

**BIDANG PENELITIAN : MIPA**

**LAPORAN AKHIR  
PENELITIAN UNGGULAN KOMPETITIF**

**VARIASI KONDISI KULTIVASI PADA PRODUKSI METABOLIT  
FUNGI ENDOFITIK YANG BERPOTENSI  
MENGHASILKAN ANTIBAKTERI**



**OLEH :**

**DR. HARY WIDJAJANTI, M.Si / NIDN.0012126112**

**DRA.MUHARNI, M.Si / NIDN. 0003066305**

**DR. ELISA NURNAWATI, M.Si, / NIDN. 0027047502**

**Dibiayai oleh :**

**Anggaran DIPA Badan Layanan Umum**

**Universitas Sriwijaya Tahun Anggaran 2020**

**SP DIPA-023.17.2.677515/2021, tanggal 23 November 2020**

**Sesuai dengan SK Rektor**

**Nomor : 0010/UN9/SK.LP2M.PT/2021**

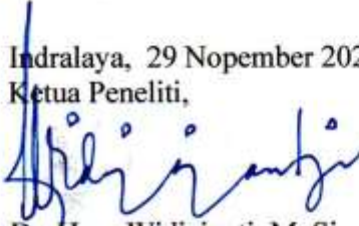
**Tanggal 28 April 2021**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS SRIWIJAYA  
2021**

**HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR  
SKEMA PENELITIAN UNGGULAN KOMPETITIF**

- |   |  |
|---|--|
| 1. Judul Penelitian   | : Variasi kondisi kultivasi pada produksi metabolit fungi endofitik yang berpotensi menghasilkan antibakteri |
| 2. Bidang Penelitian  | : Kesehatan dan Obat   |
| 3. Ketua Peneliti   |  |
| a. Nama Lengkap   | : Dr.Hary Widjajanti, MSi  |
| b. Jenis Kelamin  | : Perempuan  |
| c. NIDN/NIDK  | : 0012126112   |
| d. Pangkat dan Golongan   | : Pembina / IV-a   |
| e. Pendidikan Terakhir  | : S3   |
| g. Fakultas/Jurusan/Prodi   | : MIPA/Biologi   |
| i. Telepon/HP/email   | : 0711-811619/0852 7365 1116/hary_widjajanti@unsri.ac.id   |
| 4. Jumlah Anggota Peneliti  | : 2 orang  |
| a. Nama Anggota I   | : Dra. Muharni, M.Si   |
| NIDN/NIDK   | : 0003066305   |
| b. Nama Anggota II  | : Dr. Elisa Nurnawati, M.Si  |
| NIDN/NIDK   | : 0027047502   |
| 5. Jangka Waktu Penelitian  | : 1 tahun  |
| 6. Jumlah Dana yang disetujui   | : Rp.51.510.000,-  |
| 7. Target Luaran TKT  | : TKT-3  |
| 8. Nama, NIM dan Jurusan/<br>Program Studi/BKU<br>Mahasiswa yang Terlibat | 1. Eca Desriana Zahwa/08041181722044/ Biologi-S1<br>2. Dinda Sari/08041381823073/Biologi-S1                  |

  
Mengetahui  
Dekan Fakultas MIPA,  
  
Hermansyah, M. Si, Ph. D  
NIP. 19711191997021001

Indralaya, 29 Nopember 2021  
Ketua Peneliti,  
  
Dr. Hary Widjajanti, M. Si  
NIP.196112121987102001

Menyetujui :  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat  
Universitas Sriwijaya

Samsuryadi, S. Si, M. Kom, Ph. D  
NIP. 197102041997021003

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
DAFTAR ISI .....	iii
I. RINGKASAN.....	v
II. PENDAHULUAN .....	1
III. TINJAUAN PUSTAKA .....	4
IV. METODE PENELITIAN.....	9
V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	13
VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	22
DAFTAR PUSTAKA .....	23
MANUSKRIP.....	26

## RINGKASAN

Fungi endofitik adalah fungi yang hidup di dalam jaringan tanaman pada periode tertentu dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa fungi endofitik yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang identik dengan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan inangnya yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inang ke fungi endofitik. Kemampuan fungi endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari fungi endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya tersebut. Dalam pengembangan obat berbasis tumbuhan obat harus dipertimbangkan aspek kelestarian tumbuhan obat yang akan dikembangkan. Salah satu alternatif yang bisa ditawarkan adalah dengan mengisolasi jamur endofitik dari bagian tumbuhan obat yang sering digunakan sebagai obat secara tradisional dan dilakukan seleksi senyawa metabolit sekunder yang bersifat bioaktif dari kultur jamur endofitik tersebut, dengan demikian pengembangan senyawa obat berbasis tumbuhan obat dapat dilakukan dan kelestarian tumbuhan obat dapat dipertahankan.

Dari penelitian sebelumnya yang telah dilakukan didapatkan bahwa fungi endofitik dari tanaman gelam (*Melaleuca cajuputi*) yaitu isolat McB1 dan fungi endofit dari daun semburan (*Paederia foetida*) yaitu *Peniophora sp* memiliki aktivitas antibakteri tinggi tetapi produk ekstrak metabolit yang bersifat antibakteri jumlahnya sedikit. Ekstrak fungi endofitik isolat McB1 memiliki aktivitas antibakteri sebesar 80 % (kuat) terhadap *E coli* (Gram negatif) dan 81,8 % (kuat) terhadap *Staphylococcus aureus* (Gram positif), produk ekstrak metabolitnya sebesar 0,30 gram dengan biomassa 2,34 gram. Ekstrak fungi endofitik *Peniophora sp* memiliki aktivitas antibakteri sebesar 81,81% (kuat) terhadap *E coli* (gram negatif) dan 78,57% (kuat) terhadap *Staphylococcus aureus* (gram positif), produk ekstrak metabolitnya sebesar 0,146 gram dengan biomassa 1,76 gram.

Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan upaya untuk meningkatkan produk metabolit yang bersifat antibakteri terhadap kedua jamur endofitik tersebut, alternatif yang akan dicoba yaitu dengan melakukan variasi kondisi kultivasi berupa optimasi sumber C (glukosa, dekstrosa, sukrosa), sumber N (yeast extract, pepton, dan NaNO<sub>3</sub>), dan pH (5, 6, 7, dan 8).

Tujuan penelitian adalah : 1. Mendapatkan kondisi kultivasi dari variasi sumber C, sumber N, dan pH yang optimum dalam menghasilkan ekstrak metabolit oleh isolat McB1 dan *Peniophora sp* yang berpotensi menghasilkan antibakteri. 2. Mengetahui golongan senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak metabolit sekunder hasil variasi kondisi kultivasi fungi endofitik isolat McB1 dan *Peniophora sp* berdasarkan uji kromatografi lapis tipis (KLT).

Metode penelitian yang dilakukan merupakan metode penelitian eksperimental dengan tahapan : 1. Propagasi isolat jamur endofitik, 2. Kultivasi I, 3. Ekstraksi metabolit sekunder hasil kultivasi I, 4. Optimasi produksi antibakteri, dan ekstraksi hasil optimasi. Data akan dianalisis menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM)

Luaran yang ditargetkan adalah : 1) Skripsi mahasiswa, 2) Artikel ilmiah pada jurnal nasional minimal Sinta 3.

Tingkat kesiapterapan teknologi (TKT) pada penelitian ini adalah TKT 3, yaitu Pembuktian konsep fungsi dan/atau karakteristik penting secara analitis dan eksperimental.

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan 1). Penggunaan sukrosa sebesar 4,5 gL<sup>-1</sup>, yeast extract sebesar 0,48 gL<sup>-1</sup> dan pH 6,1 didiperoleh respon metabolit sekunder isolat fungi endofit McB1 sebesar 0,34 g, 2). Profil kromatogram ekstrak metabolit

sekunder isolat fungi endofit McB1 hasil optimasi menunjukkan adanya senyawa flavonoid, fenol, terpenoid dan tanin. 3). Hasil kultivasi I fungi endofit *Peniophora* sp menghasilkan berat ekstrak yang terbesar dengan penggunaan sukrosa sebagai sumber karbon, pepton sebagai sumber nitrogen, dan pH 7.

Kata kunci : fungi endofitik, *Melaleuca cajuputi* Powell, antibakteri

## **BAB I PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Fungi endofit merupakan fungi yang hidup di dalam jaringan tumbuhan tanpa menimbulkan gejala penyakit pada tumbuhan inangnya. Fungi endofit mampu menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif misalnya senyawa antibakteri, antifungi, antivirus, antikanker, antimalaria dan sebagainya [1].

Fungi endofit daun *Melaleuca cajuputi* yaitu isolat McB1 memiliki aktivitas antibakteri yang tinggi yaitu sebesar 80 % (kuat) terhadap *E coli* (gram negatif) dan 81,8 % (kuat) terhadap *Staphylococcus aureus* (gram positif). Ekstrak metabolit yang dihasilkan tersebut memiliki berat 0,30 gram dengan biomassa 2,34 gram. Ekstrak fungi endofitik daun semburan (*Paederia foetida*) yaitu *Peniophora sp.* memiliki aktivitas antibakteri yang tinggi yaitu sebesar 81,81% (kuat) terhadap *E coli* (Gram negatif) dan 78,57% (kuat) terhadap *Staphylococcus aureus* (Gram positif). Ekstrak metabolit yang dihasilkan tersebut memiliki berat 0,146 gram dengan biomassa 1,76 gram[2].

Rendahnya produksi metabolit sekunder yang dihasilkan pada tahap kultivasi dan tingginya potensi aktivitas senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh fungi endofit isolat McB1 dan *Peniophora sp* tersebut maka diperlukan perlakuan khusus untuk meningkatkan produksi metabolitnya. Peningkatan hasil senyawa metabolit sekunder dapat dilakukan dengan optimasi komposisi media kultivasi. Perbedaan komposisi media kultivasi yang digunakan akan menghasilkan jumlah metabolit yang berbeda, mencari kondisi paling optimal dalam proses pertumbuhan dan pembentukan metabolit sekunder dari isolat menjadi dasar pentingnya dilakukan optimasi media kultivasi[3]. Menurut Septiana *et al.*, (2017) [4] salah satu cara yang dapat digunakan dalam memodifikasi faktor fisik dan lingkungan pada proses kultivasi pada media cair ialah dengan modifikasi sumber karbon, sumber nitrogen, dan pH[4]. Penting untuk meningkatkan produktivitas fungi endofit dalam menghasilkan metabolit melalui variasi kondisi fermentasi melalui modifikasi tipe medium, sumber karbon, sumber nitrogen, temperatur, pH dan salinitas untuk menghasilkan senyawa aktif yang optimum[5].

Penggunaan sumber karbon berupa glukosa menghasilkan hasil yang optimum untuk produksi senyawa antimikroba dari *Fusarium oxysporum*[3]. Penggunaan dektrosa meningkatkan produksi metabolit sekunder dari isolat *Fusarium solani*[6]. Biosintesis senyawa flavonoid paling tinggi terdapat setelah pemakaian dektrosa sebagai sumber karbon pada isolat fungi *Aspergillus tamarii*[7]. Fungi endofit *Fusarium rodolens* memproduksi senyawa

metabolit berupa taxol melalui optimasi sumber karbon sukrosa [8]. Sukrosa sebagai sumber karbon juga sangat mempengaruhi pembentukan senyawa antimikroba pada fungi endofit dari tumbuhan *Moringa oleifera* [9]. Pemakaian sukrosa sebagai sumber karbon pada *Fusarium oxysporum* menunjukkan kondisi paling optimum dalam pembentukan senyawa metabolit berupa enniatins [10].

Sumber nitrogen merupakan komponen utama dalam suatu media kultur yang dibutuhkan mikroba untuk proses pertumbuhan sel. Penggunaan *yeast extract* meningkatkan produksi metabolit sekunder dari isolat *Fusarium solani*[6]. Sumber nitrogen berupa pepton sangat mempengaruhi pembentukan senyawa metabolit sekunder pada *Fusarium miniliforme* [11]. Penggunaan sodium nitrat sangat mempengaruhi pembentukan senyawa antimikroba pada fungi endofit *Moringa oleifera* [9].

Pertumbuhan terbaik fungi terlihat pada kisaran pH 5-8. Pada pH 6 senyawa metabolit sekunder diproduksi paling optimum pada fungi *Geosmithia pallida* [12] dan *Fusarium solani* [6]. Kondisi pH 7 sangat mempengaruhi pembentukan senyawa antimikroba pada fungi endofit *Moringa oleifera* [9].

Pada penelitian ini variasi kondisi kultivasi yang akan dilakukan adalah dengan membuat variasi sumber karbon berupa : glukosa, dekstrosa, dan sukrosa. Variasi sumber nitrogen berupa : *yeast extract*, pepton, dan NaNO<sub>3</sub>. Variasi pH yang akan dicoba yaitu : pH 5, pH 6, dan pH 7.

## 1.2. Rumusan Masalah

Dari penelitian terdahulu yang telah dilakukan didapatkan bahwa ekstrak metabolit fungi endofitik isolat McB1 dan *Peniophora sp* memiliki aktivitas antibakteri yang tinggi, tetapi permasalahannya ekstrak metabolit yang dihasilkan jumlahnya sedikit. Oleh karena itu akan dilakukan penelitian untuk meningkatkan produksi metabolit yang bersifat antibakteri dari jamur endofit tersebut dengan variasi kondisi kultivasi dengan variasi sumber C, sumber N, dan pH.

## 1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mendapatkan kondisi kultivasi dari variasi sumber C, sumber N, dan pH yang optimum dalam menghasilkan ekstrak metabolit fungi endofitik isolat McB1 dan *Peniophora sp* yang berpotensi menghasilkan antibakteri.

2. Mengetahui golongan senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak metabolit hasil variasi kondisi kultivasi fungi endofitik isolat McB1 dan *Peniophora sp* berdasarkan uji kromatografi lapis tipis (KLT).

#### **1.4. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kondisi kultivasi dengan variasi sumber karbon, nitrogen, pH yang dapat meningkatkan produksi metabolit fungi endofitik *Isolat McB1* dan *Peniophora sp* yang berpotensi menghasilkan antibakteri.



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.2. Fungi Endofit**

Fungi endofit didefinisikan sebagai fungi yang ditemukan hidup di bagian jaringan tumbuhan pada kurun waktu tertentu dan berasosiasi didalamnya tanpa merugikan atau membahayakan inangnya. Fungi endofit ini dapat melakukan suatu proses metabolisme dimana akan menghasilkan suatu senyawa bioaktif yang berpotensi untuk dikembangkan[13]. Hal ini dikarenakan selain siklus hidup fungi yang pendek dan mudah untuk dikembangbiakkan, fungi juga mampu menghasilkan senyawa bioaktif dalam jumlah yang besar dalam waktu yang singkat[14]. Fungi endofit mampu bertahan hidup di dalam jaringan tumbuhan karena adanya interaksi mutualisme dengan tumbuhan inangnya, yaitu fungi endofit mendapatkan nutrisi dan perlindungan dari tumbuhan inang untuk kelangsungan hidupnya, dan tumbuhan inang mendapatkan proteksi terhadap serangan patogen dari senyawa metabolit fungsional yang dihasilkan oleh fungi endofit[15].

