak (48 Erlenmayer) yang kemudian diekstraksi dengan etil asetat diperoleh 1,9458 g ekstrak kental. Ekstrak kemudian dioven selama empat hari hingga diperoleh berat konstan. Pada penelitian ini digunakan mikroba uji *S. aureus* ATCC 6538 dan *B. subtilis* ATCC 6633 yang mewakili bakteri Gram positif, *E. coli* ATCC 25922 yang mewakili bakteri Gram negatif dan *C. albicans* ATCC 10231 yang mewakili golongan jamur. Sebelum digunakan bakteri terlebih dahulu diidentifikasi dengan pewarnaan Gram untuk memastikan bahwa bakteri telah sesuai. Koloni bakteri Gram positif akan berwarna ungu sementara koloni bakteri Gram negatif akan berwarna merah dengan pewarnaan Gram. Perbedaan warna ini dikarenakan perbedaan struktur dinding sel bakteri dan perbedaan kandungan asam ribonukleat antara bakteri Gram positif dan Gram negatif. Bakteri *S. aureus* memiliki morfologi seperti bola yang membentuk koloni teratur ataupun tidak teratur. *B. subtilis* memiliki morfologi berbentuk batang silinder yang tersusun seperti rantai. *E. coli* berbentuk batang kecil (Ryan dan Ray, 2004; Jawezt *et al.*, 1986). Dari hasil pengamatan menunjukkan *S. aureus* berwarna ungu dan berbentuk seperti bola yang tersusun berkelompok. Bakteri *B. subtilis* juga berwarna ungu dan berbentuk batang tunggal atau tersusun seperti rantai panjang. Bakteri *E. coli* berwarna merah dan berbentuk batang pendek. Hasil ini menunjukkan bakteri yang akan digunakan sudah sesuai.

Pada penelitian ini uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan dua metode yaitu difusi cakram dan mikrodilusi. Difusi cakram digunakan sebagai skrining awal untuk melihat hambatan pertumbuhan mikroba oleh ekstrak *P.oxalicum*. Metode difusi cakram dipilih karena memiliki kelebihan dapat digunakan untuk senyawa non polar, cepat, mudah dan sederhana (Valgas *et al.*, 2007). Sebanyak 50 µl larutan ekstrak dengan konsentrasi 10.000 ppm dibasahkan pada kertas cakram sehingga konsentrasi ekstrak menjadi 500 µg/disk. Hasil uji difusi menunjukkan

bahwa ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* memberikan hambatan pertumbuhan terhadap bakteri *B. subtilis*, *E. coli*, dan *S. aureus*. Dengan diameter zona hambat sebesar 12,6 mm; 11,2; dan 10,5 mm. Sementara pada *C. albicans* tidak menunjukkan hambatan pertumbuhan. Pengamatan pada zona hambat dilakukan pada 24 jam masa inkubasi bakteri uji dan 48 jam masa inkubasi jamur.

Setelah diketahui bahwa ekstrak memiliki aktivitas antimikroba selanjutnya dilakukan penentuan KHM dari ekstrak menggunakan metode mikrodilusi dengan penambahan pereaksi warna MTT. Pemilihan metode dilusi karena memberikan hasil yang lebih sensitif dan dapat digunakan untuk analisis semi-kuantitatif hingga kuantitatif. Penambahan pereaksi warna MTT pada uji dilusi dilakukan untuk mengetahui adanya sel hidup pada sumuran. MTT yang ditambahkan akan direduksi oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat dalam mitokondria sel hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu (Green dan Narahara, 1980). Sehingga bila terjadi pertumbuhan bakteri pada uji mikrodilusi ini akan terjadi perubahan warna dari kuning menjadi ungu pada *well plate*. Pada uji ini hanya digunakan mikroba yang memberikan hasil positif agar dapat ditentukan KHMnya sehingga jamur *C. albicans* tidak digunakan karena memberikan hasil negatif. Dari hasil uji mikrodilusi diperoleh KHM sebesar 250 µg/ml untuk *B. subtilis* dan *E. coli* sementara untuk *S.aureus* 500 µg/ml. Ekstrak dikatakan memiliki aktivitas antimikroba yang poten jika memiliki KHM < 100 µg/ml (Marasini *et al.*, 2015).

Beberapa faktor yang mempengaruhi proses uji aktivitas antimikroba antara lain konsentrasi bakteri yang ditambahkan pada agar (jumlah inokulum), adanya patogen (kontaminasi), efek difusi antibiotik yang digunakan, ketebalan media, temperatur pertumbuhan (suhu inkubasi), waktu inkubasi dan kandungan nutrisi (Bauer *et al.*, 1966). Selain itu faktor penting yang juga harus diperhatikan untuk mencapai hasil

yang baik adalah galur mikroba uji yang digunakan karena pada galur yang berbeda, terdapat perbedaan tingkat kepekaan (Wang *et al.*, 2007).

Pada penelitian ini skrining fitokimia ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* menunjukkan hasil positif untuk golongan terpenoid. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya warna ungu setelah hasil KLT ekstrak disemprot dengan penampak noda anisaldehyda dan asam sulfat. Hasil positif juga ditunjukkan pada uji polifenol yang ditandai dengan terbentuknya warna hitam setelah disemprot dengan FeCl_3 . Hasil skrining fitokimia ini sesuai dengan hasil $^1\text{H-NMR}$ dimana terjadi serapan dengan intensitas yang tinggi di daerah 1-4 ppm yang merupakan daerah serapan senyawa golongan terpenoid. Serapan juga terjadi di daerah 6-8 ppm yang merupakan daerah serapan senyawa aromatis dimana polifenol merupakan senyawa aromatis. Hasil ini didukung oleh penelitian Bao *et al.*, (2014) dan Bian *et al.*, (2015) dimana ekstraksi *P. oxalicum* dengan etil asetat menghasilkan senyawa baru diantaranya kromon, xanthon dan senyawa penioksalisin (*3-nor-2,3-seco-labdane diterpene*) (Bao *et al.*, 2014; Bian *et al.*, 2015).

