

Bidang Penelitian : MIPA

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN UNGGULAN KOMPETIF
UNIVERSITAS SRIWIJAYA**

**POTENSI FUNGI ENDOFITIK DAUN TUMBUHAN GELAM
(*Melaleuca cajuputi* Powell) SEBAGAI SUMBER ANTIOKSIDAN
DAN OPTIMASI PRODUKSINYA**



Ketua Peneliti : DR.HARY WIDJAJANTI, M.Si / NIDN.0012126112
Anggota Peneliti : 1. DRA.MUHARNI, M.Si / NIDN. 0003066305
2. DR.ELISA NURNAWATI, M.Si / NIDN. 0027047502

Dibiayai oleh :
Anggaran DIPA Badan Layanan Umum
Universitas Sriwijaya Tahun Anggaran 2020
SP DIPA-023.17.2.677515/2020, Revisi ke 01 tanggal 16 Maret 2020
Sesuai dengan SK Rektor
Nomor : 0685/UN9/SK.BUK.KP/2020
Tanggal 15 Juli 2020


PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MIPA UNIVERSITAS SRIWIJAYA
TAHUN ANGGARAN 2020

**LEMBAR PENGESAHAN
SKEMA UNGGULAN KOMPETITIF**

- | | |
|---|--|
| 1. Judul Penelitian | : Potensi fungsi endofitik daun tumbuhan gelam
(<i>Melaleuca cajuputi</i> Powell) sebagai sumber senyawa
antioksidan dan optimasi produksinya |
| 2. Bidang Penelitian | : MIPA |
| 3. Ketua Peneliti | : Dr.Hary Widjajanti, M.Si |
| a. Nama Lengkap | : Perempuan |
| b. Jenis Kelamin | : 19611212 198710 2 001 / 0012126112 |
| c. NIP/NIDN | : Pembina/ IV-a |
| d. Pangkat dan Golongan | : S3 |
| e. Pendidikan terakhir | : - |
| f. Jabatan Struktural | : Lektor Kepala |
| g. Jabatan Fungsional | : Universitas Sriwijaya |
| h. Perguruan Tinggi | : MIPA/Biologi |
| i. Fakultas/Jurusan/Prodi | : Jalan Raya Palembang-Prabumulih km 32 Indralaya
Ogan Ilir |
| j. Alamat/Kantor | : 0711-580306/0711580056 |
| k. Telepon/Faks | : Komplek Pusri Sukamaju Jl.Brantas No.N-7 Palembang |
| l. Alamat Rumah | : (0711)811619/ 0852 7365 1116 / haryunsri@yahoo.com |
| m. Telpon/HP/Faks/E-mail | : 2 Orang |
| 4. Jumlah Anggota Peneliti | : Dra.Muharni, M.Si |
| a. Nama Anggota I | : 19630603 199203 2 001 |
| NIP | : Dr.Elisa Nurnawati, M.Si |
| b. Nama Anggota II | : 19750427 200012 2 001 |
| NIP | : 1 tahun |
| 5. Jangka Waktu Penelitian | : Rp. 50.000.000,- |
| 6. Jumlah Dana yang disetujui | : 1. Wahyuli Darma Pertiwi/08041181520009/Biologi |
| 7. Nama, NIM dan Jurusan
Mahasiswa yang terlibat | : 2. Eca Desriana Zahwa/08041181722044/Biologi |



Indralaya, 8 Desember 2020
Ketua Peneliti


Dr. Hary Widjajanti, M.Si
NIP. 196112121987102001

Menyetujui :
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat
Universitas Sriwijaya,

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

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
DAFTAR ISI	iii
RINGKASAN.....	iv
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB III. METODE PENELITIAN.....	13
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN... ..	20
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	

RINGKASAN

Fungi endofitik adalah fungi (jamur) 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. Kendala yang dihadapi dalam memperoleh senyawa bioaktif dari tumbuhan obat adalah sedikitnya ekstrak murni yang diperoleh ketika mengisolasi senyawa bioaktif dari tumbuhan. Kendala tersebut menjadikan sangat sulit jika akan dilakukan pengembangan senyawa bioaktif dari tumbuhan obat yang bersifat langka dan endemik, hal ini dikarenakan jika tumbuhan langka dilakukan eksplorasi untuk diambil senyawa bioaktifnya, maka kelestarian tumbuhan tersebut menjadi terancam. Dalam pengembangan obat berbasis tumbuhan obat harus dipertimbangkan aspek kelestarian tumbuhan obat yang akan dikembangkan. Salah satu teknologi yang bisa dilakukan adalah dengan mengisolasi fungi endofitik dari bagian tumbuhan obat yang sering digunakan sebagai obat secara tradisional dan dilakukan seleksi senyawa metabolit sekunder yang bersifat bioaktif seperti bersifat antibakteri dan antioksidan dari kultur fungi endofitik tersebut, dengan demikian pengembangan senyawa obat berbasis tumbuhan obat dapat dilakukan dan kelestarian tumbuhan obat dapat dipertahankan.

Tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) merupakan salah satu tumbuhan yang berasal dari marga Myrtaceae. Tumbuhan ini dapat hidup di daratan yang memiliki batasan nutrisi dari tanah yang subur dan kaya akan unsur-unsur hara. Tumbuhan ini juga mampu hidup di tanah dengan kondisi kritis dengan sedikit unsur-unsur hara. Daun dari gelam di Indonesia banyak dimanfaatkan sebagai bahan mentah dalam pembuatan minyak kayu putih. *Melaleuca cajuputi* Powell memiliki potensi sebagai antibakteri, antioksidan, bahkan berpotensi juga sebagai antiparasit. *Melaleuca cajuputi* telah digunakan secara tradisional untuk pengobatan penyakit seperti batuk, keram perut, luka bakar, dan influenza. Tumbuhan ini juga menunjukkan aktifitas anti-inflamatori, antidengue, antikanker dan antikonvulsan. Daun *M. cajuputi* juga mengandung flavonoid yang tinggi, flavonoid merupakan senyawa kimia yang bersifat antibakteri.

Penelitian ini dilakukan sebagai upaya untuk memperoleh fungi endofitik dari tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) yang mampu menghasilkan metabolit sekunder sebagai bahan bioaktif sebagai sumber antioksidan untuk pengembangan obat asal tumbuhan dan menjaga kelestarian tumbuhan tersebut. Dalam upaya pengembangan obat berbasis tumbuhan obat dan sekaligus tetap menjaga kelestarian tumbuhan obat maka penelitian ini perlu dilakukan.

Tujuan penelitian adalah : 1) Mendapatkan isolat fungi endofitik daun tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) yang mampu memproduksi metabolit sekunder yang bersifat antioksidan, 2) Melakukan uji invitro untuk memverifikasi potensi antioksidan metabolit sekunder fungi endofitik daun tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell), 3) Mengidentifikasi secara fenotipik dan secara molekuler isolat fungi endofitik dari daun tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) yang berpotensi tinggi dalam menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat antioksidan, 4) Melakukan optimasi produksi antioksidan oleh fungi endofitik tumbuhan gelam dengan variasi parameter fisiokimia dan nutrisi.

Prosedur penelitian yang dilakukan meliputi : isolasi dan pemurnian fungi endofitik, kultivasi fungi endofitik, ekstraksi metabolit sekunder, uji aktivitas antioksidan, optimasi produksi dan aktivitas antioksidan untuk parameter fisiokimia dan nutrisi, karakterisasi dan identifikasi secara fenotipik dan molekuler fungi endofitik yang berpotensi tinggi dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang bersifat antioksidan.

Luaran yang ditargetkan adalah : 1) Artikel ilmiah pada jurnal internasional bereputasi, 2). Artikel ilmiah pada jurnal terakreditasi nasional.

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

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan sementara sebagai berikut: 1. Fungi endofit yang diperoleh dari tumbuhan Gelam sebanyak 7 isolat fungi, yaitu isolate McAO1, McAO2, McAO3, McAO4, McAO5, McAO6, DAN McAO7, 2.Ekstrak metabolit sekunder isolat fungi endofit yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat yakni ekstrak isolat McAO4, McAO6, McAO7 dengan nilai IC_{50} berturut-turut 8,12 $\mu\text{g/mL}$, 20,41 $\mu\text{g/mL}$ dan 30,19 $\mu\text{g/mL}$. 3.Ekstrak metabolit sekunder isolat fungi endofit McAO4, McAO6, dan McAO7 mengandung senyawa fenol dan flavonoid. 4.Isolat McAO4 memiliki homologi sebesar 98,81% dengan *Pestalotiopsis hawaiiensis* CBS 114491, isolat McAO6 memiliki homologi sebesar 99,83% dengan *Aspergillus pseudonomius* strain NRRL 3353, isolat McAO7 memiliki homologi dengan *Lichtheimia ramosa* CBS 582.65 dengan nilai homologi sebesar 92,48%. 5. Hasil optimasi pH menunjukkan pH 5 yang memberikan hasil berat ekstrak tertinggi (0,49 gram), dan sumber nitrogen berupa pepton juga memberikan hasil berat ekstrak tertinggi (0,35 gram).