Fungi endofit merupakan fungi yang hidup di dalam jaringan tumbuhan tanpa menimbulkan gejala penyakit pada tumbuhan inangnya. Fungi endofit mampu menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif misalnya senyawa antibakteri, antifungi, antivirus, antikanker, antimalaria dan sebagainya [16]. Fungi endofit menghasilkan berbagai senyawa yang memiliki aktivitas biologi, diantaranya alkaloid, terpenoid, fenolik, dan sebagainya[17]. Fungi endofit yang tumbuh pada jaringan tumbuhan obat, juga dapat menghasilkan senyawa yang memiliki khasiat sama dengan tumbuhan inangnya, walaupun jenis senyawanya berbeda. Bahkan, senyawa yang dihasilkan fungi endofit seringkali memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan aktivitas senyawa dari tumbuhan inangnya[16].

#### **2.3. Fungi Endofit isolat McB**

Koloni isolat McB1 berwarna putih dan warna sebaliknya juga berwarna putih dan berubah menjadi kecoklatan dalam waktu dua minggu. Permukaan miselia isolat fungi endofit DM<sub>1</sub>IIB juga berbeda-beda, mulai dari seperti tepung, bergranul, dan *floccose*. Karakteristik mikroskopis isolat McB1 yaitu hifa bersekat dan berwarna hialin, terdapat konidia yang bercabang dua, berbentuk oval, makrokonidia bersepta tiga, mikrokonidia bulat, dan klamidiospora berwarna hialin [2].

#### 2.4. Fungi endofit *Peniophora sp*

Fungi endofit *Peniophora sp* mempunyai koloni berwarna putih yang lama kelamaan menjadi warna coklat kehitaman dari tengah koloni menuju pinggir koloni seiring masa kultivasi ketika dikultivasi pada medium PDA. *Peniophora sp* mempunyai hifa bersekat, earna hifa hialin, warna konidia hialin, konidia berbentuk *long-ellipsoidal*, konidiofor yang bercabang satu dan mempunyai *fertile portions of conidiophores* [2].

#### 2.5. Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder dapat dihasilkan dari bagian-bagian tumbuhan seperti akar, batang, daun, bunga, dan buah. Masing-masing bagian tumbuhan didalamnya terdapat mikroba endofit salah satunya adalah fungi. Fungi endofit yang diisolasi dari jaringan tumbuhan dan ditumbuhkan pada medium fermentasi dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang sama atau sejenis seperti inangnya dengan bantuan aktivitas enzim didalamnya. Berdasarkan dari beberapa penelitian, senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh fungi endofit dapat berperan sebagai antibiotik (antibakteri dan antifungi), antikanker, antivirus, dan antiserangga[14,18,19].

Fungi endofit memiliki kemampuan memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya beberapa mikroba endofit mampu menghasilkan berbagai senyawa antibiotik seperti senyawa-senyawa anti kanker, anti virus, atau antibakteri. Berbagai jenis tanaman terutama tanaman obat, dapat digunakan sebagai sumber isolat jamur endofit. Salah satu contoh senyawa anti kanker yang dihasilkan dari fungi endofitik adalah senyawa taxol yang diisolasi dari tumbuhan *Taxus brevifolia*. Fungi endofit *Taxomyces andreanae* yang telah diisolasi dari tumbuhan *Taxus brevifolia* memiliki sifat antikanker karena menghasilkan senyawa taxol di dalamnya[20].

Sekitar 300 jenis tanaman yang tersebar dimuka bumi mengandung mikroba endofit yang mampu menghasilkan metabolit sekunder. Mikroba endofit yang menghasilkan metabolit sekunder yang berkhasiat sebagai obat diantaranya adalah *Cryptocandin* adalah antifungi *Candida albicans* dan *Trichopyton spp* yang dihasilkan oleh mikroba endofit *Cryptosporiopsis quercina*, *Pseudomonas viridiflava* menghasilkan *ecomycin* yang yang berkhasiat sebagai antifungi dan antibakteri, phomopsichalasin merupakan metabolit yang diisolasi dari mikroba endofit *Phomopsis spp*. berkhasiat sebagai anti bakteri *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, dan juga dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida tropicalis*. Serta Endofit *Pseudomassaria sp* yang menghasilkan metabolit sekunder yang bekerja seperti insulin[21].

## 2.4. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Produksi Metabolit Sekunder

### 2.4.1. Pengaruh Sumber Karbon

Karbohidrat merupakan senyawa struktural dan penyimpanan di dalam sel kapang dan berperan penting dalam produksi senyawa metabolit sekunder yang berguna mempengaruhi pertumbuhan, dan perkembangannya[22]. Sumber karbon juga sangat berpengaruh terhadap proses fisiologis produksi senyawa antimikroba, transkripsi, ketersediaan nutrisi dan pH selain menjaga integritas sel, juga sebagai katalisator enzim dan protein[23]. Setiap mikroba memiliki sumber karbon yang berbeda-beda dalam produksi metabolit dalam keadaan optimum (Saryono, *et al.*, 2016). [3]

Beberapa jenis karbohidrat yang sering digunakan sebagai sumber karbon sebagai salah satu nutrisi fungi adalah glukosa, dextrosa dan sukrosa. Glukosa adalah monosakarida yang berperan sebagai sumber karbon pada media pertumbuhan fungi. Penelitian sebelumnya berdasarkan penggunaan sumber karbon glukosa sangat optimum untuk produksi senyawa antimikroba dari *Fusarium oxysporum*[3] dan meningkatkan produksi metabolit sekunder berupa beauvericin pada isolat *Fusarium oxysporum* [10] dan *Fusarium rodolens* [24].

Dextrosa adalah bentuk monohidrasi dari glukosa, merupakan monosakarida sintesis sederhana yang digunakan sebagai sumber energi. Dextrosa dapat teroksidasi dalam berbagai jaringan dengan kondisi aerobik dan anaerobik melalui jalur metabolisme (Pubchem NCBI, 2020). Berdasarkan penelitian Merlin *et al.* (2013)[6] penggunaan dektrosa meningkatkan produksi metabolit sekunder dari isolat *Fusarium solani*. Hal ini juga terjadi pada penelitian Rebbapragada dan Kalyanaraman (2016)[25] bahwa, senyawa metabolit potensial sebagai antioksidan mengalami peningkatan pada *Xylaria feejeensis* berdasarkan pemakaian jenis karbon dektrosa. Biosintesis senyawa flavonoid paling tinggi terdapat setelah pemakaian dektrosa sebagai sumber karbon pada isolat fungi *Aspergillus tamarii* [7].

Sukrosa adalah senyawa organik terutama golongan karbohidrat. Sukrosa juga termasuk disakarida yang didalamnya terdiri dari komponen-komponen D-glukosa dan D-fruktosa. Sukrosa sebagai sumber karbon juga sangat mempengaruhi pembentukan senyawa antimikroba pada fungi endofit dari tumbuhan *Moringa oleifera*[9]. Sukrosa juga sangat mempengaruhi produksi senyawa antioksidan pada fungi *Penicillium* spp [26] dan fungi endofit akar kunyit (Septiana dan Simanjuntak, 2017)[sudah ada]. Hal itu juga ditunjuk dalam pemakaian sukrosa sebagai sumber karbon pada *Fusarium oxysporum* menunjukkan kondisi paling optimum dalam pembentukan senyawa metabolit berupa enniatins[10]. Beberapa penelitian diatas

membuktikan bahwa pemakaian sumber karbon berbeda menunjukkan pengaruh yang berbeda pada produksi metabolit sekunder yang di hasilkan oleh kelompok fungi.

#### **2.4.2. Pengaruh Sumber Nitrogen**

Setiap organisme memiliki kondisi optimal yang berbeda dalam pertumbuhan dan perkembangannya [6]. Dalam beberapa kasus pertumbuhan fungi sumber dan konsentrasi nitrogen sangat mempengaruhi produksi metabolit sekunder hal ini sering dilakukan beberapa penelitian terkait untuk menemukan sumber nitrogen paling baik dalam pembentukan metabolit sekunder. Dalam hal ini sumber nitrogen paling umum digunakan adalah *yeast extract*, pepton, dan sodium nitrat yang ditambahkan dalam nutrisi fungi [26]. *Yeast extract* adalah salah satu mikroorganismse yang termasuk dalam golongan fungi uniseluler digunakan sebagai sumber nitrogen organik. Pemilihan sumber nitrogen dengan penggunaan *yeast extract* meningkatkan produksi metabolit sekunder dari isolat *Fusarium solani*. [6].

Pepton adalah protein hasil hidrolisat yang larut dalam air dan tidak menggumpal dalam suhu tinggi. Pepton dihasilkan dalam proses hidrolisis menggunakan asam, basa, enzim baik dalam yang berasal dari bahan baku atau enzim proteolitik yang berasal dari luar. Pepton digunakan sebagai sumber nitrogen organik dalam media fungi Sumber nitrogen berupa pepton sangat mempengaruhi pembentukan pembentukan senyawa metabolit sekunder pada *Fusarium miniliforme* [11].

Sodium nitrat merupakan bahan kimia intermediet (bahan antara) yang selanjutnya dapat diolah dalam pembuatan pupuk yang mengandung senyawa nitrogen,. Senyawa ini berbentuk kristal bening tidak berwarna dan tidak berbau. Bahan kimia ini mempunyai sifat-sifat antara lain mudah larut dalam air, gliserol, amoniak, dan alkohol. Sodium nitrat sering digunakan sebagai sumber nitrogen anorganik sintesis pada beberapa medium pertumbuhan. Pemakaian sodium nitrat sangat mempengaruhi pembentukan senyawa antimikroba pada fungi endofit *Moringa oleifera*[9].

#### **2.4.3. Pengaruh pH**

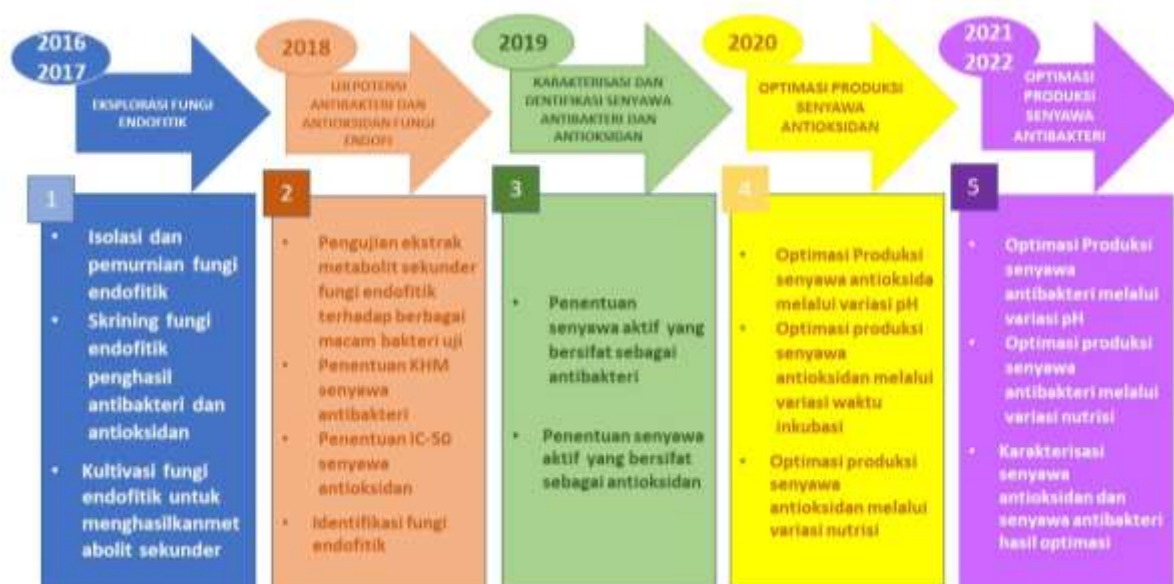
pH awal fermentasi berpengaruh terhadap metabolit sekunder yang dihasilkan kapang. Secara umum kapang akan menghasilkan metabolit sekunder [23]. pH yang optimum untuk menghasilkan senyawa bioaktif dari Fungi *Aspergillus terreus* adalah pH 5,5 dengan sumber karbon berupa glukosa dan sumber N berupa *yeast extract*[27]. Kondisi fermentasi terbaik fungi *Athellia rolfsii* untuk menghasilkan biomassa fungi yaitu pada pH 5 dengan glukosa sebagai sumber C dan yeast extract sebagai sumber N[28]. Produksi metabolit antimikroba dari

fungi *Aspergillus* strain TSF 146 yaitu pada pH 5,5 dengan sumber karbon berupa sukrosa dan sumber nitrogen berupa asparagin[29].

## 2.5. Metode Surface Response Methods (SRM)

Optimasi media kultivasi dapat dilakukan menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM). RSM digunakan untuk mendapat nilai optimum dari penggunaan faktor yang dipakai. Metode ini juga dibuat untuk menganalisa suatu respon Y yang dipengaruhi oleh beberapa variabel bebas atau faktor X guna mengoptimalkan respon tersebut [30].

## 2.6. Peta Jalan Penelitian



Gambar 1. Roadmap penelitian

## **BAB 3**

### **METODE PENELITIAN**

#### **Waktu dan tempat**

Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret 2021 sampai Nopember 2021. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Genetika & Bioteknologi Jurusan Biologi Universitas Sriwijaya Inderalaya.

#### **Prosedur kerja**

##### **1. Pembuatan Medium**

Medium *otato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), dan medium optimasi dibuat sesuai dengan ketentuan dan perlakuan. Dilarutkan dalam akuades lalu dipanaskan di atas hotplate sampai larut. Medium disterilisasi bersamaan dengan alat-alat gelas menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 lbs selama 15 menit.

##### **2. Propagasi Fungi Endofit**

Fungi endofit *Isolat McB1* dan *Peniophora sp* diperbanyak ke dalam media PDA di tabung reaksi untuk kultur stok dan di cawan petri untuk kultur kerja. Inkubasi pada suhu ruang selama 5 hari.