Sementara pada uji flavonoid, alkaloid dan antraknon menunjukkan hasil yang negatif. Hasil negatif ini kemungkinan dikarenakan kadar flavonoid, alkaloid, dan antraknon dalam ekstrak sangat kecil sehingga tidak dapat terdeteksi dengan menggunakan skrining fitokimia. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan senyawa golongan terpenoid yang diduga jenis phytadiene, 1,2-seco cladiellan memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *S. aureus*, *E. coli*, dan jamur *Aspegillus flavus* (Gunawan *et al.*, 2008). Sing *et al.*, (2003) dalam penelitiannya menyatakan senyawa terpenoid yang diduga β -sitosterol, α -amyrin, lupeol, hexacosanoic acid, ceryl alcohol, dan hexacosane memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *S. aureus*, *E. coli*. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Wiwik, (2010) menyatakan bahwa senyawa golongan triterpenoid asam karboksilat memberikan aktivitas antibakteri terhadap

S. aureus dan *E. coli*. Dalam penelitian yang dilakukan Machado dan Marques, (2010) dilaporkan senyawa kromon dan xanthon yang diisolasi dari *P. oxalicum* memiliki aktivitas antimikroba. Penelitian lain terkait polifenol juga menunjukkan aktivitas antimikroba (Maria, 2012; Taguri *et al.*, 2004). Sehingga dapat diduga aktivitas antimikroba yang dihasilkan oleh ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* berasal dari senyawa golongan terpenoid dan polifenol.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

1. Ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* dari spons genus *Homaxinella* memiliki aktivitas antimikroba.
2. KHM yang dihasilkan jamur endofit *P. oxalicum* dari spons genus *Homaxinella* sebesar 250 µg/ml terhadap *B. subtilis* dan *E. coli* sementara untuk *S. aureus* 500 µg/ml.
3. Ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* diduga mengandung senyawa golongan terpenoid dan polifenol.

7.2 Saran

Dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap aktivitas antimikroba jamur endofit *P. oxalicum* dari spons genus *Homaxinella* terhadap bakteri dan jamur patogen lain. Selain itu perlu diteliti lebih lanjut tentang senyawa dari jamur endofit *P. oxalicum* yang berperan dalam memberikan aktivitas antimikroba sehingga dapat diperoleh antimikroba baru.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, H., Aris, T.W., Munti, Y. 2011. Skrining Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons *Jaspis sp.* Sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba. **Ilmu Kelautan**, 16(1), p. 35–40.
- Amade, P., Pesando, D. & Chevolut, L. 1982. Antimicrobial Activities of Marine Sponges from French Polynesia and Brittany. **Marine Biology**, 70(3), p. 223–228.
- Amagata, T. M., Tanaka, T., Yamada, M., Doi, K., Minoura, H., Ohishi, T., Yamori and A, Numata. 2007. Variation in Cytostatic Constituents of a Sponge-derived *Gymnascella dankaliensis* by Manipulating The Carbon Source. **Journal of Natural Products**, 70, p. 1731 – 1740.
- Amir, I. dan Budiyanto, A. 1996. Mengenal Spons Laut (Demospongiae) Secara Umum. **Oseana**, 21, p. 15-31.
- Andrews, J.M. 2006. **Determination of Minimum Inhibitory Concentrations**. City Hospital NHS Trust, Birmingham: Department of Microbiology.
- Bailey, Scott. 1974. **Diagnostic Microbiology**. Saint Louis: The CV Mosby Company.
- Bao J, Jin F. L., Xiao-C. Q., Xin Y. X., Xiao Y. Z., Zheng C. T., Shu H. Q. 2014. Dihydrothiophene-Condensed Chromones From a Marine-Derived *Penicillium oxalicum* and Their Structure–Bioactivity Relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 24, p. 2433–2436.
- BAUER, A.W., W.M. KIRBY, J.C. SHERRIS and M. TUREK. 1996. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, 45, p. 493-498
- Barnett. 2000. A History of Research on Yeasts 2. In: Louis Pasteur and His Contemporaries. **Yeast**, 16, p. 755-771.

- Berghe, V.D.A. and Vlietinck, J.A. 1991. Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents from Higher Plants. In: P.M. Dey and J.B. Harbone (Eds.) **Methods in Plants Biochemistry**. London : Academic Press, p. 47-57.
- Bhagobaty, R.K. & Joshi, S.R. 2012. Enzymatic Activity of Fungi Endophytic on Five Medicinal Plant Species of the Pristine Sacred Forests of Meghalaya, India. **Biotechnology and Bioprocess EngineeringB**, 17(1), p. 33–40.
- Bian, X., Bai, J., Hu, Xiaolan., Wu, X., Xue, C., Han, A., Su, G. 2015. Penioxalicin , a novel 3-nor-2 , 3- seco -labdane Type Diterpene From the Tungus *Penicillium oxalicum* TW01-1. **Tetrahedron Letters**, 56(35), p. 5013–5016.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.P., Munro, M.H.G., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2009. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, 26, p. 170 – 244.
- Boot, C.M., Tenney, K., Valeriote, F.A., and Crews, P.. 2006. Highly N-methylated Linear Peptides Produced by an Atypical Spongederived *Acremonium* sp. **Journal of Natural Product**, 69, p. 83 – 92.
- Brauers, G., Ebel, R., Edrada, R., Wray, V., Berg, A., Gräfe, U., Proksch, P. 2001. Hortein, a New Natural Product from the Fungus *Hortaea werneckii* Associated with the Sponge *Aplysina aerophoba*. **Journal of Natural Products**, 64(5), p. 651–652.
- Brusca, R.C. and Brusca, G.J. 1990. **Phylum Porifera: The Sponges. In : (A.D. Sinauer, ed.) Invertebrates**. Sinauer Press, Sunderland, Mass, p. 181 – 210.
- Bugni, T.S. & Ireland, C.M. 2004. Marine-Derived Fungi: a Chemically and biologically Diverse Group of Microorganisms. **Natural Product Reports**, 21(1), p. 143–163.
- Bussmann, R.W. 2011. Minimum Inhibitory Concentrations of Medicinal Plants Used in Northern Peru as Antibacterial Remedies. **Journal Ethnopharmacol**, 132 (1), p. 101–108.
- Choma, Irena M. and Edyta, Grzelak M. 2010. Bioautography Detection in Thin-Layer Chromatography. **Journal of Chromatography A**, 69 (12).