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

BAB I. PENDAHULUAN

Latar belakang

Sejumlah tumbuhan sudah secara turun temurun dari generasi ke generasi digunakan sebagai obat oleh hampir setiap masyarakat termasuk di Indonesia. Tumbuhan yang digunakan sebagai tumbuhan obat, sekarang sudah mulai digali secara ilmiah dengan menganalisis kandungan bahan aktif yang menyebabkan berkasiat obat. Namun secara umum, bahan aktif yang terkandung di dalam tumbuhan tersebut terlalu sedikit atau minor, oleh karena itu jika akan dikembangkan dalam skala besar mengalami kendala dari bahan baku tumbuhan tersebut yaitu harus dalam jumlah yang besar.

Penelitian yang dilakukan oleh Munawar dan Elfita [1] menunjukkan bahwa senyawa antibakteri berupa ekstrak kasar yang dihasilkan dari kulit akar tumbuhan Medang Seluang (*Litsea spatulata*) yang diekstraksi menggunakan n-heksan hanya 2,22% (b/b), jika senyawa tersebut dimurnikan maka jumlahnya akan lebih sedikit lagi. Kendala tersebut menjadikan sangat sulit jika akan dilakukan pengembangan senyawa bioaktif dari tumbuhan obat yang bersifat langka dan endemik. Hal ini dikarenakan jika tumbuhan langka dilakukan eksplorasi untuk diambil senyawa bioaktifnya, maka kelestarian tumbuhan tersebut menjadi terancam. Kendala tersebut dapat diantisipasi dengan mengisolasi mikroba terutama fungi (jamur) endofitik yang bersimbiosis dengan tumbuhan tersebut. Teknik yang dilakukan hanya mengambil sedikit bagian tumbuhan yang biasa digunakan dalam pengobatan secara tradisional, selanjutnya dilakukan isolasi jamur endofitik dari bagian tumbuhan tersebut, dengan demikian tumbuhan obat yang langka akan tetap lestari dan pengembangan senyawa obat dari tumbuhan tersebut melalui jamur endofitiknya dapat dikembangkan.

Berdasarkan alasan tersebut di atas, maka dalam pengembangan obat berbasis tumbuhan obat harus dipertimbangkan aspek kelestarian tumbuhan obat yang akan dikembangkan. Salah satu teknologi yang bisa dilakukan adalah dengan mengisolasi fungi endofitik dari bagian tumbuhan obat yang sering digunakan sebagai obat secara tradisional dan dilakukan seleksi senyawa metabolit sekunder yang bersifat bioaktif seperti bersifat antibakteri dan antioksidan dari kultur fungi endofitik tersebut, dengan demikian pengembangan senyawa obat berbasis tumbuhan obat dapat dilakukan dan kelestarian tumbuhan obat terutama yang sudah langka dapat dipertahankan.

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 mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inang ke mikroba endofit [2,3].

Kemampuan fungi endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya tersebut. Dari sekitar 300.000 jenis tanaman yang tersebar di muka bumi ini, masing-masing tanaman mengandung satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri dan fungi [3]. Apabila endofit yang diisolasi dari suatu tanaman obat dapat menghasilkan alkaloid atau metabolit sekunder sama dengan tanaman aslinya atau bahkan dalam jumlah yang lebih tinggi, maka kita tidak perlu menebang tanaman aslinya untuk diambil sebagai simplisia, yang kemungkinan besar memerlukan puluhan tahun untuk dapat dipanen [4]. Menurut Stierlie *et al.* [5], pemanfaatan mikroba endofitik dalam memproduksi senyawa aktif memiliki beberapa kelebihan, antara lain (1) lebih cepat menghasilkan dengan mutu yang seragam, (2) dapat diproduksi dalam skala besar, dan (3) kemungkinan diperoleh komponen bioaktif baru dengan memberikan kondisi yang berbeda.

Gelam merupakan salah satu tumbuhan yang berasal dari marga Myrtaceae. Tumbuhan ini dapat hidup di daratan yang memiliki batasan nutrien dari tanah yang subur dan kaya akan unsur-unsur hara. Tumbuhan ini juga mampu hidup di tanah dengan kondisi kritis dengan sedikit unsur-unsur hara. Daun dari gelam di Indonesia banyak dimanfaatkan sebagai bahan mentah dalam pembuatan minyak kayu putih [6]. Daun gelam memiliki banyak manfaat, salah satunya dapat digunakan sebagai sumber antibakteri [7].