##### **3. Tahap Kultivasi Fungi Endofit**

###### **3.a. Pemilihan Sumber Karbon Terbaik**

Metode yang digunakan dalam pemilihan sumber karbon terbaik adalah metode *One Factor of The Time* (OFAT). Jenis sumber karbon yang digunakan sebagai faktor pemilihan sumber karbon terbaik adalah glukosa, dextrosa sukrosa. Isolat murni *Isolat McB1* dan *Peniophora sp* pada cawan petri diambil menggunakan cork borer diameter 0,5 cm sebanyak 10 potongan [31].

Potongan fungi (agar plug) lalu diinokulasikan kedalam 500 mL medium PDB dengan komposisi medium yang telah di modifikasi adalah kentang 200 g/L, pepton 0.5 g/L, *yeast extract* 0.8 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L, fenilalanin 0.01 g/L, dan sumber karbon 4% [6]. Kultivasi dilakukan selama 30 hari pada suhu ruang dengan dua kali pengulangan, medium akan mengalami perubahan warna yang mengindikasikan bahwa senyawa metabolit sekunder telah terbentuk. Sumber Karbon terbaik di tinjau dari hasil kultivasi yang menghasilkan berat ekstrak metabolit sekunder paling tinggi.

### 3.b. Pemilihan Sumber Nitrogen Terbaik

Metode yang digunakan dalam pemilihan sumber karbon terbaik adalah metode *One Factor of The Time* (OFAT). Jenis sumber nitrogen yang digunakan sebagai faktor pemilihan sumber nitrogen terbaik adalah pepton, *yeast extract*, dan  $\text{NaNO}_3$ . Isolat fungi isolat McB1 dan *Peniophora sp* pada cawan petri masing-masing diambil menggunakan cork borer diameter 0,5 cm sebanyak 10 potongan[31].

Potongan fungi (agar plug) dinokulasikan ke dalam 500 mL medium PDB dengan komposisi medium yang telah di modifikasi adalah kentang 200 g/L, glukosa 4 g/L, *yeast extract* 0.8 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.0 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L, dan fenilalanin 0.01 g/L dan sumber nitrogen 0.005% (Merlin *et al.*, 2013). Kultivasi dilakukan selama 30 hari pada suhu ruang dengan dua kali pengulangan, medium akan mengalami perubahan warna yang mengindikasikan bahwa senyawa metabolit sekunder telah terbentuk. Sumber nitrogen terbaik di tinjau dari hasil kultivasi yang menghasilkan berat ekstrak metabolit sekunder paling tinggi.

### 3.c. Pemilihan pH terbaik

Metode yang digunakan dalam pemilihan sumber karbon terbaik adalah metode *One Factor of The Time* (OFAT). Isolat fungi isolat McB1 dan *Peniophora sp* pada cawan petri diambil menggunakan cork borer diameter 0,5 cm sebanyak 20 potongan (Hasiani *et al.*, 2015)[35]. Potongan tersebut lalu diinokulasikan kedalam 500 mL medium PDB dengan komposisi medium yang telah di modifikasi adalah kentang 200 g/L, *yeast extract* 0.8 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.0 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L, fenilalanin 0.01 g/L, glukosa 4 g/L, dan pepton 0.5 g/L (Merlin *et al.*, 2013). Penetapan pH awal medium fermentasi terbaik ditentukan dalam beberapa titik yaitu pH 5, pH 6, pH 7, dan pH 8.

Pengaturan pH dilakukan dengan penambahan HCL 0,1 M dan KOH 0.1 M. Pemberian HCL 0,1 M dan KOH 0,1 M beberapa tetes sampai batas yang telah ditentukan. Medium kultivasi yang telah ditentukan pH nya dimasukkan dalam botol ukuran 1 liter yang berbeda dengan dua ulangan. Kultivasi dilakukan selama 30 hari pada suhu ruang, medium akan mengalami perubahan warna yang mengindikasikan bahwa senyawa metabolit sekunder telah terbentuk. pH terbaik di tinjau dari hasil kultivasi yang menghasilkan konsentrasi ekstrak metabolit sekunder paling tinggi.

## 4. Ekstraksi metabolit hasil kultivasi pertama fungi endofit

Fungi endofit yang telah tumbuh dipisahkan dari medium dengan cara disaring dengan menggunakan kertas saring. Medium difraksinasi cair-cair

(partisi) dengan pelarut etil asetat. Volume pelarut berjumlah sama dengan media fermentasi yaitu 500 ml dalam satu botol kultur ukuran 1 liter. Pemisahan medium dan hasil ekstrak etil asetat dilakukan dengan corong pisah. Ekstrak yang diperoleh dari fraksi etil asetat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*, sehingga didapatkan ekstrak kental dari fraksi etil asetat tiap isolat fungi endofit. Biomassa fungi yang sudah dipisahkan dari medium ditimbang berat basah, kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 60°C untuk dikeringkan. Kemudian berat kering yang didapatkan ditimbang kembali sehingga diperoleh berat kering biomassa fungi yang konstan [32].

### **5. Optimasi komponen media kultivasi dengan RSM**

Komposisi medium yang digunakan dalam optimasi media kultivasi menggunakan *Response Surface Methodology* meliputi 3 variabel terpilih, yaitu sumber karbon, nitrogen, dan konsentrasi pH. Pada tahap ini, hasil dari pemilihan sumber karbon, nitrogen, dan pH yang telah didapatkan dari uji sebelumnya, kemudian data tersebut digunakan untuk menentukan batas atas dan batas bawah *Central Composite design* (CCD) yang akan digunakan pada metode RSM dengan bantuan perangkat lunak *Design Expert 7.0* dari Stat Ease [30].

Tahap ini akan terdiri dari 9 titik faktorial fraksional  $2^3$  untuk rancangan faktorial yang terdiri dari 3 variabel dan diperbesar dengan 6 *starting point* dan 5 *center point*. Tahap ini dilakukan dengan komposisi medium kultivasi yakni kentang 200 g/L, *yeast extract* 0.8 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.0 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.5 g/L, Fenilalanin 0.01 g/L, sumber karbon, nitrogen, dan pH telah ditentukan melalui rancangan *Central Composite design* (CCD). Medium akan mengalami perubahan warna yang mengindikasikan bahwa senyawa metabolit sekunder telah terbentuk. Kombinasi sumber karbon, nitrogen, dan pH terbaik di tinjau dari hasil kultivasi yang menghasilkan respon berupa berat ekstrak metabolit paling tinggi.

### **6. Ekstraksi metabolit fungi endofit hasil optimasi**

Ekstraksi metabolit hasil optimasi dilakukan dengan cara yang sama dengan ekstraksi pada ekstraksi hasil kultivasi pertama (poin 5).

### **7. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Ekstrak metabolit dari fungi endofitik hasil optimasi dilarutkan dengan pelarut etil asetat yang akan dilakukan analisis dengan kromatografi lapis tipis (TLC, silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck). Ekstrak metabolit sekunder ditotolkan pada plat silika gel, kemudian dikembangkan dengan eluen n-heksan:etil asetat 2:1. Setelah gerakan eluen sampai pada garis batas, plat diangkat dan



disemprotkan dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5%, lalu dipanaskan diatas *hot plate*. Noda yang terbentuk dilihat dengan menggunakan sinar UV 366 nm, dan ditentukan nilai Rf (*Retardation factor*)[33].

$$Rf = \frac{a}{b}$$

Keterangan

a : Jarak rambat senyawa dari titik awal penotolan hingga pusat bercak

b : Jarak rambat fase gerak dari titik awal penotolan hingga garis depan

Tabel 1. Kisaran dan taraf variabel yang diuji pada optimasi komposisi medium

Variabel yang diuji	Kisaran dan taraf					
	Kode	-2	-1	0	1	2
Sumber karbon (g/L)	X1	0	2	4	6	8
Sumber Nitrogen (g/L)	X2	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9
Konsentrasi pH	X3	6	6,5	7	7,5	8

Keterangan : taraf dan kisaran yang tertera masih bernilai sementara



Gambar 2. Diagram alir penelitian

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Optimasi sumber karbon

Fungi isolat McB1 mampu tumbuh dan memproduksi metabolit sekunder pada sumber karbon yang diuji. Pengaruh variasi sumber karbon terhadap biomassa dan produksi metabolit sekunder oleh fungi isolat McB1 disajikan pada Tabel 1. Pemakaian sumber karbon yang bervariasi digunakan untuk menentukan sumber karbon yang paling disukai, hal tersebut ditandai dengan berat ekstrak paling tinggi setelah 30 hari kultivasi.

Tabel 1. Biomassa fungi McB1 dan berat ekstrak hasil optimasi sumber karbon

Sumber karbon	Biomassa (g)	Berat Ekstrak (g)
Sukrosa	2,21±0,12	<b>0,25±0,03</b>
Dekstrosa	<b>2,45±0,07</b>	0,16±0,01
Glukosa	1,32±0,14	0,11±0,03

Fungi isolat McB1 menghasilkan metabolit sekunder pada sumber karbon yang diuji yaitu sukrosa, dextrosa, dan glukosa berturut-turut sebesar 0,25 g, 0,16 g, dan 0,11 g (Tabel 1). Penggunaan sumber karbon berupa sukrosa menghasilkan berat ekstrak paling tinggi pada isolat McB1, sedangkan pertumbuhan sel yang ditinjau dari berat biomassa fungi paling tinggi menggunakan sumber karbon berupa dekstrosa dengan berat ekstrak sebesar 2,45 g. Sukrosa termasuk kedalam golongan disakarida yang terdiri dari glukosa dan fruktosa, sebelum dapat dimetabolisme oleh fungi sukrosa dipecah menjadi fruktosa dan glukosa terlebih dahulu oleh enzim.

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa biomassa fungi isolat McB1 tidak berbanding lurus dengan produksi ekstrak metabolit sekunder yang dihasilkan. Pembentukan biomassa pada penggunaan sukrosa memiliki berat biomassa lebih rendah dibandingkan dengan penggunaan dekstrosa, namun hal tersebut tidak ditunjukkan pada produksi metabolit sekunder. Berat biomassa yang tinggi tidak menghasilkan berat metabolit sekunder yang tinggi juga. Hal ini dikarenakan pertumbuhan sel tidak memiliki hubungan dengan terbentuknya metabolit sekunder yang dihasilkan. Menurut Sanchez *et al.*, [1] biomassa fungi dibentuk pada tahap pertumbuhan sel yang disintesis paling besar pada fase eksponensial sedangkan metabolit sekunder disintesis paling banyak pada fase stasioner menuju fase lag.

Tabel 2. Biomassa fungi *Peniophora* sp dan berat ekstrak hasil optimasi sumber karbon

Sumber karbon	Biomassa (g)	Berat Ekstrak (g)
Sukrosa	0,94±0,05	<b>0,08±0,0002</b>
Dekstrosa	0,93±0,04	0,07±0,01
Glukosa	1,03±0,04	0,06±0,01

## 2. Sumber Nitrogen Terbaik

Fungi isolat McB1 mampu tumbuh dan memproduksi metabolit sekunder dengan sumber nitrogen organik dan anorganik yang diuji. Variasi sumber nitrogen memberikan pengaruh yang berbeda terhadap biomassa fungi isolat McB1 dan berat ekstrak yang dihasilkan. Pengaruh sumber nitrogen terhadap berat ekstrak metabolit sekunder dan biomassa fungi isolat McB1 ditunjukkan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Biomassa fungi McB1 dan berat ekstrak hasil optimasi sumber nitrogen

Sumber nitrogen	Biomassa (g)	Berat Ekstrak (g)
Pepton	<b>0,99±0,007</b>	<b>0,10±0,006</b>
<i>Yeast Extract</i>	0,93±0,08	0,08±0,01
NaNO <sub>3</sub>	0,78±0,01	0,08±0,002

Hasil optimasi sumber nitrogen bagi *Isolat McB1* disajikan dalam Tabel 3. Penggunaan sumber nitrogen berupa pepton, *yeast extract*, NaNO<sub>3</sub> menghasilkan metabolit sekunder berturut-turut sebesar yaitu 0,32 g, 0,39 g dan 0,15 g. Produksi metabolit tertinggi didapat setelah pemakaian sumber nitrogen berupa *yeast extract*, namun *yeast extract* tidak menghasilkan pertumbuhan sel yang tinggi. Biomassa fungi yang tinggi ditunjukkan oleh pemakaian sumber nitrogen berupa pepton. Hal ini selaras dengan penelitian Merlin *et al.*, [2] bahwa produksi metabolit sekunder paling tinggi yang dihasilkan oleh jamur endofit spesies *Fusarium solani* diamati setelah pemakaian sumber nitrogen berupa *yeast extract* dan penelitian Septiana dan Simanjuntak [3] juga menghasilkan bahwa *yeast extract* menjadi sumber nitrogen terbaik dalam memproduksi senyawa antioksidan oleh isolat fungi endofit asal akar kunyit.

Tabel 4. Biomassa fungi *Peniophora* sp dan berat ekstrak hasil optimasi sumber nitrogen

Sumber nitrogen	Biomassa (g)	Berat Ekstrak (g)
Pepton	<b>1,36±0,22</b>	<b>0,10±0,006</b>
<i>Yeast Extract</i>	1,18±0,09	0,08±0,01
NaNO <sub>3</sub>	1,26±0,14	0,08±0,002

### 3. Kisaran pH Terbaik

Hasil optimasi pH dengan variasi pH 5, 6, 7, dan 8 dalam produksi metabolit sekunder disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Biomassa fungi isolat McB1 dan berat ekstrak hasil optimasi pH

pH	Biomassa (g)	Berat Ekstrak (g)
5	1,20±0,14	0,40±0,02
6	1,20±0,63	<b>0,56±0,01</b>
7	<b>2,27±0,18</b>	0,28±0,11
8	1,65±0,21	0,21±0,02

Produksi metabolit sekunder paling optimum pada isolat McB1 pada pH 6. Isolat fungi McB1 dapat menghasilkan metabolit sekunder paling optimal dalam pH 6. Menurut Gazi *et al.*, [4] pertumbuhan sel dan pembentukan metabolit sekunder pada fungi cenderung dihasilkan pada pH optimal yaitu pH asam dengan kisaran pH 5-7. Fungi cenderung tidak akan dapat tumbuh pada pH yang terlalu ekstrem. Dalam beberapa penelitian pH 6 sangat mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder paling optimal. Menurut Merlin *et al.*, [2] fungi endofit *Fusarium solani* membentuk metabolit sekunder paling tinggi pada pH 6. Fungi isolat McB1 memproduksi metabolit sekunder pada pH 5 sebesar 0,40 g, pH 6 sebesar 0,56 g, pH 7 sebesar 0,28 g, dan pH 8 sebesar 0,21 g.