- Cohen, E., Koch, L., Thu, K.M., Rahamim, Y., Aluma, Y., Ilan, M., Yarden, O. and Carmeli, S. 2011. Novel Terpenoids of the Fungus *Aspergillus insuetus* Isolated from the Mediterranean Sponge *Psammocinia sp.* Collected Along the Coast of Israel. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 15, p. 6587 – 6593.
- Cueto, M., MacMillan, J.B., Jensen, P.R., and Fenical, W. 2006. Tropolactones A–D, Four Meroterpenoids From a Marine-derived Fungus of the Genus *Aspergillus*. **Phytochemistry**, 67, p. 1826 – 1831.
- Das, K., Tiwari, R.K.S., & Shrivastava, D.K. 2010. Techniques for Evaluation of Medicinal Plant Products as Antimicrobial Agent : Current Methods and Future Trends. **Journal Medical Plants Research**, 4(2), pp. 104–111.
- Davis, W.W. and Stout, T.R. 1971. Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay. **Microbiology**, 22(4), p. 659-665.
- Departemen Kesehatan RI. 2009. **Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat**. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dwidjoseputro, D. 1987. **Dasar-dasar Mikrobiologi**. Jakarta : Penerbit Djambatan, p.116-154.
- Ebada, S.S., Schulz, B., Wray, V., Totzke, F., Kubbutat, M.H.G., Muller, W.E.G., Hamacher, A., Kassack, M.U., Lin, W. and Proksch, P. 2011. Arthrinins A – D: Novel Diterpenoids and Further Constituents from the Sponge Derived Fungus *Arthrinium sp.* Bioorg. **Journal of Medicinal Chemistry**, 19, p. 4644 – 4651.
- Edrada, R.A., Heubes, M., Brauers, G., Wray, V., Berg, A., Grafe, U., Wohlfarth, M., Muhlbacher, J., Schaumann, K., Sudarsono, S., Bringmann, G. and Proksch, P. 2002. Online Analysis of Xestodecalactones A-C, Novel Bioactive Metabolites from the Fungus *Penicillium cf. montanense* and Their Subsequent Isolation From the Sponge *Xestospongia exigua*. **Journal Natural Product**, 65, p.1598 – 1604.
- Elbandy, M., Shinde, P.B., Hong, J., Bae, K.S., Kim, M.A., Lee S.M., and Jung, J.H. 2009. α -Pyrones and Yellow Pigments from the Sponge-derived Fungus *Paecilomyces lilacinus*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 30, p. 188 – 192.

- Strobel, Gary and Daisy, Bryn. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, 67(4), p. 491–502.
- Ghemiri, S.R., D, Nikki, Charlton, Jeremy D., Bell, Yelugere L., Krishnamurthy, Kelly D., Craven. 2011. Biodiversity of Fungal Endophyte Communities Inhabiting Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) Growing in the Native Tallgrass Prairie of Northern Oklahoma. **Fungal Divers**, 47, p. 19-27.
- Gherbawy, Youssuf A., Hesham M., Elhariry. 2014. Molecular Characterization of Endophytic Fungi Associated with High-Altitude Juniperus Trees and Their Antimicrobial Activities. **Life Science Journal**, 11(2), p. 19-30.
- Gill, D.M. 1982. Bacterial toxins : A table of lethal amounts. **Microbiology Review**, 46, p. 86-94.
- González, V. and M.L, Tello. 2011. The Endophytic Mycota Associated With Vitis Vinifera in Central Spain. **Fungal Diversity**, 47, p. 29-42.
- Green, J.D. & Narahara, H.T. 1980. Assay of Succinate Dehydrogenase Activity by the Tetrazolium Method: Evaluation of an Improved Technique in Skeletal Muscle Fractions. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 28, p. 408.
- Gunawan, I. W. G., Gede Bawa, I. G. A. and Sutrisnayanti, N. L. 2008. “Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Terpenoid Yang Aktif Antibakteri Pada Herba Meniran. **Jurnal Kimia**, 2 (1), p. 31-39.
- Handayani, D. et al., 2012. Isolation of Cytotoxic Compounds from Marine Sponge *Petrosia* sp. **JPB Perikanan**, 7(1), p. 69-76.
- Haris, V.A. 1990. **Sessile Animal of The Sea Shore**. London, New York, Tokyo, Melbourne, Mandras: Chapman and Hall.
- Harrison, F. W. dan De Vos , L. 1991. Porifera. Di dalam: Harrison, F. W., Westfall, J. A. (ed.). **Microscopic Anatomy of Invertebrates**. Volume 2. Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. Wiley-Liss. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. New York, Chicester, Brisbane, Toronto, Singapore, p. 28 – 29.