Melaleuca cajuputi memiliki potensi sebagai antibakteri, antioksidan, bahkan berpotensi juga sebagai antiparasit [8]. *Melaleuca cajuputi* telah digunakan secara tradisional untuk pengobatan penyakit seperti batuk, keram perut, luka bakar, dan influenza. Tumbuhan ini juga menunjukkan aktifitas anti-inflamatori, antidengue, antikanker dan antikonvulsan [8]. Kandungan bahan aktif dari *Melaleuca cajuputi* pada daunnya terdapat beberapa senyawa antara lain trans caryophyllena, β -selinena, germacrena ($C_{15}H_{26}O$), neopitadiena, sikloheksakarboksaldehida, β -caryophyllena, 3-metoksi asam benzoat trimetilsilan; limonena; 1,4 naftaquinon-5,8-dihidroksi-2-metoksi; 3 carena; α -caryophyllena; sineol; patchulin; etil

benzena; benzena 1-me til-3 (metiletil), dan 1,3% minyak atsiri [10]. Minyak atsiri termasuk salah satu senyawa yang terdapat di tumbuhan yang mempunyai aktivitas antibakteri [11]. Daun *M. cajuputi* juga mengandung flavonoid yang yang tinggi, flavonoid merupakan senyawa kimia yang bersifat antibakteri [7].

Peningkatan radikal bebas penyebab berbagai penyakit degeneratif tidak dapat dihindari, namun radikal bebas yang masuk kedalam tubuh dapat kurangi dengan melakukan langkah pencegahan. Antioksidan dibutuhkan untuk menangkal dan melindungi tubuh dari radikal bebas [12]. Antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkap atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan bisa dihambat [13]. Aktivitas antoksidan suatu senyawa dapat diukur dari kemampuannya meredam radikal bebas [14, 15]. Radikal bebas yang biasa dipakai sebagai model dalam mengukur peredaman antioksidan adalah DPPH (2,2- -diphenyl-1-picrylhydrazyl) karena cepat, sederhana dan mudah digunakan [16].

Jamur endofitik dari tanaman obat potensial sebagai sumber senyawa bioaktif dan senyawa kimia. Metabolit bioaktif yang diproduksi oleh jamur endofitik berasal dari jalur biosintesis yang berbeda dan termasuk kelompok struktural yang beragam seperti terpenoid, steroid, kuinon, fenol, coumarin dan lain-lain. Oleh karena itu fungi endofitik sebagai penghasil senyawa baru seperti, antikanker, imunomodulator, antioksidan, antiparasit, antiviral, antituberkulosis, insektisida dll untuk digunakan dalam farmasi dan industri agrokimia [17]. Asam antioksidan alami cajaninstilbene (46) (C₁₂H₂₂O₄) (CSA), 3-hidroksi-4-prenil-5-metoksibilbena-Asam 2 karboksilat telah dilaporkan dari *Fusarium* endofit dari kacang merpati, *Cajanus cajan* [18]. Begitu pula dengan antioksidan yang kuat aktivitas tersebut ditunjukkan oleh *Xylaria* sp.yang diisolasi dari *Ginkgo Biloba*. Kegiatan ini disebabkan oleh adanya fenolat dan flavonoid [19]. *Chaetomium* sp. dari *Nerium oleander* bisa menjadi sumber antioksidan potensial sebagai flavonoid dan asam fenolik turunan dari jamur ini menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat [20].

Optimasi produksi dan aktivitas antioksidan dari fungi endofitik perlu dilakukan untuk memperoleh hasil yang lebih banyak dengan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Optimasi dapat dilakukan dengan optimasi parameter fisiokimia dan nutrisi. Optimasi parameter fisiokimia dapat dilakukan dengan membuat variasi suhu dan pH yang berbeda. Optimasi nutrisi dengan membuat variasi nutrisi yang berupa sumber karbon (C) dan sumber nitrogen.

Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan isolat fungi endofitik asal tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) yang mampu memproduksi metabolit sekunder yang bersifat antioksidan.
2. Melakukan uji invitro untuk memverifikasi sifat antioksidan metabolit sekunder fungi endofitik tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell)
3. Mengidentifikasi secara fenotipik dan secara molekuler isolat fungi endofitik dari tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) yang berpotensi tinggi dalam menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat antioksidan
4. Melakukan optimasi produksi antioksidan oleh fungi endofitik tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) dengan variasi parameter fisiokimia dan nutrisi

Manfaat Penelitian

Dengan diperolehnya fungi endofit tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) yang berpotensi tinggi dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang bersifat antioksidan akan dapat juga digunakan sebagai upaya pelestarian tumbuhan obat yang sulit diperoleh di alam, karena dalam upaya memperoleh bahan baku obat herbal dapat memanfaatkan fungi endofitiknya sehingga tidak perlu lagi mengambil tumbuhannya.