Tabel 6. Biomassa fungi *Peniophora* sp dan berat ekstrak hasil optimasi pH

pH	Biomassa (g)	Berat Ekstrak (g)
5	0,87±0,1	0,08±0,004
6	0,87±0,05	0,06±0,002
7	0,83±0,06	<b>0,09±0,0006</b>
8	<b>0,89±0,04</b>	0,07±0,04

### 4. Hasil Optimasi Media Kultivasi

Pada isolat McB1 digunakan tiga faktor yang dapat mempengaruhi berat ekstrak metabolit sekunder berupa sukrosa dengan rentang nilai 0,36 gL<sup>-1</sup> sampai 0,68 gL<sup>-1</sup>, sumber nitrogen berupa *yeast extract* dengan rentang nilai 0,16 gL<sup>-1</sup> sampai 0,83 gL<sup>-1</sup>, sedangkan pH yang dipakai dengan kisaran 5,1 sampai 6,8. Kisaran dan taraf faktor yang digunakan dapat ditinjau dalam Tabel 7.

Tabel 7. Komposisi medium optimasi fungi isolat McB1, kisaran dan taraf faktor yang diuji pada optimasi

Faktor Optimasi	Kisaran dan Taraf				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Sukrosa(gL <sup>-1</sup> )	0,63	2	4	6	7,36
<i>Yeast Extract</i> (gL <sup>-1</sup> )	0,16	0,3	0,5	0,7	0,83
pH	5,1	5,5	6	6,5	6,8

Hasil optimasi media kultivasi fungi endofit menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Berat ekstrak fungi *Isolat McB1* hasil optimasi media kultivasi dengan 3 faktor menggunakan RSM

Standar	Sukrosa (X <sub>1</sub> , gL <sup>-1</sup> )	<i>Yeast Extract</i> (X <sub>2</sub> , gL <sup>-1</sup> )	pH (X <sub>3</sub> )	Berat Ekstrak (Y, gram)
1	2	0,3	5,5	0,13
2	6	0,3	5,5	0,18
3	2	0,7	5,5	0,09
4	6	0,7	5,5	0,23
5	2	0,3	6,5	0,29
6	6	0,3	6,5	0,27
7	2	0,7	6,5	0,1
8	6	0,7	6,5	0,19
9	0,63	0,5	6	0,11
10	7,36	0,5	6	0,27
11	4	0,16	6	0,16
12	4	0,83	6	0,25
13	4	0,5	5,1	0,18
14	4	0,5	6,8	0,25
15	4	0,5	6	0,28
16	4	0,5	6	0,36
17	4	0,5	6	<b>0,39</b>
18	4	0,5	6	0,34
19	4	0,5	6	0,31

Hasil dari 19 titik perlakuan dari rancangan tersebut diperoleh respon berupa berat ekstrak metabolit sekunder isolat McB1 yang disajikan dalam Tabel 8. Berdasarkan hasil rancangan perlakuan dari 19 titik perlakuan didapat berat ekstrak paling tinggi yang didapat dalam perlakuan *center point* pada standar ke-17 dengan berat ekstrak metabolit yang dihasilkan sebanyak 0,39 g.

## 5. Model Respon isolat McB1

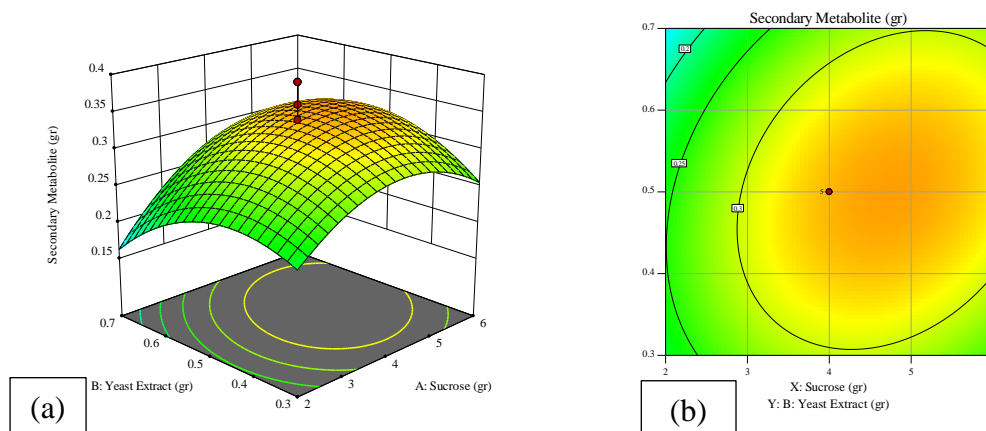
Pemilihan model data dari respon berat ekstrak metabolit sekunder dengan pembacaan hasil analisis *sequential model sum of square* model dipilih berdasarkan nilai *p-value* paling kecil ( $p > 0,05$ ). Berdasarkan analisis *model summary statistics* dan *sequential model sum of square* dapat disimpulkan bahwa model yang tepat dipilih oleh program (*suggested*) untuk menentukan respon metabolit sekunder isolat McB1 yang optimum dan menjelaskan hubungan antara tiga faktor yang dipakai, sehingga dalam analisa pemilihan model, model kuadratik dapat mewakili model yang paling tepat digunakan dalam penelitian ini.

## 6. Hasil ANOVA dan interaksi antara faktor terhadap respon fungsi isolat McB1

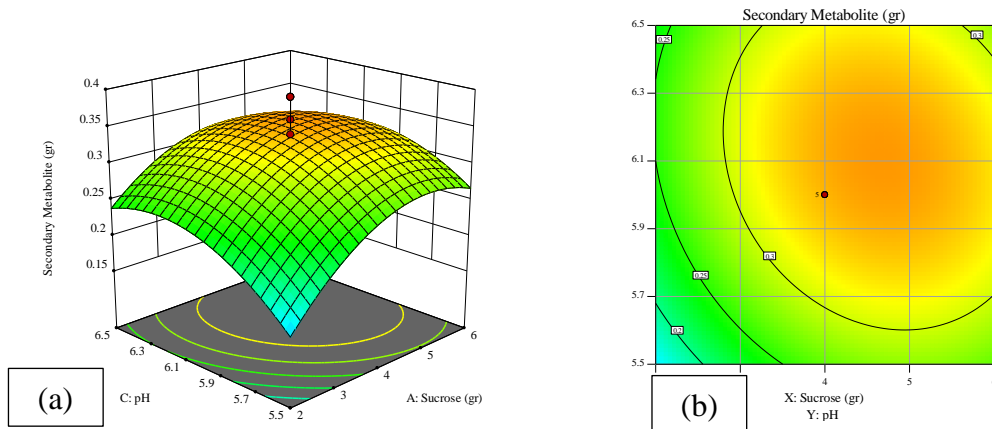
Analisis data menggunakan Design Expert 11.0.0. Berdasarkan hasil ANOVA diketahui *yeast extract*, pH dan model 2FI (interaksi antara 2 faktor) memiliki nilai yang tidak signifikan. Masing-masing nilai p yang ditunjukkan pada tabel berturut-turut yakni 0,5507, 0,0861, 0,1702, 0,3943 dan 0,0665 dimana  $p > 0,05$ . Hal ini menunjukkan bahwa faktor penggunaan sumber nitrogen berupa *yeast extract*, variasi pH dan hubungan antara dua faktor tidak berpengaruh pada produksi metabolit sekunder *Isolat McB1*. Menurut Bas dan Boyaci [5] model data yang signifikan akan memberikan data yang akurat dalam menjelaskan hubungan variabel terikat dan variabel bebas dalam metode analisis respon permukaan.

Faktor penggunaan sumber karbon berupa sukrosa memiliki nilai yang signifikan yang berarti bahwa faktor penggunaan sukrosa berpengaruh nyata pada produksi ekstrak metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *Isolat McB1*. Masing-masing nilai p yakni 0,0145 dimana  $p < 0,05$ .

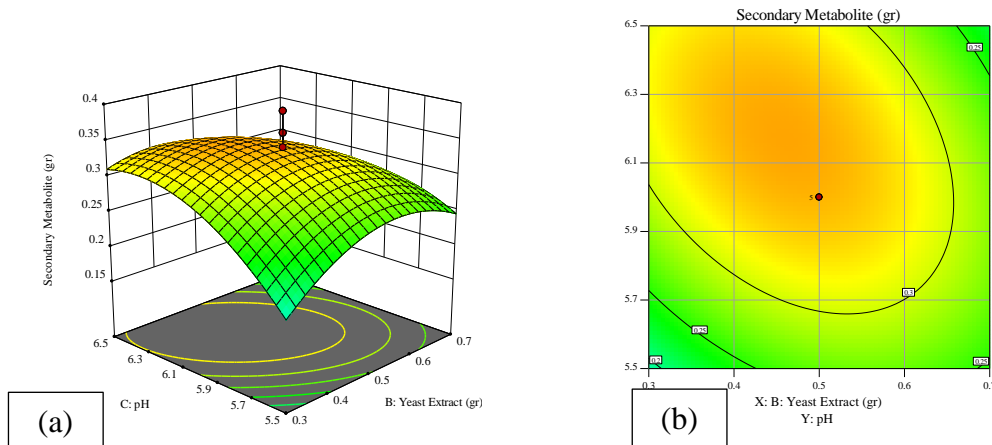
### Sukrosa (A) dan Yeast Extract (B)



### Sukrosa (A) dan pH (C)



### Yeast Extract (B) dan pH (C)



Gambar 1. Grafik 3D-Surface Respon Permukaan dan Kontur Respon Permukaan fungi isolat McB1

Keterangan : (a) Grafik 3D-Respon Permukaan  
(b) Grafik Kontur Respon Permukaan

## 7. Formulasi Medium Optimasi isolat McB1

Persamaan model di atas memberi solusi titik-titik optimal bagi setiap faktor yang disarankan oleh *software* Design Expert 11.0.0. Solusi yang diberikan menunjang usaha peneliti dalam memaksimalkan respon berupa respon pembentukan metabolit sekunder *Isolat McB1* dalam faktor yang berpengaruh yaitu sukrosa, *yeast extract* dan kisaran pH dengan program Design Expert 11.0.0 batasan-batasan yang ditentukan sehingga menghasilkan nilai yang optimal. Kriteria pengoptimalan respon pembentukan metabolit sekunder isolat McB1 disesuaikan dengan batasan-batasan yang didapat ditinjau pada Tabel 9.

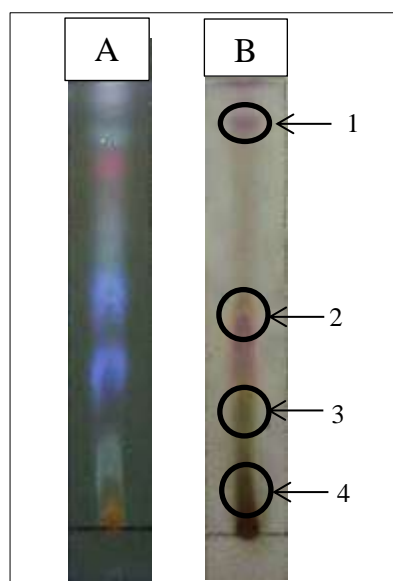
Tabel 9. Formula Komposisi Medium Optimasi fungi isolat McB1

	Sukrosa	<i>Yeast Extract</i>	pH	Metabolit sekunder	<i>Desirability</i>
Taraf	4,5 gL <sup>-1</sup>	0,48 gL <sup>-1</sup>	6,1	0,34 g	0,853

Model matematik produksi metabolit sekunder *Isolat McB1* yang diperoleh dalam optimasi adalah  $Y = -8,297 + 0,185X_1 + 3,022 X_2 + 2,443 X_3 + 0,062X_1X_2 - 0,015X_1X_3 - 0,350X_2X_3 - 0,013X_1^2 - 1,2126X_2^2 - 0,179X_3^2$ , dengan variabel yang menunjukkan respon paling optimum melalui pemakaian konsentrasi Sukrosa ( $X_1$ ) sebesar 4,5 gL<sup>-1</sup>, konsentrasi *yeast extract* ( $X_2$ ) sebesar 0,48 gL<sup>-1</sup> dan pH ( $X_3$ ) sebesar 6,1 dan dugaan respon yang diperoleh adalah sebesar 0,34 g dengan nilai *desirability* 0,853 mendekati 1. Menurut Raissi dan Farzani [6] nilai *desirability* merupakan nilai yang menunjukkan kemampuan program untuk memenuhi keinginan berdasarkan kriteria yang ditetapkan pada produk akhir. Prediksi formula paling optimal yang dapat diterima adalah formula dengan nilai *desirability* maksimum. Kisaran nilainya adalah dari 0 sampai 1,0. Nilai *desirability* yang semakin mendekati nilai 1,0 menunjukkan kemampuan program untuk menghasilkan produk yang dikehendaki semakin sempurna (Raissi & Farzani, 2009).

### 8. KLT dan Uji DPPH Ekstrak Metabolit Sekunder Hasil Optimasi

Ekstrak metabolit sekunder hasil optimasi dianalisis menggunakan KLT. Berdasarkan adanya pergantian komposisi medium dalam proses kultivasi setelah dianalisis fungi *Isolat McB1* menghasilkan senyawa metabolit sekunder dari beberapa golongan senyawa yaitu fenol, flavonoid, terpenoid, dan tanin (Gambar 2. dan Tabel 7).



Gambar 2. Hasil KLT ekstrak metabolit sekunder fungi solat McB1

Keterangan:

A : Visualisasi Plat KLT *Pestaliopsis hawaensis* di Sinar UV 366 nm

B : Profil Kromatogram setelah disemprot H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5%



Identifikasi senyawa bioaktif dilakukan dengan melihat bercak warna yang terbentuk pada plat KLT. Berdasarkan Tabel 4.4. ekstrak metabolit sekunder fungi endofit daun tumbuhan Gelam yang telah di KLT didapatkan senyawa fenol dengan warna kuning dan flavonoid dengan warna jingga. Menurut Harbone [7], senyawa berwarna yang berwarna kuning tergolong senyawa fenol dan flavonoid memiliki warna kuning kecoklatan hingga berwarna merah. Terdapat dua bercak noda lain yang diobservasi bercak warna tersebut berwarna coklat kehitaman yang diidentifikasi sebagai tanin dan bercak noda ungu diidentifikasi sebagai golongan senyawa terpenoid. Menurut Forestryana dan Arnida [8] senyawa golongan tanin akan membentuk bercak noda hijau, coklat sampai kehitaman dan senyawa terpenoid akan membentuk warna merah muda hingga ungu atau violet setelah disemprot dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% dan dipanaskan.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dengan variasi sumber karbon, nitrogen dan pH pada Tabel 7. dapat diketahui bahwa fungi isolat McB1 menghasilkan empat noda yang terbentuk yaitu kuning tua dengan nilai *R<sub>f</sub>* sebesar 0,6 noda kuning dengan nilai *R<sub>f</sub>* 0,4 noda keunguan dengan nilai *R<sub>f</sub>* sebesar 0,78 dan noda coklat dengan nilai *R<sub>f</sub>* sebesar 0,26.