- Hickman, Jr., Larry S. R., Allan L. 1997. **Integrated Principal of Zoology**. Publisher: Michael D. Lange.
- Hiort, J., Maksimenka, K., Reichert, M., Perovi ć -Ottstadt, S., Lin, W.H., Wray, V., Steube, K., Schaumann, K., Weber, H., Proksch, P. R. Ebel, W.E.G. Muller and G. Bringmann. 2004. New Natural Products From the Sponge-derived Fungus *Aspergillus niger*. **Journal of Natural Products**, 67, p. 1532 – 1543.
- Holler, U., Wright, A.D., Matthee, G.F., Konig, G.M., Draeger, S., Aust, H.J. and Schulz, B. 2000. Fungi From Marine Sponges: Diversity, Biological Activity and Secondary Metabolites. **Mycological Research**, 104, p. 1354 – 1365.
- Hoshini, T. 1981. Shallow-Water Demosponges of Western Japan. **I. Journal of Science of the Hiroshima University**, 29 (1).
- Hu, X., Bian, XQ., Wu, X., Li, JY., Hua, HM., Pei, YH., Han, AH., Bai, J. 2014. Penioxalamine A, a Novel Prenylated Spiro-oxindole Alkaloid from *Penicillium oxalicum* TW01-1. **Tetrahedron Letters**, 55(29), p. 3864-3867.
- Ilić M.D., Vesna P., Stankov J., Violeta D.M., Olga P., Jovanović T.M., MihajilovK., Marija S. M., Gordana S. S. 2015. Comparison of Chemical Composition and Biological Activities of *Seseli rigidum* Fruit Essential Oils from Serbia, **Open Chemistry**, 13, p. 42–51
- Islam, A.S., Math R. K., Kim M. J. 2010. Effect of Plant Age on Endophytic Bacterial Diversity of Ballon Flower (*Platycodon grandiflorum*) Root an Their Antimicrobial Activities. **Current Microbiology**, 61, p. 346-356.
- Izumikawa, M., Khan, S.T., Komaki, H., Nagai, A., Inaba, S., Takagi, M. and Shin, K. 2009. JBIR-37 and-38, Novel Glycosyl Benzenediols, Isolated from the Sponge-derived Fungus, *Acremonium sp.* SpF080624G1f01. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 73, p. 2138 – 2140.
- Jadulco, R., Brauers, G., Edrada, R.U., Ebel, R., Wray, V., Sudarsono, B.A. and Proksch, P. 2002. New Metabolites from Sponge Derived Fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*. **Journal of Natural Products**, 65, p. 730 – 733.

- Jawetz, Melnick, and Adelberg, S. 2001. **Mikrobiologi Kedokteran Edisi I**. Jakarta: Salemba Medika, p. 196 -198.
- Jawetz, Melnick, and Adelberg, S. 1986. **Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan Edisi 16**. Jakarta: Kedokteran EGC, p. 263-366.
- Jayalakshmi, B., Ravasha, K. A. Amruthes, N., 2011. Phytochemical Investigations and Antibacterial Activity of Some Medicinal Plants Against Phatogenic Bacteria. **Journal of Applied Pharmacheutical Science**, 1(5), p. 124- 128.
- Juwita. 2010. **Potensi Bakteri Endofit Dalam Meningkatkan Ketahanan Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum*) Terhadap Serangan Nematoda Sista Kentang (*Globodera rostochiensis*)**. Skripsi. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi UIN.
- Karlenskit, G. 1998. **Introduction to Marine Biology**. Sounder Collage Publishing.
- Kavanagh, K. 2005. **Fungi Biology and Applications**. West Sussex : John Wiley & Sons Ltd, 11, p.267
- Kementerian Kesehatan RI. 2011. **Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik**. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kementerian Kesehatan RI. 2013. **Riset Kesehatan Dasar**. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kuo, LM. Y., Kuei-Yuh C., Shy-Yuan H., Jin-Liang C., Yen-Yin L., Chia-Ching L., Po-Ho P., Cheng-Jen C., Chien-Chang S., Yao-Haur K. 2005. DNA Topoisomerase I Inhibitor, Ergosterol Peroxide from *Penicillium oxalicum*. **Planta Medica**, 71 (1), p. 77-79.
- Kozloff, E. N. 1990. **Invertebrates**. Saunders College Publishing. p. 73-92.
- Lee, Y.M., Dang, H.T., Hong, J., Lee, C.O., Bae, K.S., Kim, D.K. and Jung, J.H. 2010. A Cytotoxic Lipopeptide from the Sponge-derived Fungus *Aspergillus Versicolor*. **Bulletin of The Korean Chemical Society**, 31, p. 205 – 208.
- Lim, Daniel. 1998. **Microbiology**. United States: McGraw-Hill.

- Liu, W.C., Li, C. Q., Zhu, P., Yang, J. L., Cheng, K. D. 2010. Phylogenetic Diversity of Culturable Fungi Associated With Two Marine Sponges: *Haliclona simulans* and *Gelliodes carnosa*, Collected from the Hainan Island Coastal Waters of the South China Sea. **Fungal Diversity**, 42, p.1–15.
- Lopez-Gresa, M.P., Cabedo, N., Gonzalez-Mas, M.C., Ciavatta, M.A., Avila, C. and Primo, J. 2009. Terretionins E and F, Inhibitors of The Mitochondrial Respiratory Chain from The Marine Derived Fungus *Aspergillus insuetus* . **Journal of Natural Products**, 72, p. 1348 – 1351.
- Machado, N.F.L. Machado and M.P.M. Marques. 2010. Bioactive Chromone Derivatives – Structural Diversity . **Current Bioactive Compounds**, 6, p. 76-89.
- Mansoor, T.A., Jongki H., Chong-O. L., Song-Ja B., Kwang S. I., Jee H. J. 2004. New Cytotoxic Metabolites from a Marine Sponge *Homaxinella sp.* **Journal of Natural Products**, 68, p. 331-336.
- Maria Daglia. 2012. Polyphenol as an Antimicrobial Agents. **Current Opinion Biotechnology**.23, p. 174-181.
- Marasini, B. P., Pankaj B, Pratibha A, Kashi R, Ghimire, Sanjiv N, Nabaraj, Anjana S, Laxman G, Kanti S. 2015. Evaluation of Antibacterial Activity of Some Traditionally Used Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria. **BioMed Research International**. 2015, p. 6.
- McCreath, K.J., Specht, C. A. & Robbins, P. W. 1994. Molecular Cloning and Characterization of Chitinase Genes from *Candida Albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 92, p. 2544-2548.
- Moles, J., Anna T., M. JosÃ A., Ramon R., Conxita A. 2014. Anti-inflammatory Activity in Selected Antarctic Benthic Organisms. **Frontiers in Marine Science**, 1 (24), p. 1–5.
- Motomasa, K. 1998. **Search for Biologically Active Substances from Marine Sponges**. Jakarta: Puslit Oseanologi LIPI.