TINGKAT KESIAPTERAPAN TEKNOLOGI (TKT) PENELITIAN

Fokus Riset :

30 : Riset Kesehatan –Obat

Tema Riset :

3030 : Teknologi Kemandirian Bahan baku Obat

Jenis topik :

303010 : Pengembangan fitofarmaka berbasis sumberdaya local

TKT :

3 : Pembuktian konsep fungsi dan/atau karakteristik penting secara analitis dan eksperimental

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

Fungi endofitik

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 [21]. 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 [22]. 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 [2].

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 [3]. Fungi endofit menghasilkan berbagai senyawa yang memiliki aktivitas biologi, diantaranya alkaloid, terpenoid, fenolik, dan sebagainya [2]. 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 [23].

Tumbuhan Gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell).

1. Tumbuhan Gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell)

1.1. Deskripsi Tumbuhan Gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell).

Gelam merupakan salah satu tumbuhan yang berasal dari marga Myrtacea. Tumbuhan ini dapat hidup di daratan yang memiliki batasan nutrien dari tanah yang subur dan kaya akan unsur-unsur hara. Tumbuhan ini juga mampu hidup di tanah dengan kondisi kritis dengan sedikit unsur-unsur hara. Gelam dikenal sebagai spesies yang toleran terhadap kondisi ekstrim, ada potensi dari tumbuhan ini digunakan sebagai tumbuhan rehabilitasi lahan gambut yang rusak. Daun dari gelam di Indonesia banyak dimanfaatkan sebagai bahan mentah dalam pembuatan minyak kayu putih [6].

Gelam atau *Melaleuca cajuputi* tersebar dari Australia sampai Asia Tenggara dan berkembang di hutan rawa tropis. Penyebaran biji dari *M. cajuputi* terjadi akibat kebakaran lahan selama musim kemarau, biji kemudian mengalami perkecambahan pada kondisi lembab dengan adanya peningkatan curah hujan, biji dapat bertahan selama tiga bulan atau lebih selama musim hujan. Gelam termasuk salah satu tanaman amfibi, karena habitat gelam berada di rawa gambut dengan kenaikan air yang selalu mengalami fluktuasi. Biji dari *M. cajuputi* melakukan fotosintesis di bawah air. Karakteristik morfologi dan anatomi dari daun dan batang *M. cajuputi* lebih cocok untuk fotosintesis di bawah tanah, sehingga *M. cajuputi* mampu tumbuh di daerah yang terendam air [24].

Gelam biasanya digunakan untuk mengobati penyakit kolera, nyeri otot dan sendi dalam pengobatan tradisonal. Gelam dilaporkan memiliki kemampuan sebagai anti-inflamasi, antikanker, hepatoprotektif, dan aktivitas antelmintik. Tumbuhan ini memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri spesies Gram positif (*B. cereus*, *S. epididimis*, *S. aureus* dan *S. pneumoniae*) dan spesies bakteri Gram negatif (*E. coli*, *P. multocida*, *K. pneumoniae* dan *S. typhimurium*). Bagian tumbuhan ini yang memiliki potensi sebagai antibakteri adalah bunga dan daunnya. Aktivitas antibakteri pada gelam dikarenakan kandungan senyawa fenolik dan flavonoid pada daun dan bunganya [7].

Tumbuhan dari genus *Melaleuca* dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang bersifat antibakteri, antifungi, antikanker, antiinflamasi, antioksidan dan lainnya [25]. Salah satu tumbuhan yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif adalah tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell). Tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) memiliki senyawa bioktif berupa senyawa terpen yaitu 1,8-Sineol, α -Terpineol, α -Pinen, Limonen, Globulol, dan Guaiol yang berpotensi sebagai antioksidan [26].

Melaleuca cajuputi Powell termasuk tumbuhan pohon tahunan yang memiliki tinggi hingga 40 m dengan pohon dewasa memiliki batang yang berdiameter 1,2 m. *M. cajuputi* dapat tumbuh dengan cepat dibandingkan dengan jenis *Melaleuca* lainnya. *M. cajuputi* tumbuh dan menyebar dengan cepat karena kemampuan toleransinya terhadap kondisi basah dan asam, serta tumbuhan ini mampu beradaptasi dengan kondisi yang tidak menguntungkan lebih baik daripada spesies lainnya [27].