Pada isolat McB1 terdapat dua senyawa yang diduga berpotensi sebagai antioksidan yaitu senyawa flavonoid dan fenol dengan nilai *R<sub>f</sub>* berturut-turut sebesar 0,57 dan 0,4.

Berdasarkan hasil analisis kromatografi lapis tipis (KLT) didapat bahwa senyawa metabolit sekunder isolat McB1 mengalami penambahan dua golongan senyawa baru yaitu golongan senyawa terpenoid dan tanin. Pada penelitian Widjajanti *et al.*, [9] isolat McB1 hanya menunjukkan golongan senyawa yang dimiliki berupa senyawa fenol dan flavonoid. Hal ini diasumsikan terjadi karna adanya perubahan komposisi medium kultivasi yang dipakai. Menurut Abo-Elmag [10], Bahwa ketersediaan sumber nutrisi yang ada dalam suatu medium dapat menginduksi atau menghilangkan suatu senyawa metabolik yang dihasilkan oleh fungi.

Tabel 10. Hasil KLT dan Uji DPPH ekstrak metabolit sekunder fungi isolat McB1

Jumlah senyawa	Warna	Golongan senyawa
4	Kuning tua	Flavonoid
	Kuning	Fenol
	Ungu	Terpenoid
	Coklat	Tanin

Golongan senyawa terpenoid terbentuk karna adanya perbedaan komposisi sumber karbon yang digunakan. Metabolisme karbon sangat mempengaruhi terbentuknya asam asetat

dalam proses seluler. Asam asetat pada metabolisme Sumber karbon akan digunakan sebagai substrat dalam metabolisme primer untuk menghasilkan asetil koa sebagai bahan utama pembentukan senyawa terpenoid dalam biosintesis jalur asam mevalonat. Menurut Agusta [11] mekanisme dari tahap-tahap reaksi biosintesa terpenoid adalah asam asetat setelah diaktifkan oleh koenzim A melakukan kondensasi menghasilkan senyawa asetil koenzim A. Reaksi Asetil koenzim A akan menghasilkan Isopentenil pirofosfat (IPP) yang selanjutnya berisomerisasi menjadi Dimetil alil pirofosfat (DMAPP) oleh enzim isomerase. IPP sebagai unit Isoprene aktif bergabung secara kepala ke ekor dengan DMAPP dan penggabungan ini merupakan langkah pertama dari polimerisasi isopren untuk menghasilkan terpenoid.

Berdasarkan profil kromatogram terbentuknya bercak noda coklat kehitaman yang diduga sebagai senyawa tanin. Senyawa tanin terbentuk diasumsikan karna adanya pemakaian L-fenilalanin dalam komposisi medium optimasi isolat McB1. L-fenilalanin digunakan sebagai prekursor pembentukan tanin. Menurut Hernawan dan Setyawan [12] jalur asam sikimat digunakan dalam sintesis kelompok tanin yang dapat terhidrolisis dan senyawa-senyawa berbasis asam amino fenilalanin. Asam amino fenilalanin digunakan dalam pembentuk asam galat, dari proses pembentukan asam galat tanin akan dibentuk melalui derivat asam galat yang teresterkan.

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. KESIMPULAN**

1. Penggunaan sukrosa sebesar  $4,5 \text{ gL}^{-1}$ , *yeast extract* sebesar  $0,48 \text{ gL}^{-1}$  dan pH 6,1 didiperoleh respon metabolit sekunder isolat fungi endofit McB1 sebesar 0,34 g,
2. Profil kromatogram ekstrak metabolit sekunder isolat fungi endofit McB1 hasil optimasi menunjukkan adanya senyawa flavonoid, fenol, terpenoid dan tanin.
3. Hasil kultivasi I fungi endofit *Peniophora* sp menghasilkan berat ekstrak yang terbesar dengan penggunaan sukrosa sebagai sumber karbon, pepton sebagai sumber nitrogen, dan pH 7.

#### **B. SARAN**

Untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan optimasi dengan membuat variasi faktor-faktor yang lain

## VI. LUARAN DAN TARGET CAPAIAN

**Tabel 5 luaran Penelitian Unggulan Kompetitif**

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian	
			TS*	TS+1
	Luaran Wajib			
1	Tesis dan/atau Skripsi	<b>Skripsi</b> dari mahasiswa bimbingan yang terlibat dalam riset tersebut	1 orang selesai	1 orang selesai
2	Publikasi karya ilmiah ( <b>salah satu dari</b> )	Internasional Bereputasi		
		Nasional Terakreditasi minimal Sinta 3	Dikirimkan	Dipublikasikan
	Luaran Tambahan berupa ( <b>salah satu dari</b> )			
1	Produk atau proses yang berpotensi memperoleh HKI			
2	Buku ajar ber-ISBN			
3	Teknologi tepat guna/rekayasa sosial-ekonomi/rumusan kebijakan publik			
4	Pengakuan dari peers-nya sebagai narasumber di bidangnya (berupa undangan sebagai pembicara kunci dalam temu ilmiah atau sebagai dosen/peneliti tamu), atau meraih penghargaan ( <i>award</i> ) dari pemerintah atau asosiasi			
5	Terbangun jejaring kerja sama antar peneliti dan antar Lembaga			

\*TS = Tahun Sekarang

Diisi Dikirimkan/Dipublikasikan.

Artikel sudah disubmit ke Jurnal Science and Technology Indonesia (Sinta 1 terindeks Scopus, kategori Quartil baru dalam proses).

Alamat url : <https://sciencetechindonesia.com/index.php/jsti>.

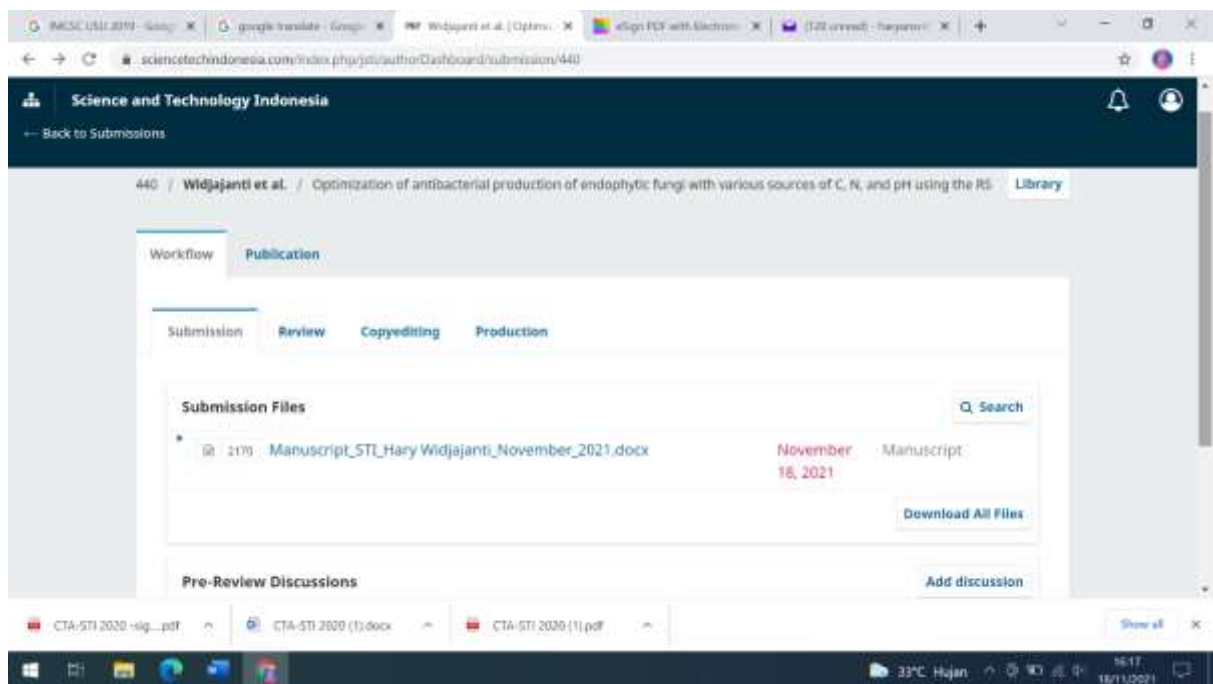
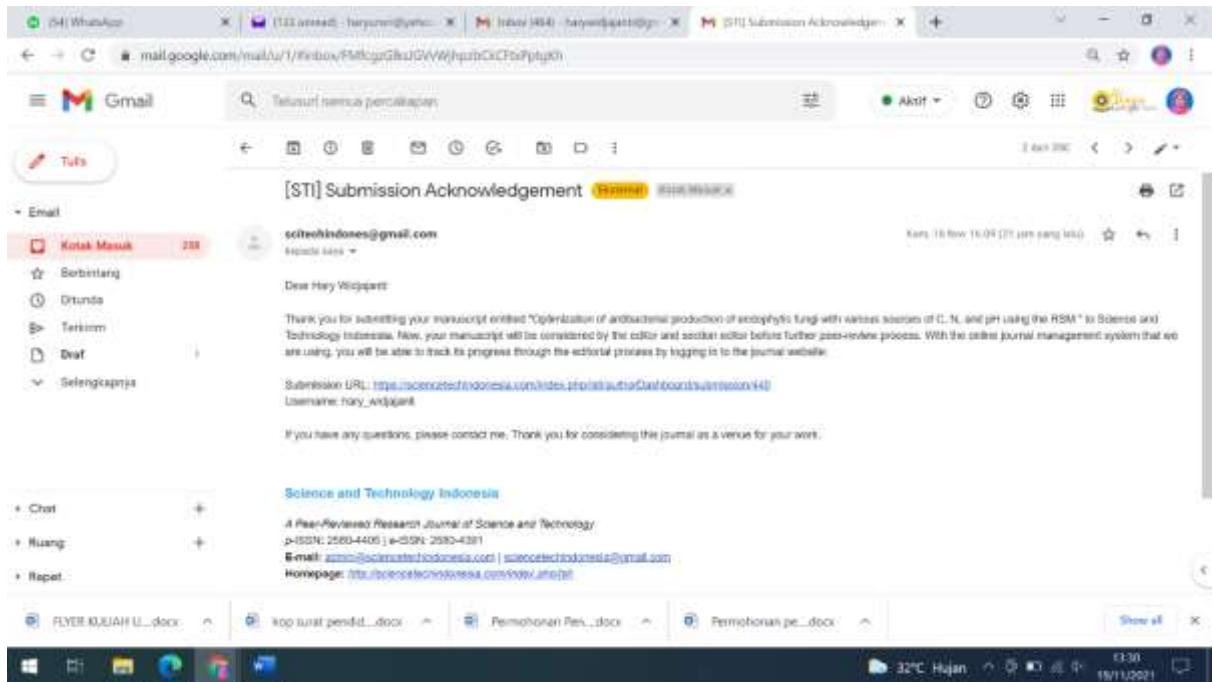
## DAFTAR PUSTAKA

1. Liu, X, Don, M, Chen, X, YanG 2007. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. From *Ginkgo biloba*, *Food Chemistry* 105(2):548-554
2. Widjajanti, H., Muharni, E.Nurnawati. 2020. Potensi fungi endofitik daun tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* powell) sebagai sumber antioksidan dan optimasi produksinya. Laporan Penelitian Unggulan Kompetitif Universitas Sriwijaya.
3. Saryono, N., Christine , J., Dan Linggawati, A. 2016. Penentuan Medai Produksi Senyawa Antimikrobia Endofit Dari *Fusarium oxysporum* LBKURCC41 Umbi Tumbuhan Dahlia (*Dahlia variabilis*). *Indonesian Chemia Acta*. 6(1) :1
4. Septiana, E., Sukarno, N., Sukarno, dan Simanjuntak, P. 2017. Endophytic Fungi Associated With Turmeric (*Curcuma longa* L.) Can Inhibit Histamine-Forming Bacteria in Fish. *Hayati Journal of Biosciences*. 24(1) : 46-52.
5. Rollando, R. 2018. Combination of *Hedyotis corymbosa* l. and *Tinospora crispa* ethanolic extract increase cisplatin cytotoxicity on t47d breast cancer cells. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Researsch*.11(7):171-177.
6. Merlin, J. N., Christhudas, I. V. S. N., Kumar, P. P., dan Agastian, P. 2013. Optimization Of Growth And Bioactive Metabolite Production: *Fusarium solani*. *Asian J Pharm Clin Res*. 6(3): 98-103.
7. Bose, P., Gowrie, S. U., dan Chaturdevi, G. 2019. Optimization of Culture Conditions for Growth and Production of Bioactive Metabolites by Endophytic Fungus– *Aspergillus tamarii*. *International Journal of Pharmacy and Biological Science*. 9(2): 469-478
8. Garyali, S., Kumar, A., dan Reddy, M. S. 2014. Enhancement of taxol production from endophytic fungus *Fusarium redolens*. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 19(5), 908-915.
9. Arora, D. S., dan Kaur, N. 2019. Antimicrobial potential of fungal endophytes from *Moringa oleifera*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 187(2), 628-648.
10. Lee, H. S., Song, H. H., Ahn, J. H., Shin, C. G., Lee, G. P., dan Lee, C. 2008. Statistical optimization of growth medium for the production of the entomopathogenic and phytotoxic cyclic depsipeptide beauvericin from *Fusarium oxysporum* KFCC 11363P. *Journal of microbiology and biotechnology*, 18(1), 138-144.
11. Pradeep, F. S., Dan Pradeep, B. V. 2013. Optimization Of Pigment And Biomass Production From *Fusarium moniliforme* Under Submerged Fermentation Conditions. *Culture*, 5(7); 5260535
12. Deka, D., dan Jha, D. K. 2018. Optimization of culture parameters for improved production of bioactive metabolite by endophytic *Geosmithia pallida* (KU693285) isolated from *Brucea mollis* Wall ex. Kurz, an endangered medicinal plant. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(3), 1205-1213.
13. Srikandace, Y., Yatri, H., dan Partomuan, S. 2007. Seleksi Mikroba Endofit Curcuma zedoria dalam Memproduksi Senyawa Kimia Antimikroba. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 5 (2): 77-84.
14. Zhao J<sup>1</sup>, Fu Y, Luo M, Zu Y, Wang W, Zhao C, Gu C.2012. Endophytic fungi from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] produce antioxidant cajaninstilbene acid. *J Agric Food Chem*. 60(17):4314-9.
15. Tan, RX and WX.Zou.2001. Endophytes : a rich source of functional metabolites. *Nat Prod.Rep*.18:448-459.