- Nelwan, R.H.H., 2006. **Pemakaian Antimikrobia Secara rasional di Klinik, Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam**. Jakarta Pusat: Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI.
- Novak, A. and Vagvolgyi, M.. 2002. Characterization of *Candida albicans* Colony Morphology Mutans and Their Hybrids. **Folia Microbial**. p. 203-209.
- Park M.S, M.S., Jonathan J. F., Seung-Y., Kae K. K., Jae H. S., Young W. L. 2014. Marine-derived *Penicillium* in Korea: Diversity, Enzyme Activity, and Antifungal Properties. **Antonie van Leeuwenhoek** .
- Paul, N. C., Deng N. J., Sang H. K., Choi Y. P., Yu S. H. 2012. Distribution and Antifungal Activity of Endophytic Fungi in Different Growth Stage of Chili Pepper (*Capsium annuum L.*) in Korea. **Plant Pathology Journal**, 28 (1), p. 10-19.
- Paz, Z., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, I.S., Aveskamp, M.M., Shnaiderman, A., Aluma, Y., Carmeli, S., Ilan, M. and Yarden, O. 2010. Diversity and Potential Antifungal Properties of Fungi Associated With a Mediterranean Sponge. **Fungal Diversity** . 42, p. 17 – 26.
- Pechenik, J. A. 1991. **Biology of the Invertebrates**. Second Edition. Dubuque, USA: Wm. C. Brown Publisher, p. 63 – 76.
- Pringgenies, D., 2010. Bioproteksi Bakteri Symbion Dari Gastropoda *Conus miles* Terhadap Strain Bakteri IMDR (Multi Drug Resistant). **Ilmu Kelautan**, 14(1), p. 42–49.
- Quiroga, E. N., Antonio R. S., Marta A. M. 2001. Screening Antifungal Activities of Selected Medicinal Plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 74, p. 89–96
- Ribeiro, S.M., Meneses S., Keila M. C., Diana N. C., Valéria L. T., Renato C. P. 2012. Isolated and synergistic effects of chemical and structural defenses of two species of *Tethya* (Porifera: *Demospongiae*). **Journal of Sea Research**, 68, p.57–62.
- Romimohtarto, K. dan S. Juwana. 1999. **Biologi Laut, Ilmu Pengetahuan Tentang Biota Laut**. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi-LIPI, p. 115–128.

- Rosmiati dan Suryati, 2001. Isolasi Identifikasi dan Pengaruh Senyawa Bioaktif Spons *Callyspongia pseudoreticulata* Terhadap Bakteri Patogen dari Udang, **Jurnal Bioteknologi Pertanian**, 1(16).
- Ruppert, E. E. dan Barnes, R. D. 1991. **Invertebrates Zoology**. Sixth Edition. Philadelphia, New York, Chicago, San Fransisco, Montreal, Toronto, London, Sidney, Tokyo: Sauders College Publishing, p. 68 – 91.
- Ryan, K. J. & C. J. Ray. 2004. **Sherris Medical microbiology: An Introduction to Infectious Diseases. 4th ed.** The McGraw Hills Companies, 12, p. 937.
- San-Martin, A., Rovirosa, J., Vaca, I., Vergara, K., Acevedo, L., Vina, D., Orallo, F. and Chamy, M.C. 2011. New Butyrolactone from a Marine-derived Fungus *Aspergillus sp.* **Journal of the Chilean Chemical Society**, 56, p. 625 – 627.
- Santamarina, M., Roselló J., Llacer R., Sanchis V. 2002. Antagonistic Activity of *Penicillium oxalicum* Corrie and Thom, *Penicillium Thom*, *Penicillium decumbens* Thom and *Trichoderma harzianum* Rifai Isolates Against Fungi, Bacteria and Insects in Vitro. **Revista Iberoamericana de Micología**, 19, p. 99-103.
- Schmidt, EW., Obratsova AY., Davidson SK., Faulkner DJ., Haygood MG. 2000 Identification of the Antifungal Peptide-containing Symbiont of the Marine Sponge *Theonella swinhoei* as a Novel Dproteobacterium, “*Candidatus Entotheonella palauensis*”. **Marine Biology**, 136, p. 969–977.
- Silva, Dilip de E. 2009. Isolation of 2-Pyridone Alkaloids from a New Zealand Marine-Derived *Penicillium species*. **Section Title: Microbial, Algal, and Fungal Biochemistry**, 72(3), p. 477–479.
- Simarmata, R., Lekatompessy, S. & Sukiman, H. 2007. Isolasi Mikroba Endofitik dari Tanaman Obat Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) dan Analisis Potensinya Sebagai Antimikroba. **Journal of Biological Researches**, 13, p. 85-90.
- Singh, B., S. Singh, P. 2003. “Antimicrobial Activity of Terpenoids from *Trichodesma Amplexicaule* Roth .” **Phytotherapy Research**. 17.
- Stevenson, K.B. et al., 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-resistant Enterococci in Rural communities,