1.2. Klasifikasi Gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell)

Klasifikasi *Melaleuca cajuputi* menurut *United States Department of Agriculture* (2018) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Myrtales
Famili	: Myrtaceae
Genus	: <i>Melaleuca</i>
Spesies	: <i>Melaleuca cajuputi</i> Powell

Metabolit Sekunder Fungi Endofit

Dalam hidupnya, makhluk hidup akan melakukan suatu proses biosintesis dimana akan dihasilkan suatu senyawa yang disebut dengan metabolit. Berdasarkan fungsinya senyawa metabolit dibedakan menjadi metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer merupakan suatu senyawa esensial yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidup, yaitu tumbuh dan berkembang. Contoh dari senyawa metabolit primer adalah asam amino, nukleotida, protein, asam nukleat, lemak, dan karbohidrat. Berbeda dari metabolit primer, metabolit sekunder merupakan senyawa yang dihasilkan oleh makhluk hidup sebagai kebutuhan pelengkap yang berfungsi untuk pertahanan dalam berinteraksi dengan ekosistemnya. Dengan kata lain, metabolit sekunder bukan dibutuhkan untuk tumbuh maupun berkembang melainkan untuk pertahanan diri dalam berinteraksi dengan ekosistem. Beberapa senyawa metabolit sekunder, yaitu antibiotik, pigmen, vitamin, dan steroid [28].

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 [22, 28, 29].

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 [3].

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 [4].

Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang bertindak sebagai reduktan atau memberikan donor elektron (*electron donor*). Senyawa antioksidan memiliki berat molekul kecil. mampu menghambat kerusakan pada sel dengan cara mencegah terbentuknya radikal dan menginaktivasi radikal bebas agar tidak berkembang, serta berperan dalam menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Status antioksidan bila berkaitan dengan reaksi oksidasi di dalam tubuh, merupakan parameter akan kesehatan seseorang. Jumlah antioksidan yang terdapat dalam tubuh harus memadai. Radikal bebas dalam keadaan patologik akan terbentuk dalam jumlah berlebihan, dan menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas enzim-enzim yang berperan sebagai antioksidan endogen. Dalam keadaan seperti ini tubuh membutuhkan antioksidan eksogen atau antioksidan yang berasal dari luar tubuh dalam jumlah yang banyak, untuk dapat menetralkan atau mengurangi efek yang disebabkan radikal bebas. Reaksi-reaksi yang terjadi oleh radikal bebas alam maupun hasil metabolisme tubuh dengan protein mampu dicegah antioksidan, sehingga perubahan yang terjadi didalam DNA atau pembelahan sel akibat reaksi oksidan tidak terjadi. Hal inilah yang membuat antioksidan erat hubungannya sebagai obat kanker [39].

Fungi Endofit penghasil senyawa antioksidan

Menurut Yadav *et al.*, [40] senyawa alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, dan terpen adalah senyawa kimia yang dijumpai pada 21 isolat fungi endofit yang diisolasi dari *Eugenia jambolana* Lam. Korelasi positif yang signifikan dijumpai antara aktivitas antioksidan dan jumlah total fungi. Ada 36% ekstrak endofit yang memiliki kandungan fenol tinggi yang menunjukkan aktivitas antioksidan kuat. Strain *Chaetomium* sp., *Aspergillus* sp., *Aspergillus peyronelii* dan *Aspergillus niger* menunjukkan aktivitas antioksidan paling tinggi yang berkisar antara 50% sampai 80% yang memiliki total fenol 58 mg/g sampai 60 mg/g GAE. Asam askorbat digunakan sebagai standar menunjukkan potensial reduksi sebesar 90%.

Fungi endofit *Chaetomium* sp yang berasal dari bunga jepun (*Nerrium oleander*) mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Berdasarkan analisis kualitatif yang dilakukan, fungi ini menghasilkan senyawa bioaktif berupa *phenolic* (asam fenolat dan derivat fenol). Selain itu metabolit sekunder fungi jenis *Aspergillus niger* dan *Alternaria alternata* dari tumbuhan *Tabebuia argentea*, menghasilkan senyawa lapachol alami yaitu, naphthoquinone yang telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan [28].

Ekstrak fungi endofit *Aspergillus* sp tumbuhan *Trigonella foenum-graecum* menunjukkan kandungan total fenol dalam bentuk ekuivalen dengan *gallic acid* ($89,9 \pm 7,1$) mg GAE/g dan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH yang paling tinggi dengan nilai IC₅₀ sebesar $18,0 \pm 0,1$ µg/mL [41]. Ekstrak fungi endofit yang diisolasi dari *Calotropis procera* yaitu *Penicillium* dan *Aspergillus* menunjukkan aktivitas sebagai antioksidan yang ditunjukkan dengan kandungan total flavonoid berturut-turut sebesar 130,50 µg/mg dan 94,91 µg/mg dan kandungan fenol berturut-turut sebesar 9,16 µg/mg dan 12,13 µg/mg [42].