16. Liu, X, Don, M, Chen, X, YanG 2007. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. From *Ginkgo biloba*, *Food Chemistry* 105(2):548-554
17. Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., Zhong, L., Liu, X., dan Gao, X. 2010. Endophytic Fungi for Producing Bioactive Compounds Originally from Their Host Plants. *Formatex*. 567-576.
18. Kumala, S. 2014. Mikroba Endofit: Pemanfaatan Mikroba Endofit dalam Bidang Farmasi. Jakarta: PT. ISFI Penerbitan. V + 105 hlm
19. Shibuya, H., Agusta, A., Ohashi, K., Maehara, S., dan Simanjuntak, P. 2005. Biooxidation of (+)-Catechin and (-)-Epicatechin into 3,4-Dihydroxy Flavan Derivatives by The Endophytic Fungus *Diaporthe* sp. Isolated from A Tea Plant. *Chem Pharm Bull*. 53(7): 866-867.
20. Strobel, GA, and B.Daisy (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol.and Mol. Biology Rev* 67(4):491-502.
21. Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian* Vol.II,No.3:113-126.
22. Abo-Elmag, H.I. 2014. Evaluation and Optimization Of Antioxidant Potentiality Of *Chaetomium madrasense* AUMC 9376. *Journal Genetic Engineer Biotechnol*. 12 (1) : 21-26.
23. Septiana, E., Sukarno, N., Sukarno, dan Simanjuntak, P. 2017. Endophytic Fungi Associated With Turmeric (*Curcuma longa* L.) Can Inhibit Histamine-Forming Bacteria in Fish. *Hayati Journal of Biosciences*. 24(1) : 46-52.
24. Xu, L. J., Liu, Y. S., Zhou, L. G., Dan Wu, J. Y. 2009. Enhanced Beauvericin Production With In Situ Adsorption In Mycelial Liquid Culture Of *Fusarium redolens* DZF2. *Process biochemistry*, 44(10), 1063-1067
25. Rebbapragada, D., dan Kalyanaraman, R. 2016. Evaluation and Optimization of Antioxidant Potentiality of *Xylaria Feejeensis* HMJAU22039. *Asian J Pharm Clin Res*, 9(2), 269-273.
26. Arora, D.S., Chandra, P., Dan Kaur, G.J. 2012. Optimization And Assay Of Antioxidant Potential Of Two *Penicillin* By Different Procedures. *Current Biotechnology*. 1(1):2-10
27. Mathan, S. V.Subramanian, and S.Nagamony.2013. Optimization and antimicrobial metabolite production from endophytic fungi *Aspergillus terreus* KC 582297 *European Journal of Experimental Biology*, 2013, 3(4):138-144
28. Yuniati, Y, Y.Yuliati, E.Monica, R. Rollando.2018. Effect of Variation Conditions Fermentation to Production Biomass of Endophytic Fungi *Athelia rolfsii* Strain orchid. *J. Pharm. Sci. & Res*. 10(11): 2862-2865
29. Bhattacharyya, P.N and D. K. Jha. 2011.Optimization of cultural conditions affecting growth and improved bioactive metabolite production by a subsurface *Aspergillus* strain TSF 146. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2(4):133-143
30. Ratnawati, S.E, N.Ekantari, R.W.Padripta,B.L. Paramita. 2018. Aplikasi Response Surface Methodology (RSM) pada Optimasi Ekstraksi Kalsium Tulang Lele. *Jurnal Perikanan Universitas Gadjah Mada* 20 (1): 41-48 ISSN: 0853-6384 eISSN: 2502-5066
31. Hasiani, V. V., Ahmad, I., dan Rijai, L. 2015. Isolasi Jamur Endofit Dan Produksi Metabolit Sekunder Antioksidan Dari Daun Pacar (*Lawsonia inermis* L.). *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 1(4): 146-153.
32. Jamal, Y., Muhamad, I., Atit, K., dan Andria A. 2008. Diversitas dan Profil Metabolit Sekunder Jamur Endofit yang Diisolasi dari Tumbuhan Gambir (*Uncaria gambir*) Serta Aktivitas Biologisnya Sebagai Antibakteri. *Berita Biologi*, 9(1): 149-154.

33. Rusnaeni, Desy I., Fitria L., Imelda M, dan Is I. 2016. Identifikasi Asam Mefenamat dalam Jamu Rematik yang Beredar di Distrik Heram Kota Jayapura Papua. *J. Pharmacy*. 13(1): 84-91.

**BUKTI SUBMIT KE JURNAL SCIENCE AND TECHNOLOGY INDONESIA  
18 NOPEMBER 2021 (HARY WIDJAJANTI, FMIPA)**





# Optimization of antibacterial production of endophytic fungi with various sources of C, N, and pH using the RSM

Hary Widjajanti<sup>1\*</sup>, Elisa Nurnawati<sup>1</sup>, Muharni<sup>1</sup>, Eca Desriana Zahwa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Sriwijaya  
Jl. Palembang-Prabumulih, Km 32 Inderalaya Ogan Ilir 30662

\*) Corresponding author: hary\_widjajanti@unsri.ac.id

## Abstract

Secondary metabolites extract of McB<sub>1</sub> endophytic fungi from gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell.) leaves have a high potential antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC8739 and *Staphylococcus aureus* ATCC6538 with flavonoids and phenol as bioactive compound. The low production of secondary metabolites extract in the cultivation stage and the high potential antibacterial activity of bioactive compounds produced by McB<sub>1</sub> endophytic fungi require special treatment for optimize the secondary metabolites product. This is possibly achieved by optimizing the composition of the cultivation media, where various sources of carbon, nitrogen, and pH produce different amounts and classes of secondary metabolites. The objectives of the research to obtain the optimum interaction between sources of carbon, nitrogen, and pH for the production of secondary metabolite extract using Response Surface Methodology (RSM). The results showed that the highest extract (0.25 g) with the composition of sucrose as carbon source, yeast extract as nitrogen source, and pH 6. Based on the optimization of the medium with a variation of 4.5 gL<sup>-1</sup> sucrose, 0.48 gL<sup>-1</sup> yeast extract, and pH 6.1 yielded 0.34 g of secondary metabolites extract of McB<sub>1</sub> endophytic fungi. The chromatogram profile of the optimized secondary metabolite extract showed the presence of flavonoids, phenols, terpenoids, and tannins.

## Keywords

Endophytic fungi, antibacterial compound, Response Surface Methodology (RSM)

## 1. Introduction

Endophytic fungi live in plant tissues at a certain time to form colonies and produce the same bioactive compounds as the host plants, due to the genetic transfer followed by the coevolution process (Jeffrey et al. 2008). The McB<sub>1</sub> endophytic fungi of gelam leaves produced secondary metabolites as antibacterial against *Escherichia coli* with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 100 µg/mL, metabolite extract of 0.25 g, and fungal biomass of 2.34 g Widjajanti et al (2019). Efforts are required to increase the low production of secondary metabolites at the cultivation stage and the potential for the activity of bioactive compounds produced by modifying the cultivation media composition. Meanwhile, the differences in the composition of the cultivation media lead to different amounts of metabolites and their profiles. Discovering the most optimal conditions in the growth process and the formation of secondary metabolites from isolates is the basis for optimizing cultivation media (Goutam et al., 2014), which is achieved by modifying the carbon, nitrogen source, and pH (Septiana et al., 2017).

Carbon source is an important basic nutrient for fungi which is used as the main structure in providing energy for cell growth in metabolic processes (Moore, 1972). Sucrose as a carbon source also greatly affects the formation of antimicrobial compounds in endophytic fungi from *Moringa oleifera* plants (Arora and Kaur, 2019). Previous research based on the use of glucose as carbon sources and increasing the production of secondary metabolites in the form of beauvericin in *Fusarium oxysporum* isolates (Lee et al., 2008) and *Fusarium rodolens* (Xu et al., 2010). The highest biosynthesis of flavonoid compounds was found after the use of dextrose as a carbon source in isolates of the fungus *Aspergillus tamarii* (Bose et al., 2019).

In some cases the growth of the source fungi and the nitrogen concentration greatly affect the production of secondary metabolites, it is often carried out several related studies to find the best nitrogen source in the formation of secondary metabolites. In this case, the most commonly used nitrogen sources are yeast extract, peptone, and sodium nitrate which are added to fungal nutrition (Arora et al., 2012).

The optimal growth of fungi in the pH range of 5-8 (Gupta et al., 2010). Production of secondary metabolites in the fungal group that *Fusarium incarnatum* produces the most optimum pigment at pH 5 (Himalini and Razia, 2018), while at pH 6 secondary metabolites were produced at the most optimum in the fungi *Geosmithia pallida* (Deka and Jha, 2018) and *Fusarium solani* (Merlin et al., 2013). The condition of pH 7 greatly affects the formation of antimicrobial compounds in endophytic fungi *Moringa oleifera* (Arora and Kaur, 2019) while at pH 8 greatly affects the formation of naphthoquinones pigments in *Fusarium verticillioides* (Boonyapranai et al., 2008).

The cultivation media can be optimized using Response Surface Methodology (RSM) to obtain the optimum factors. It also analyzes the secondary metabolite formation response influenced by several independent variables to enhance the response examined (Qiu et al., 2012). The objectives of the research to obtain the optimum interaction between sources of carbon, nitrogen, and pH for the production of secondary metabolite extract using Response Surface Methodology (RSM).

## **2. Experimental Section**

### **2.1. Materials**

Pure culture of McB<sub>1</sub> endophytic fungi, aquadest, alcohol, dextrose, glucose, sucrose, ethyl acetic, phenylalanine, HCl, Potato Dextrose Agar (PDA) medium, Potato Dextrose Broth (PDB) medium, chloramphenicol, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KOH, MgSO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, peptone, sodium nitrate, and yeast extract.

## **2.2. Methods**

### **2.2.1. Propagation of endophytic fungi**

Pure culture of McB<sub>1</sub> endophytic fungi were propagated on PDA medium in test tubes and petri dish for stock and working cultures. Subsequently, it was incubated at room temperature until the fungi grew for approximately 5-7 days.

### **2.2.2. Selection of carbon source**

The carbon sources used were glucose, dextrose, sucrose, meanwhile, McB<sub>1</sub> endophytic fungi in 10 agar plug were inoculated into 500 mL PDB. It was conducted with the modified medium composition of potato 200 g/L, peptone 0.5 g/L, yeast extract 0.8 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g/L, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0.01 g/L phenylalanine, and 4% carbon source (Merlin et al, 2013).

### **2.2.3. Selection of nitrogen source**

The nitrogen sources used were peptone, yeast extract, and sodium nitrate. Subsequently, the pieces of McB<sub>1</sub> endophytic fungi in 10 agar plug were inoculated into 500 mL PDB with the modified medium composition of potato 200 g/L, glucose 4 g/L, yeast extract 0.8 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L, and phenylalanine 0.01 g/L and 0.005% nitrogen (Merlin et al., 2013).

### **2.2.4. Selection of pH**

McB<sub>1</sub> endophytic fungi in 10 agar plug were inoculated into 500 mL PDB with the composition of the modified medium, namely potato 200 g/L, yeast extract 0.8 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L, phenylalanine 0.01 g/L, glucose 4 g/L, and peptone 0.5 g/L (Merlin et al., 2013). The initial pH of the fermentation medium was 5, 6, 7, and 8, subsequently, it was adjusted by adding 0.1 M HCL or 0.1 M KOH.

### **2.2.5. Optimization of cultivation medium composition with RSM**

In the optimization of cultivation medium using Response Surface Methodology, the composition includes 3 selected variables, namely sources of carbon, nitrogen, and pH. The data of the selection from the previous test was used to determine the upper and lower limits of the Central composite design (CCD). This is also useful in the RSM method with the Design-Expert 7.0 from Stat-Ease (Qiu et al., 2012).

This stage consisted of 9 fractional factorial points 23 for a factorial design compiling from 3 variables, which is enlarged by 6 starting and 5 center points. The total of all experimental units in this stage was 19 and was optimized using the cultivation medium composition of potato 200 g/L, yeast extract 0.8 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L, phenylalanine 0.01 g/L, sources of carbon, nitrogen, and pH determined by Central Composite Design (CCD).

#### **2.2.6.Extraction of endophytic fungi secondary metabolite**

The biomass of endophytic fungi was separated from the optimization medium using filter paper. The liquid-liquid fractionation (partition) was carried out with ethyl acetate solvent in a ratio of 1:1 and the extract collected was concentrated with a rotary evaporator to obtain the ethyl acetate extract of endophytic fungi. Subsequently, the separated biomass was dried using an oven to obtain the dry weight (Bhardwaj et al., 2015).

#### **2.2.7.Thin Layer Chromatography (TLC)**

The optimized extract from McB<sub>1</sub> endophytic fungi was dissolved with ethyl acetate, spotted with a capillary pipette on a TLC plate (TLC, silica gel 60 F254, Merck), and eluted in a chamber that contained eluent with a ratio of n-hexane: ethyl acetate 3:2. When the eluent reached the boundary line to form a TLC chromatogram pattern, the plate was removed and the stain formed was viewed using 366 nm UV light. For visualization observations, it was sprayed with 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagent and heated on a hot plate at a temperature of 80°C. The stains formed were identified through color spots and the R<sub>f</sub> value (Retardation factor) was determined using the formula below:

$$R_f = \frac{\text{Distance traveled by component}}{\text{Distance traveled by solven}}$$

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. The carbon source for McB<sub>1</sub> endophytic fungi**

McB<sub>1</sub> endophytic fungi grew and produced secondary metabolites on all sources of sucrose, dextrose, or glucose. Meanwhile, the weight of the ethyl acetate extract and the mass of biomass produced were shown in Table 1. After 30 days of cultivation, the highest extract yielded and biomass weight was 0.25 g and 2.45 g with a carbon source of dextrose and sucrose, respectively.

Sucrose belongs to the disaccharide group which is broken down into glucose and fructose by enzymes before it is metabolized by fungi. According to Mao (2005), this occurs through the use of substrates with a slow metabolism by fungi due to the inability to hydrolyze, characterized by non-optimal cell growth. Meanwhile, the formation of secondary metabolites is induced by slow growth due to the depletion of the main carbon source.

Table 1 shows the biomass of McB<sub>1</sub> endophytic fungi which is not directly proportional to the production of secondary metabolites. The use of sucrose produced a lower weight of biomass than dextrose, however, this is not shown in the production of secondary metabolites. Furthermore, high biomass weight did not produce higher secondary metabolite weight because cell growth has no relationship with their formation. According to Sanchez et al. (2010), biomass is formed at the cell growth stage which is dominantly synthesized at the exponential phase, while secondary metabolites are at the stationary to the lag phases.

### **3.2. The nitrogen source for McB<sub>1</sub> endophytic fungi**

McB<sub>1</sub> endophytic fungi also grew and produced secondary metabolites on all nitrogen sources, namely peptone, yeast extract, and NaNO<sub>3</sub>. The weight of the ethyl acetate extract and biomass produced are shown in Table 2. After 30 days of cultivation, the highest extract and biomass weight were 0.39 and 1.36 g with nitrogen sources in form of yeast extract and peptone, respectively.