- Western United States. **Emerging Infectious Disease**, 11(6), p. 895–903.
- Suciati, Alrosyidi, A.F. & Erma, N., 2014. Isolasi dan Skrining Antimikroba Jamur Endofit dari Beberapa Spong Indonesia. **Planta Husada**, 2(2), p. 40–43.
- Sun, Y., Fei H., Kai-sheng L., Xiao-yong Z., Yi-fei W., Xu-hua N., Xinyaya., Shu-huaet Q. 2012. Cytotoxic Dihydrothiophene- Condensed Chromones from Marine- Derived Fungus *Penicillium oxalicum*. **Planta Medica**, 14, p. 1957–1961.
- Sun Y-L *et al.* 2013. Cytotoxic Dihydrothiophene-Condensed Chromonel. **Planta Medica**, 79, p. 1474–1479.
- Suparno. 2005. Kajian Bioaktif Spons Laut (Forifera: Demospongiae) Suatu Peluang Alternatif Pemanfaatan Ekosistem Karang Indonesia Dalam Dibidang Farmasi. **Makalah Pribadi Falsafah Sains (PPs 7002)**, p. 1-20.
- Suryanarayanan, T.S., 2012. Mini Review The Diversity and Importance of Fungi Associated With Marine Sponges. **Botanica Marina**, 55(6), p. 553–564.
- Suryati, E., dan Ahmad, T. 1996. Peluang Pemanfaatan Bioaktif Spons untuk Bakterisida. **Temu Ilmiah Veteriner**.
- Taguri T, Takashi T, Isao K. 2004. Antimicrobial Activity of 10 Different Plant Polyphenols Against Bacteria Causing Food-Borne Disease. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 27(12), p. 1965-1969.
- Takagi, M., Motohashi, K. and Shin-ya, K. 2010. Isolation of 2 New Metabolites, JBIR-74 and JBIR-75, from the Sponge-derived *Aspergillus sp.* fS14. **Journal Antibiotics**, 63, p. 393 – 395.
- Tanita, Senji. 1968. Spnge-fauna of the Airake Sea. **Freshwater Fisheries Research Laboratory, Tokyo**, 36, p. 51-52.
- Tan, R.X., and Zou, W.X. 2001. Endophytes: a Rich Source of Functional Metabolites. **Natural Product Reports**, 18, p. 448-459.

- Tejesvi M.V., Kini KR., 2007. Genetic Diversity and Antifungal Activity of Pestalotiopsis Isolated as Endophytic from Medical Plants. **Fungal Diversity**, 24, p. 37-54.
- Tombe.M. 2008. Pemanfaatan Pestisida Nabati Fungisida Nabati dan Agensia Hayati Untuk Mengendalikan Penyakit Busuk Jamur Akar Putih Pada Jambu Mete. **Buletin Littro**, 19(1), p. 68-77.
- Umeyama, A., Ito, S., Yuasa, E., Arihara, S., Yamada, T. 1998. A New Bromopyrrole Alkaloid and the Optical Resolution of the Racemate from the Marine Sponge *homaxinella* sp. **Journal of Natural Products**, 61(11), p. 1433-4.
- Valgas, C., Souza, S.M.D., Smânia, E.F.A., and Artu, S. 2007. "Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products". **Brazilian Journal of Microbiology**, 38, p. 369-380.
- Varoglu, M., T.H. Corbett, F.A. Valeriote and P. Crews. 1997. Asperazine, a Selective Cytotoxic Alkaloid from a Spongederived Culture of *Aspergillus niger*. **Journal of Organic Chemistry**, 62, p. 7078 – 7079.
- Vega, F.E., Ann S., Catherine M.A., Francisco P., Stephen W.P., Stephen A.R., Francisco I., Alfredo C., Elizabeth A.A. 2010. Fungal Endophyte Diversity in Coffee Plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, 3(3), p. 122-138.
- Wang, F.W., Jiao, R.H., Cheng, A.B., Tan, S.H., and Song, Y.C., 2007. Antimicrobial Potentials of Endophytic Fungi Residing in Quercus Variabilis and Brefeldin A Obtained from *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, 23, p. 79-83.
- Wang, G., Q. Li and P. Zhu. 2008. Phylogenetic Diversity of Culturable Fungi Associated With the Hawaiian Sponges *Suberites zeteki* and *Gelliodes fibrosa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, 93, p.163 – 174.
- Warren, L. 1982. **Encyclopedia of Marine Invertebrates**. Di dalam: Walls JG (ed.). p. 15 – 28.
- Watermann, B. 1999. Alternative Anti-foulant Techniques Present and Future. **LimnoMar**, 1(6), p. 6-7.

- Wei, R., Fuchao L., Ru S., Song Q. 2009. Comparison of Two Marine Sponge-associated *Penicillium* Strains DQ25 and SC10: Differences in Secondary Metabolites and Their Bioactivities. **Annals of Microbiology**, 59(3), p. 579–585.
- Wiese, J., Birgit O., Martina B., Rolf S., Johannes F.I. 2011. Phylogenetic Identification of Fungi Isolated from the Marine Sponge *Tethya aurantium* and Identification of Their Secondary Metabolites. **Marine Drugs**, 9(12), p. 561-585.
- Wikler Matthew A., Cockerill, Franklin R., Bush, Karen, Dudley. 2009. **Performance Standard for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard**. 10th Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Wiwik Susanah Rita. 2010. Isolasi, Identifikasi, Dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Golongan Triterpenoid Pada Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe). **Jurnal Kimia**, 4 (1), p. 20-26.
- World Health Organization. 2012. **Global Report for Research on Infectious Disease of Poverty**. World Health Organization.
- Yang, L., Jiatao X., Daohong J., Yanping F., Guoqing L., Fangcan L. 2008. Antifungal Substances Produced by *Penicillium oxalicum* Strain PY-1 — Potential Antibiotics Against Plant Pathogenic Fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24(7), p. 909–915.
- Yokoyama, A. and Wataru M. 1994. Isolation of Myxol from a Marine Bacterium *Flavobacterium sp.* Associated with a Marine Sponge. **Fisheries Science**, 61(4), p. 684-686
- Yu, J.-H. and N. Keller. 2005. Regulation of Secondary Metabolism in Filamentous Fungi. I. **Annual Review of Phytopathology**, 43, p. 437 – 458.
- Yuliaty, Risfah., 2011. Skrining Dan Analisis Klt-Bioautografi Senyawa Antimikroba Beberapa Ekstrak Spons Asal Perairan Laut Pulau Barrang Lompo, Sulawesi Selatan. **Majalah Obat Tradisional**, 16(2), p. 88–94.
- Zhao, L., Y. Gai, H. Kobayashi, C.Q. Hu and H.P. Zhang. 2008. 5-Hydroxyzearealenol, a New β -resorcylic Macrolide from

Fusarium sp. 05ABR26Ling. **Chinese Chemical Letters**, 19, p. 1089 – 1092.