Penelitian yang dilakukan Elfita *et al.* [43], fungi endofit *Acremonium* sp yang diisolasi dari tumbuhan kandis gajah (*Garcinia griffithii*) mampu menghasilkan senyawa golongan seskuiterpen yaitu 3,5-dihidroksi-2,5-dimetiltrideka-2,9,11-triena-4,8-dion. Senyawa ini memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang kuat dengan nilai IC₅₀ 10,3 µg/ml etara dengan dengan nilai IC₅₀ asam askorbat, yaitu 9,8 µg/ml. Menurut Strobel and Daisy [3] fungi endofit *Pestalotiopsis microspora* yang diisolasi dari tumbuhan *Terminalia morobensis*, di Papua New Guinea menghasilkan senyawa antioksidan. Fungi tersebut menghasilkan metabolit sekunder pestacin dan isopestacin yang dapat berkhasiat sebagai antioksidan karena diduga strukturnya menyerupai flavonoid.

Penelitian Widjajanti dkk [32] dari tumbuhan pelawan (*Tristaniopsis merguensis* Griff) berhasil diisolasi fungi yang mampu menghasilkan senyawa antioksidan yaitu *Aspergillus wentii* Wehmer, *Phialophora fastigiata*, dan *Cladosporium* sp. dengan nilai IC₅₀

berturut-turut sebesar 151, 164, dan 74. Dari tumbuhan tunjuk langit (*Helminthostachys zeylanica* (L.)Hook) berhasil diisolasi fungi endofitik yang menghasilkan senyawa antioksidan yaitu *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus japonicus*, dan *Aspergillus carbonarius* dengan nilai IC₅₀ berturut-turut sebesar 150 µg/mL, 133 µg/mL, dan 138 µg/mL. Penelitian Widjajanti dkk [44] dari tumbuhan kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) berhasil diisolasi fungi yang mampu menghasilkan senyawa antioksidan yaitu *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* sp1, dan *Penicillium* sp2 dengan nilai IC₅₀ berturut-turut sebesar 116 µg/mL , 143 µg/mL, dan 154 µg/mL.

STATE OF THE ART

No	Judul jurnal dan peneliti	Jurnal/ Prosiding	Hasil penelitian
1.	Diversity of endophytic fungi in cajuput leaf waste (<i>Melaleuca cajuputi</i>) Ana Widiana, Ukit , Afifah Thahirah, Epa Paujiah	BIODIVERSITAS (2019) : 20(2) : 562-569	Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari serasah daun gelam diperoleh total 14 spesies jamur dari empat genera yaitu <i>Aspergillus</i> , <i>Arthrimum</i> , <i>Rhizopus</i> , dan satu genus yang tidak dikenal. Tiga spesies jamur terisolasi juga diuji aktivitas enzim selulasenya, <i>Arthrimum phaeospermum</i> K11 menunjukkan aktivitas selulase tertinggi 9,39 U / mL
2.	Effect Of Tsunami On Endophytic Fungi In Leaf Of <i>Melaleuca cajuputi</i> Powell and <i>Syzygium gratum</i> (Wight) S.N. Mitra At Lampee-Had Tai Muang National Park, Pang-Nga Chanon Kowasupat, Chanpen Chanchao, and Jedsada Denduangboripant	Proceeding of 2 nd Biochemistry and Molecular Biology Conference on Biochemistry and Molecular Biology for Sustainable Development May 7-8, 2009 Faculty of Science, Khon Kaen University Khon Kaen, Thailand	Hasil penelitian menunjukkan T1 adalah <i>Daldinia eschscholzii</i> , T2 adalah <i>Entonaema cinnabarinum</i> , T3 adalah <i>Rosellinia necatrix</i> , dan T4 adalah <i>Cladosporium cladosporioides</i> . Secara keseluruhan, dapat disimpulkan bahwa 3 ini isolat jamur endofit mungkin membuat <i>M. cajuputi</i> selamat dari impaksi Tsunami
3.	Antimicrobial Substances Produced by Endophytic Fungi from <i>Melaleuca cajuputi</i> leaves and twigs Tinnakorn Rosruen	A Thesis Degree of Master of Science Program in Biotechnology Faculty of Science Chulalongkorn University, 2009	Hasil penelitian menunjukkan bahwa 6-benzyl-3-isopropyl-1-methylpiperazine-2,5-dione menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Nilai MIC 1,96, 62,5, 31,32 Ug / mL, dan ergosterol menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 dan <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 dengan nilai MIC keduanya 250 Ug / mL.
**	Penelitian yang akan dilakukan : Potensi fungi endofit daun gelam (<i>Melaleuca cajuputi</i> Powell) sebagai sumber senyawa antioksidan Optimasi produksi metabolit sekunder fungi endofit daun gelam (<i>Melaleuca cajuputi</i> Powell)		Potensi antioksidan dilakukan menggunakan metoda DPPH. Optimasi akan dilakukan dengan variasi parameter fisiokimia dan nutrisi