The highest metabolite production was obtained after the use of yeast extract, which did not produce maximum fungal biomass, however, there was high production of biomass from peptone. Merlin et al. (2013) stated that the highest production of secondary metabolites by the endophytic fungi of *Fusarium solani* was observed after the use of yeast extract. According to Septiana and Simanjuntak (2017), yeast extract is the best nitrogen source in producing antioxidant compounds by isolates of endophytic fungi from turmeric roots. Described by Wang et al. (1978). The amino acids found in yeast extract and peptone contain glutamic acid, glutamine, cysteine, methionine, arginine, asparagine, proline, and phenylalanine. Besides containing amino acids, yeast extract also contains several minerals such as sodium, chloride, calcium, magnesium, potassium phosphate, and sulfate as elements used in the growth process by fungi.

### **3.3. pH range for McB<sub>1</sub> endophytic fungi**

The McB<sub>1</sub> endophytic fungi were able to grow and produce secondary metabolites at all tested pH values, which include 6, 7, and 8. The extract weight of the ethyl acetate and fungi

biomass produced with variations in pH are shown in Table 3. After 30 days of cultivation, the highest extract was 0.56 g at pH 6.0, while the biomass weight was 2.27 g at pH 7.0. Since the most optimum secondary metabolite production was obtained at pH 6, therefore, the fungi produced maximally in acidic pH. It has been previously examined by Gazi et al., (2004) that cell growth and the formation of secondary metabolites in fungi tend to be produced at optimal pH with a range of 5-7. Research conducted by Merlin et al. (2013) also found that the isolates from the endophytic fungi of *Fusarium solani* formed the highest secondary metabolites at pH 6.

### **3.4. Results of cultivation medium optimization for McB<sub>1</sub> endophytic fungi**

In McB<sub>1</sub> endophytic fungi, three factors were used to affect the weight of secondary metabolite extract with sucrose as carbon source with a value ranging from 0.36 gL<sup>-1</sup> to 0.68 gL<sup>-1</sup> and yeast extract as nitrogen source with a value between 0.16 gL<sup>-1</sup> to 0.83 gL<sup>-1</sup>, while the pH ranges from 5.1 to 6.8. Meanwhile, the range and level of the factors used can be reviewed in Table 4. The extract weight of the ethyl acetate and biomass of endophytic fungi optimized using sucrose, yeast extract, and pH are presented in Table 5.

The 19 treatment points of the design gave a response in form of the McB<sub>1</sub> endophytic fungi extract weight, as presented in Table 5. The highest extract weight was obtained in the center point at the 17<sup>th</sup> standard with the metabolite extract weight of 0.39 g.

### **3.5. Response model of McB<sub>1</sub> endophytic fungi**

The data model was selected based on the response from the weight of the secondary metabolite extract by reading the results of the sequential analysis of the sum of squares in line with the smallest p-value ( $p > 0.05$ ). According to the analysis of the summary statistics and the sequential sum of the square, it was concluded that the appropriate model was selected by the program. This was conducted to determine the optimum response of the secondary metabolite of the McB<sub>1</sub> endophytic fungi and explain the relationship between the three factors. Therefore, the quadratic model in the selection analysis represented the most appropriate model used in this research.

### **3.6. Results of analysis of variance (ANOVA) and interaction between factors on the response of McB<sub>1</sub> endophytic fungi**

Based on the data processing using Design Expert 11.0.0 and analysis of variance (Anova), the yeast extract, pH, and the 2FI model (interaction between 2 factors) have insignificant values. As shown in the table, each p-value has 0.5507, 0.0861, 0.1702, 0.3943 and 0.0665,

respectively, where  $p > 0.05$ . This indicated that the use of nitrogen sources such as yeast extract, variations in pH, and the relationship between the two factors did not affect the production of secondary metabolites. According to Bas and Boyaci (2007), a significant data model provides accurate data to explain the relationship between the dependent and independent variables in the response surface analysis method.

The use of a carbon source in form of sucrose had a significant value of 0.0145 where  $p < 0.05$ , which affected the production of secondary metabolite extracts. Similarly, the use of sucrose affected on the formation of secondary metabolites of McB<sub>1</sub> endophytic fungi. This is because sucrose is a disaccharide that is difficult to synthesize and is not favored by fungi. Therefore, other carbon sources are used until the condition of the first preferred source is exhausted, which causes metabolic imbalance and physiological stress. Martin and Demain (1980) stated that in a medium, a carbon source such as sucrose is used longer by fungi and after the preferred source, while the latter is used for the biosynthesis of secondary metabolites.

The use of sucrose, yeast extract, and pH is shown in form of contour plots and response surface graphs in Figure 1. Based on the analysis, there is an increase in the concentration of sucrose from 0.68 g to 4 g and yeast extract from 0.16 to 0.5 g. Furthermore, the addition of sucrose concentration above 4 g and yeast extract above 0.5 g gave a decrease in the concentration of secondary metabolites and the optimum use of sucrose was 4 g and yeast extract was 0.5 g. This decrease in production was explained by Tudzynski (2014) which stated that some nitrogen and excess carbon sources used in the cultivation medium cause inhibition of secondary metabolite formation by the substrate. Since these conditions significantly affect the specific growth process, the cell growth rate becomes constant and there is no physiological imbalance that induces the formation of secondary metabolites leading to inhibition by the substrate.

Based on Figure 1, as the pH value increases from 5.5 to 6.5, the production of secondary metabolites also increases, and the optimum value is obtained at pH 6. According to Arora and Chandra (2010), the appropriate pH is among the factors that determine growth, product formation, and enzymes used in metabolic processes. The optimum pH Under within the acidity range was able to affect the work of the enzymes produced. This showed that fungi can grow optimally and produce secondary metabolites at a pH within the acidic range.

### **3.7. The formulation for Medium optimization of McB<sub>1</sub> endophytic fungi**

Figure 1 provides optimal point solutions for each factor suggested by Design Expert 11.0.0. Meanwhile, the production of secondary metabolites was increased with influencing

factors, namely sucrose, yeast extract, and pH range using the Design Expert 11.0.0 program with the specified limits to produce the optimum value. The criteria for optimizing the response to the production of secondary metabolites are adjusted to the limits in Table 6.

The mathematical model for the secondary metabolite production of McB1 endophytic fungi obtained in the optimization was  $Y = -8.297 + 0.185X_1 + 3.022 X_2 + 2.443 X_3 + 0.062X_1X_2 - 0.015X_1X_3 - 0.350X_2X_3 - 0.013X_1^2 - 1.2126X_2^2 - 0.179X_3^2$ , where the variables with the most optimum response were sucrose ( $X_1$ ) of  $4.5 \text{ gL}^{-1}$ , yeast extract ( $X_2$ ) of  $0.48 \text{ g L}^{-1}$  and pH ( $X_3$ ) of 6.1. Moreover, the estimated response obtained was 0.34 g with a desirability of 0.853, which is approximately 1. According to Raissi and Farzani (2009), desirability is a value showing the program's ability to fulfill the desires based on the criteria set on the final product. Therefore, the most optimal formula accepted is that with the maximum desirability value in a range of 0 to 1.0. The desirability value closer to 1.0 indicates that the program's ability to produce the desired product is getting more perfect.

### **3.8. TLC secondary metabolite extract from optimization of McB1 endophytic fungi**

The optimized secondary metabolite extract was analyzed using thin-layer chromatography (TLC). Based on the change in the medium composition of the cultivation process, the fungi produced secondary metabolites from several groups of compounds, namely phenols, flavonoids, terpenoids, and tannins (Figure 2).

The bioactive compounds were identified by examining the color spots formed on the TLC plate. Based on Table 6, the secondary metabolite extract of the McB1 endophytic fungi in TLC obtained yellow phenol compounds and flavonoids with an orange color. According to Harbone (2006), yellow-colored compounds are classified as phenolic, while flavonoids have a brownish-yellow to red color. Furthermore, the two other spots observed were blackish-brown spot which was identified as tannins, while purple spots were identified as terpenoid. Bioactive compounds from the tannin group form green, brown to black spots, while terpenoid formed pink to purple or violet after being sprayed with 5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and heated.

Based on the results of TLC (Figure 2 and Table 6), two new groups of the compound were added, namely terpenoids and tannins were added to the secondary metabolite compounds of the McB1 endophytic fungi. In Widjajanti's research (2019), the group of compounds produced by McB1 endophytic fungi was phenolic and flavonoids, due to changes in the composition of the cultivation medium used. Abo-Elmag (2014) also stated that the nutrient source can induce or eliminate a metabolite compound produced by fungi.



The terpenoid group is formed due to differences in the composition of the carbon source. The formation of acetic acid in cellular processes is influenced by carbon metabolism. Hence, it was used as a substrate in primary metabolism to produce acetyl CoA as the main ingredient in the formation of terpenoid compounds during the biosynthesis of the mevalonic acid pathway (Figure 3). According to Agusta (2006), acetic acid was condensed to produce acetyl coenzyme A, after activation, which is the reaction step of terpenoid biosynthetic. The reaction of acetyl coenzyme A produced Isopentenyl pyrophosphate (IPP), which is isomerized into Dimethyl allyl pyrophosphate (DMAPP) by the isomerase enzyme. Moreover, IPP is an active isoprene unit that combined head-to-tail with DMAPP, which is the first step of isoprene polymerization to produce terpenoids.

Based on the chromatogram profile, blackish-brown spots formed were assumed to be tannin compounds, due to the use of L-phenylalanine in the composition of the medium optimization. Meanwhile, the use of L-phenylalanine as a precursor for the formation of tannins is presented in Figure 4. According to Hernawan and Setyawan (2003), the shikimic acid pathway is used in the synthesis of hydrolyzable tannin groups and compounds based on the amino acid phenylalanine. Since the amino acid phenylalanine is used in the formation of gallic acid, therefore, the tannins are formed through esterified gallic acid derivatives.

#### **4. Conclusion**

The optimization of the cultivation medium with composition  $4.5 \text{ gL}^{-1}$  sucrose,  $0.48 \text{ gL}^{-1}$  yeast extract, and pH 6.1 yielded 0.34 g secondary metabolites extract of McB1 endophytic fungi. The chromatogram profile of the optimized secondary metabolite extract showed the presence of flavonoids, phenols, terpenoids, and tannins.

#### **5. Acknowledgement**

The research/publication of this article was funded by DIPA of Public Service Agency of Universitas Sriwijaya 2021. SP DIPA-023.17.2.677515/2021, on November 23, 2020. In accordance with the Rector's Decree Number: 0010/UN9/SK.LP2M.PT/2021, on April 28, 2021.

#### **6. References**

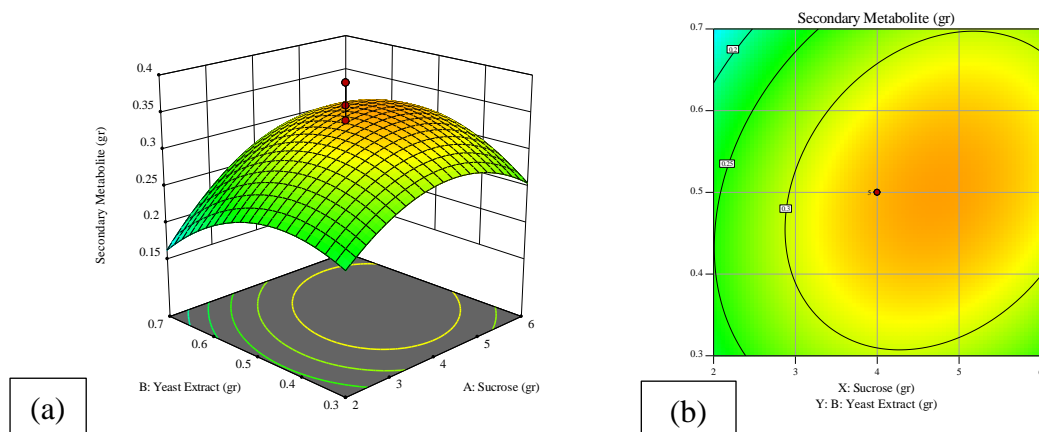
Abo-Elmag, H.I. 2014. Evaluation And Optimization Of Antioxidant Potentiality Of *Chaetomium madrasense* AUMC 9376. *Journal Genetic Engineer Biotechnol.* 12 (1) : 21-26.

- Agusta, A. 2006. Diversitas Jalur Biosintesis Senyawa Terpena Pada Makhluk Hidup Sebagai Target Obat Antitinfeksi. *Berita Biologi*. 8(2): 141-152.
- Arora, D. S., and Chandra, P. 2010. Assay of Antioxidant Potential of Two *Aspergillus* sp. Isolates By Different Methods Under Various Physio-Chemical Conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41(3) : 765-777.
- Arora, D.S., Chandra, P., and Kaur, G.J. 2012. Optimization And Assay Of Antioxidant Potential Of Two *Penicillin* By Different Procedures. *Current Biotechnology*. 1(1):2-10
- Arora, D. S., and Kaur, N. 2019. Antimicrobial potential of fungal endophytes from *Moringa oleifera*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 187(2), 628-648.
- Baş, D., and Boyacı, I. H. 2007. Modeling And Optimization I: Usability Of Response Surface Methodology. *Journal Of Food Engineering*. 78(3): 836-845.
- Bhardwaj A, Sharma D, Jodan N, and Agrawal PK. 2015. Antimicrobial and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from spikes of *Pinus roxburghii*. *Arch Clin Microbiol* 6(3):1–9
- Boonyapranai, K., Tungpradit, R., Lhieochaiphant, S., and Phutrakul, S. 2008. Optimization of submerged culture for the production of naphthoquinones pigment by *Fusarium verticillioides*. *Chiang Mai J. Sci.* 35(3): 457-466.
- Bose, P., Gowrie, S. U., and Chathurdevi, G. 2019. Optimization of Culture Conditions for Growth and Production of Bioactive Metabolites by Endophytic Fungus–*Aspergillus tamarii*. *International Journal of Pharmacy and Biological Science*. 9(2): 469-478
- Deka, D., and Jha, D. K. 2018. Optimization of culture parameters for improved production of bioactive metabolite by endophytic *Geosmithia pallida* (KU693285) isolated from *Brucea mollis* Wall ex. Kurz, an endangered medicinal plant. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 12(3): 1205-1213.
- Gazi, M.R., and Kanda. K. 2004. Optimization Of Cultural Conditions And Some Properties Of Radical scavenging Substances From *Sporobolomyces Salmonicolor*. *Journal Of Biological Sciences*. 7(8) :1365-1370.
- Goutam. J, V.K. Sharma, S.K. Verma, D.K. Singh, J.Kumar, A.Mishra, A. Kumar and R.N. Kharwar. 2014. Optimization of Culture Conditions for Enhanced Production of Bioactive Metabolites Rich in Antimicrobial and Antioxidant Activities Isolated from *Emericella quadrilineata* an Endophyte of *Pteris pellucida*. *Journal of pure and applied Microbiology*, 8(3):2059-2073.
- Harbone, J.B. 2006. *Metode Fitokimia*. Penerbit ITB, Bandung.
- Himalini, S., and Razia, M. 2018. Optimization Of Pigment Production In *Fusarium incarnatum*. *IJ RAR*. 5(4):450-460.
- Jeffrey, L.S.H., Son, R., Dan Tosiah, T. 2008. Preliminary Screening Of Endophytic Fungi Isolated From Medicinal Plant At MARDI Sessang, Sarawak For Their Bioactivity. *Journal Tropical Agric Dan Food Science*. 36(1):121-126
- Lee, H. S., Song, H. H., Ahn, J. H., Shin, C. G., Lee, G. P., and Lee, C. 2008. Statistical optimization of growth medium for the production of the entomopathogenic and phytotoxic cyclic depsipeptide beauvericin from *Fusarium oxysporum* KFCC 11363P. *Journal of microbiology and biotechnology*, 18(1): 138-144.
- Mao, X.B., Eksriwong, T., Chauvatcharin, S., and Zhong, J.J. 2005. Optimization Of Carbon Source And Carbon/Nitrogen Ratio For Cordycepin Production by Submerged Cultivation Of Medicinal Mushroom *Cordyceps Militaris*. *Process Biochemistry*. 40 (5): 1667–1672.
- Martin, J.F., Dan Demain, A.L. 1980. Control Of Antibiotic Biosynthesis. 1980. *Microbiol Rev*. 230-251