Zhang, D., Xiudong Y., Jung S. K., Hong D. C., Byeng W. S. 2008. Chlorohydroaspyrones A and B, Antibacterial Aaspyrone Derivatives from the Marine-derived Fungus *Exophiala* sp. **Journal of Natural Products**, 71(8), p. 1458–60.

Zhang, X., Bao, J. & Wang, G., 2012. Diversity and Antimicrobial Activity of Culturable Fungi Isolated from Six Species of the South China Sea Gorgonians. **Microbial Ecology**, 64, p. 617–627.

Zhang, Y., J. Mu, Feng, Y., Kang, Y., Zhang, J., Gu, P., Wang, Y., Ma L. and Zhu., Y. 2009. Broad-spectrum Antimicrobial Epiphytic and Endophytic Fungi from Marine Organisms: Isolation, Bioassay and Taxonomy. **Marine Drugs**, 7, p. 97 -112.

Zhou, K., Zhang, H., Zhang, F. and Li, Z. 2011. Phylogenetically Diverse Cultivable Fungal Community and Polyketide Synthase (PKS), Non-ribosomal Peptide Synthase (NRPS) Genes Associated with the South China sea Sponges. **Microbial Ecology**, 62, p. 644 – 654.

<https://aslam02.wordpress.com/materi/kelas-x-2/kingdom-animalia/porifera/>

<http://www.slideshare.net/taniarizkyf/porifera-hewan-spons>

<https://en.wikipedia.org/wiki/Euplectella>

http://de-fairest.blogspot.co.id/2012/08/kingdom-parazoa-filum-porifera_14.html

<http://smanegeri1seilepan.blogspot.co.id/2013/04/filum-porifera-pengertian-ciri-ciri.html>

Lampiran 1

Surat keterangan identifikasi jamur endofit *Penicillium oxalicum*



LABORATORIUM PENUNJANG
BALAI PENGAJIAN BIOTEKNOLOGI
BADAN PENGAJIAN DAN PENERAPAN TEKNOLOGI
Gd. 639 Kawasan Puspiptek Serpong 15314
Telp : 021-756-3120, 021-756-0563 ext 1543
Faks : 021-756-0708
E-mail : lab_biotechbppt@yahoo.com

FMS-10-21 / Ed3 / Rev 0

SERTIFIKAT HASIL UJI

Nama Pelanggan : Dr. Susiani Iryani	Halaman : 1 dari 1
Alamat Pelanggan : Universitas Airlangga Surabaya Jawa Timur	Tanggal Penorotan : 28 September 2015 Tanggal Pengujian : 3 Oktober 2015 Tanggal Sertifikat : 26 Oktober 2015
Jenis Bahan Uji : Isolat Jamur	No. Sertifikat : 205-SHU-16-2015

No. Urut	Kode Sampel Pelanggan	Isolat	Parameter	Satuan	Hasil	Metode
1.	Isolat Jamur	Isolat	28S ribosomal RNA	-	<i>Penicillium oxalicum</i> strain FEC-128	PCR-Sequencing
Ket. : Hasil PCR – 28S-rDNA. Sekuen setelah di assembly kemudian BLAST pada tanggal 12 Oktober 2015 menunjukkan sampel tersebut adalah <i>Penicillium oxalicum</i> strain FEC-128, dengan similarity 100%. Hasil Sequencing dan Phylogenic terlampir.						

Manajer Teknis
Laboratorium Teknologi Gen



Wir Zetrisia, S.Si

Hasil yang terdapat pada sertifikat ini hanya berlaku untuk sampel yang diuji.
Sertifikat ini sah bila telah dibubuhi cap Balai Pengkajian Bioteknologi – BPPT dan ditandatangani oleh pejabat yang berwenang.

Lampiran 3

Hasil identifikasi spons genus *Homaxinella*.



LABORATORIUM EKOLOGI
 JURUSAN BIOLOGI
 Gedung H Kampus ITS Sukotilo, Surabaya 60111
 Telp: 031-5963857
 Fax : 031-5963857
 Email : ecology@bio.its.ac.id

HASIL PENGAMATAN SAMPEL
MARINE SPONGE

Sampel 1
Identitas sampel
 Nama sampel : 001-BLF.SP/D215
 Pengirim : Dr. Sutlati (Fak. Farmasi UNAIR)
 Tanggal penerimaan sampel : 18 Februari 2015
 Tanggal pengamatan sampel : 7 Maret 2015
 Metode pengamatan sampel : Identifikasi morfologi (mikroskopis)

Observer : Iwenda Bella Subagio, S.Si
Supervisor : Farid K. Muzaki, S.Si, M.Si

Tabel 1. Hasil Identifikasi Spongi

Sampel	Spesies	Famili
17-5-14-3	<i>Homaxinella</i> Topsent, 1916	Suberitidae
17-5-14-4	<i>Microsira</i> Topsent, 1917	Nyxatidae
17-5-14-5	<i>Clavosira</i> Burton, 1934	Pyrospongiales
17-5-14-9	<i>Hyalosira</i> Grant, 1835	Chalinidae
17-5-14-10	<i>Hyalina</i> Duchassaing & Michelotti, 1864	Thorectidae
17-5-14-11	<i>Syrtira</i> Hallmann, 1914	Diclyonellidae
17-5-14-14	<i>Apletia</i> Duchassaing & Michelotti, 1864	Agelasidae

Keterangan:

Identifikasi dan klasifikasi berdasarkan literatur berikut:
 Hooper, J.N.A. 2000. *Spongiae: guide to sponge collection and identification*. Queensland: Queensland Museum.
 Hooper, J.N.A., and W.M. Van Soest (Ed.). 2002. *Systema Porifera: a guide to the classification of sponges*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Surabaya, Maret 2015
 Kepala Laboratorium Ekologi
 Prodi Biologi FMIPA-ITS

Aimurshin, S.Si., DEA
 NIP. 19730504200501 1 002

Lampiran 4

Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak etil asetat jamur endofit *P. oxalicum* konsentrasi 500 µg/disk terhadap mikroba uji *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633, dan *C. albicans* ATCC 10231 dari tiga sisi yang berbeda.