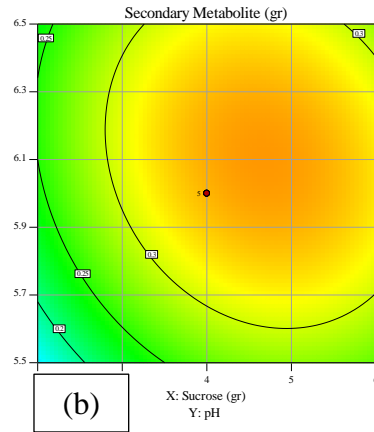
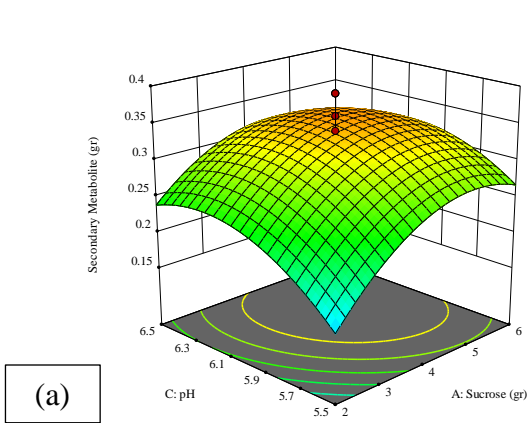
- Merlin, J. N., Christudas, I. V. S. N., Kumar, P. P., Dan Agastian, P. 2013. Optimization Of Growth And Bioactive Metabolite Production: *Fusarium Solani*. *Asian J Pharm Clin Res*. 6(3): 98-103.
- Moore, L.E, 1972. *Fundamentals Of The Fungi (Fouth Edition)*. London. Prentie Hall International Inc.
- Qiu, J.J., Chen, W., Ding, M., Zhang M.L., Dan Zhoa, F.K. 2012. Optimization Of Penilicilin G Acylase Production By Recombinat *Bacillus subtilis* Via Response Surface Analysis. *Journal Zhejiang Sci Tech Univ*. 29(9):1028-1037.
- Raissi, S., Dan Farzani, R. E. 2009. Statistical Process Optimization Through Multi Response Surface Methodology World Academy Of Science, Engineeering And Technology. *Int J Math, Coumputational, Physical, Electrical And Computer Engineering*. 3 : 197-201.
- Sanchez, S, A. Cha´vez, A.Forero, Y. G.Huante, A.Romero, M.Sa´nchez, D.Rocha, B.Sa´nchez, M. A´valos, S.G.Trampe1, R.R.Sanoja1, E.Langley and B.Ruiz. 2010. Carbon Source Regulation of Antibiotic Production. *Journal Antibiot*. 63(1): 442-459.
- Septiana, E., Dan Simanjuntak, P. 2017. Effect of Different Culture Condition On Antioxidant Secondary Metabolites from Endophytic Fungi Isolated From Turmeric Root. *Traditional Medicine Journal*). 22(1) : 31-36.
- Septiana, E., Sukarno, N., Dan Simanjuntak, P. 2017. Endophytic Fungi Associated With Turmeric (*Curcuma Longa L.*) can Inhibit Histamine-Forming Bacteria In Fish. *HAYATI Journal Of Biosciences*. 24(1) : 46-52.
- Septiana, E., dan Simanjuntak, P. 2017. Effect Of Different Culture Condition On Antioxidant Secondary Metabolites From Endophytic Fungi Isolated From Turmeric Root. *Majalah Obat Tradisional (Traditional Medicine Journal)*. 22(1) : 31-36.
- Tudzynski, B. 2014. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in microbiology*. 5 : 656.
- Wang, D.I.C., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunhill, P., Humprey, A.E, and Lily, M.M. 1979. *Fermentation and Enzym Technology*. London: Willey Interscience.
- Widjajanti, H, Salni, N.I. Nastiti, E.Nurnawati. 2019. Screening endophytic fungi of *Melaleuca cajuputi* Powell Leaves as an antibacterial sources. Proceeding of The 1<sup>st</sup> International MIPAnet Conference on Science and Mathematics (IMC-SciMath).
- Xu, L. J., Liu, Y. S., Zhou, L. G., and Wu, J. Y. 2009. Enhanced Beauvericin Production With In Situ Adsorption In Mycelial Liquid Culture of *Fusarium redolens* DZF2. *Process biochemistry*, 44(10), 1063-1067.

## 7. Figures

### Sucrose (A) and Yeast Extract (B)



**Sucrose (A) and pH (C)**



**Yeast Extract (B) and pH (C)**

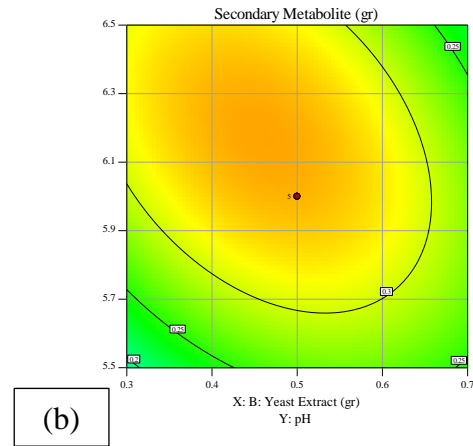
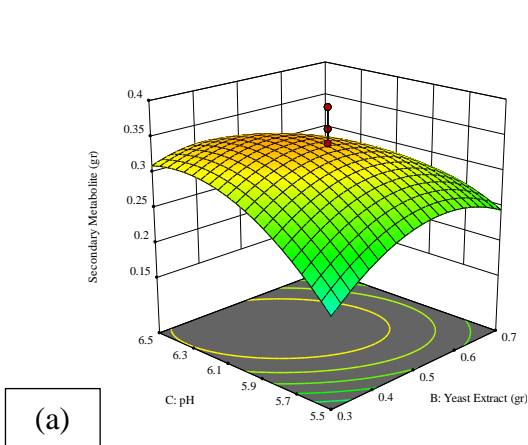


Figure 1. 3D-Surface Graphics for surface and contour responses the surface of McB<sub>1</sub> endophytic fungi extract. (a) 3D-Surface Graphics for Response Surface (b) Contour graph for response surface

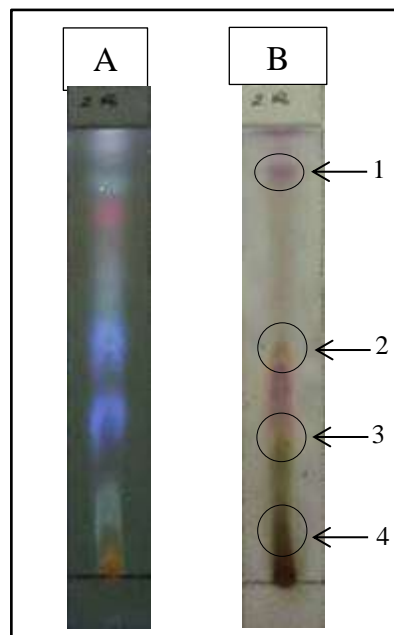


Figure 2. Results of TLC on Secondary Metabolite Extract of McB1 Endophytic Fungi  
 A: TLC of McB<sub>1</sub> endophytic fungi extracts at 366 nm UV light  
 B: Chromatogram of McB<sub>1</sub> endophytic fungi extract after spraying H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5%

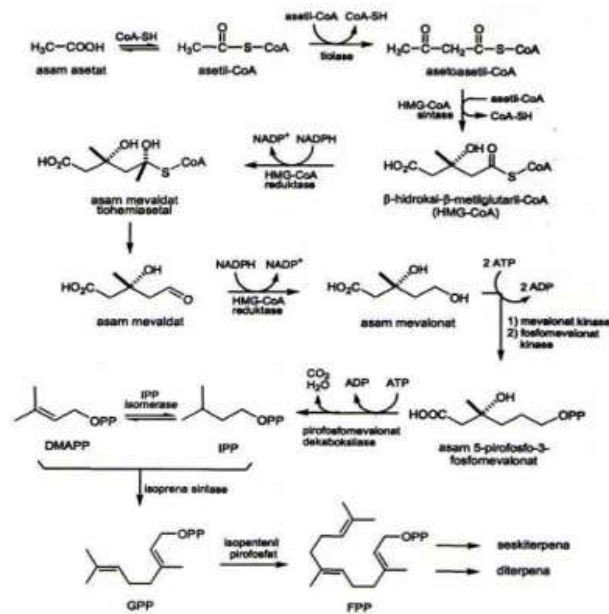


Figure 3. The mechanism for the biosynthesis of terpenoids through the mevalonic acid pathway (Harbert, 1995)

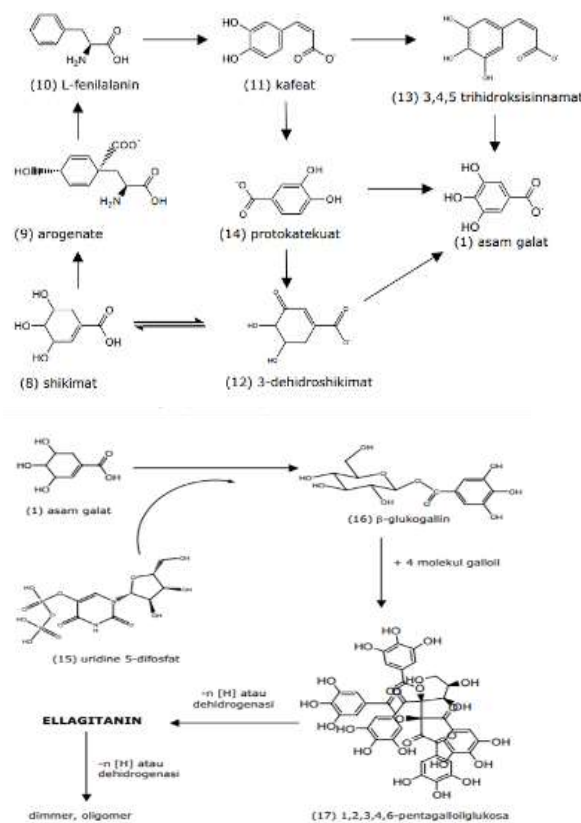


Figure 4. The mechanism of tannin biosynthesis through the shikimic acid pathway (Gross, 1992)

## 8. Tables

Table 1. Fungi biomass and extract weight from carbon source optimization

Carbon Source	Biomass (g)	Extract Weight (g)
Sucrose	2.21±0.12	0.25±0.03
Dextrose	2.45±0.07	0.16±0.01
Glucose	1.32±0.14	0.11±0.03

Table 2. Fungi biomass and extract weight from nitrogen source optimization

Nitrogen Source	Biomass (g)	Extract Weight (g)
Peptone	1.36±0.22	0.32±0.05
<i>Yeast Extract</i>	1.18±0.09	0.39±0.03
NaNO <sub>3</sub>	1.26±0.14	0.15±0.03

Table 3. Fungi biomass and extract weight from pH optimization

pH	Biomass (g)	Extract Weight (g)
5	1.20±0.14	0.40±0.02
6	1.20±0.63	0.56±0.01
7	2.27±0.18	0.28±0.11
8	1.65±0.21	0.21±0.02

Table 4. The composition of medium optimization for the McB<sub>1</sub> endophytic fungi and the range of factors tested

Optimization Factor	Range and Level				
	-1.68	-1	0	1	1.68
Sucrose (gL <sup>-1</sup> )	0.63	2	4	6	7.36
<i>Yeast Extract</i> (gL <sup>-1</sup> )	0.16	0.3	0.5	0.7	0.83
pH	5.1	5.5	6	6.5	6.8

Table 5. Weight of McB<sub>1</sub> endophytic fungi extract from cultivation medium optimization with 3 factors using RSM

Standard	Sucrose (X <sub>1</sub> , gL <sup>-1</sup> )	<i>Yeast Extract</i> (X <sub>2</sub> , gL <sup>-1</sup> )	pH (X <sub>3</sub> )	Extract Weight (Y, gram)
1	2	0.3	5.5	0.13
2	6	0.3	5.5	0.18
3	2	0.7	5.5	0.09
4	6	0.7	5.5	0.23
5	2	0.3	6.5	0.29
6	6	0.3	6.5	0.27
7	2	0.7	6.5	0.1
8	6	0.7	6.5	0.19
9	0.63	0.5	6	0.11
10	7.36	0.5	6	0.27

11	4	0.16	6	0.16
12	4	0.83	6	0.25
13	4	0.5	5.1	0.18
14	4	0.5	6.8	0.25
15	4	0.5	6	0.28
16	4	0.5	6	0.36
17	4	0.5	6	0.39
18	4	0.5	6	0.34
19	4	0.5	6	0.31

Table 6. Composition formula for medium optimization of McB<sub>1</sub> endophytic fungi

Isolate	Sucrose	<i>Yeast Extract</i>	pH	Secondary Metabolites	Desirability
Level	4.5 g L <sup>-1</sup>	0.48g L <sup>-1</sup>	6.1	0.34 g	0.853