Mikroba uji/ pengukuran ke	Diameter hambatan (mm)					
	Estrak			Kontrol Positif		
	Replikasi			Replikasi		
	I	II	III	I	II	III
<i>S. aureus</i>						
1	11,1	10,4	10,0	27,1	26,3	25,7
2	11,2	10,1	10,1	27,3	26,3	25,9
3	11,1	10,0	10,1	27,3	26,2	25,9
<i>E. coli</i>						
1	11,4	11,7	10,7	21,3	21,0	20,1
2	11,2	11,9	10,4	21,3	20,9	20,1
3	11,3	11,8	10,7	21,4	20,9	19,9
<i>B. subtilis</i>						
1	12,7	13,1	11,8	19,9	19,6	21,1
2	12,8	13,1	11,6	19,8	19,6	21,1
3	12,8	12,9	12,2	19,8	19,4	20,9
<i>C. albicans</i>						
1	-	-	-	19,8	19,4	20,3
2	-	-	-	19,2	19,1	20,5
3	-	-	-	19,6	19,3	20,4

Lampiran 5

Sertifikat *Escherichia coli* ATCC 25922



Certificate of Quality

Product Name: *E. coli* ATCC 25922 TRU[®]
Lot Number: J60798

Product Number: 80687050
Expiration Date: 2017-01-31
17017-001-014

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality System Regulations, 21 CFR Part 312. Representative samples were tested per Internal Quality Control specifications and were found to have performance within the stated product.

Storage:

Individual aliquots of this rehydrated product are contained in a desiccative device and a-capped for best results following the appropriate handling, storage and distribution needs, see the insert when applicable.

Viability And Quantification:

Each aliquot is certified that the bacterial count within the rehydration time and in an acceptable form. The exact number is stated on the insert whenever used.

Microscopic And Microscopic Morphology:

Cells morphology is consistent to the reference reference description. Traditional staining is performed.

Biological Activity:

Organism exhibits characteristic biochemical, serologic, enzymatic, immunologic and other characteristics being used for purposes and purity were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/amp: 1.1x10⁸

Change: 2

Direct Product: Gene Magnifier Red

Biological Profile: ATCC 25922

For more information, please contact us at 1-800-531-9001

For
Sheng Maon

Product Performance Technology

Lampiran 6

Sertifikat *Bacillus subtilis* ATCC 6633



Certificate of Quality

Product Name: *B. subtilis* ATCC 6633 PK25
Lot Number: 525106

Product Number: R460122)
Expiration Date: 2016-01-31
(1177-00480)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality System Regulation, 21 CFR Part 312. Representative samples were tested per Revised Quality Control specifications and were found to meet performance values for this product.

Purity:

Standardized aliquots of the rehydrated powder are inoculated onto nonselective media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and Differential media are also tested where applicable.

Viability And Quantification:

Each organism is recovered from the processed units within the required time frame and at an acceptable level. Foreign matter is stated as the lowest preserved unit.

Macroscopic And Microscopic Morphology:

Colony morphology is consistent with documented reference description
Turbidity staining is positive.

Biochemical Analysis:

Organism exhibits characteristic biochemical and enzymic reactions. Anticatalytic and conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/amp: >10⁹

Power: 1

Gram Reaction: Gram Positive Rod

Basidium Profile: Yeast 2/Compound BCC

Appearance: Preserved (wet) Matrix suspended in inoculating loop
pH: N/A

Signed

Product Performance Technology

Lampiran 7

Sertifikat *Candida albicans* ATCC 10231



Certificate of Quality

Product Name: *C. albicans* ATCC 10231 PK/5
Lot Number: 392064

Product Number: B4604.589
Expiration Date: 2016-05-30
(YYMMDD)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality System Regulations, 21 CFR, Part 310. Representative samples were tested per Internal Quality Control specifications and were found to meet performance criteria for this product.

Purity:

Statistical analysis of the rehydrated product are: incubated upon quantitative media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Substrate and Differential media are also tested where applicable.

Viability And Quantitative:

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Passage number is stated on the vessel preserved state.

Macroscopic And Microscopic Morphology:

Colony morphology is consistent with documented reference description. Typical staining is performed.

Biochemical Analysis:

Digoxin enables characteristic biochemical media enzymatic reactions. Automated substrate confirmation testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/amp. > 10¹¹

Passage: 3

Gram Stain(sic): Oxid Positive Yeast

Biochemical Profile: Yeast IC: Y37

Appearance: Preserved Gel Mass: suspended in inoculating loop
pH: N/A

Signat

Product Performance: Technologist

Lampiran 8

Sertifikat *Staphylococcus aureus* ATCC 6538



Certificate of Quality

Product Name: 5 Auresis ssp aureus ATCC 6538 PKG
Lot Number: 633937

Product Number: R4607016
Expiration Date: 2016-09-30
(257140400)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality System Regulation, 21 CFR Part 120. Representative samples were tested per Retail Quality Control specifications and were found to meet performance criteria for this product.

Purity:

Strain-based aliquots of the vial/drop product are inoculated onto consecutive media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and differential media are also tested where applicable.

Viability And Quantification:

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Usage number is stated on the covers preserved state.

Microscopic And Microscopic Morphology:

Colony morphology is consistent with description. Gram stain is performed.

Biochemical Analysis:

Digestion exhibits characteristic biochemical results suggestive of *Staphylococcus aureus*. Automated and/or conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/loop >10⁶

Over Reaction: None Positive Control

Passage: 3

Biological Profile: Vial 30 QP

Appearance: Preserved Oil Matrix suspended in microcarrier loop

pH: N/A

Signed

Product Performance Technologist