Peta jalan penelitian



Gambar 1. Peta Jalan (*roadmap*) Penelitian

BAB III. METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian akan dilaksanakan dari bulan Januari 2020 sampai Nopember 2020. Pengambilan sampel tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) di desa Tanjung Senai, Kecamatan Inderalaya, Kabupaten Ogan Ilir, Sumatera Selatan. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Genetika & Bioteknologi Jurusan Biologi Universitas Sriwijaya Inderalaya. Sekuensing DNA fungi endofitik dilakukan di 1st BASE Malaysia.

Cara kerja :

Pembuatan media dan sterilisasi alat dan bahan

Media yang dibuat meliputi *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Nutrient Agar* (NA), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), *Saboroud Dextrose Agar* (SDA), dan medium *Potato Dextrose Yeast* (PDY). Medium yang telah ditimbang sesuai dengan ketentuan masing-masing medium dilarutkan dalam 1L akuades dan dipanaskan di atas *hot plate* yang dilengkapi *magnetic stirrer* dan ditunggu hingga mendidih. Setelah mendidih dimasukkan ke dalam tabung reaksi \pm 10 ml. Semua media yang telah dibuat beserta semua bahan dan alat-alat yang akan digunakan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 lb selama 15 menit [45].

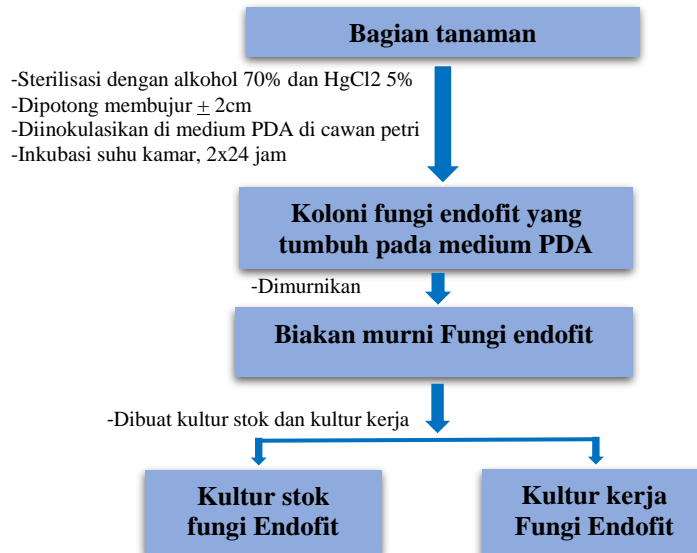
Sterilisasi sampel

Sampel berupa daun tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) dicuci dengan air mengalir sampai bersih \pm 5 menit. Kemudian dilakukan sterilisasi permukaan dengan cara masing-masing sampel diolesi alkohol 70 % selama \pm 3 menit dengan menggunakan kapas, dibilas dengan akuades steril \pm 1 menit, selanjutnya diolesi kembali dengan HgCl₂ (merkuri klorida) 5% (b/v) secukupnya. Setelah 1 menit, dibilas kembali dengan akuades steril selama \pm 1 menit.

Isolasi dan pemurnian fungi endofitik

Daun yang telah steril dipotong membujur secara aseptik, kemudian diletakkan di medium PDA yang telah memadat di cawan petri. Diinkubasi pada suhu kamar dan dilakukan pengamatan setiap hari sampai tampak fungi yang tumbuh. Koloni fungi yang tumbuh pada medium PDA yang menunjukkan sifat morfologi berbeda (bentuk, warna dan ukuran koloni) selanjutnya dimurnikan. Pemurnian dilakukan dengan memindahkan koloni ke medium PDA

yang baru dan diinkubasi pada suhu kamar selama 2 x 24 jam. Koloni jamur yang terpisah telah murni lalu dibuat kultur kerja dan stok dengan cara menumbuhkan pada medium PDA miring. Skema isolasi dan pemurnian jamur endofitik dari tumbuhan inang disajikan pada Gambar 3



Gambar 2. Isolasi dan pemurnian fungi endofitik dari tumbuhan inang

Kultivasi dan ekstraksi metabolit sekunder

Isolat fungi endofit yang diperoleh diinokulasikan sebanyak 10 agar plug ke dalam botol kultivasi ukuran 1 liter yang berisikan 500 mL medium *Potato dextrose Broth* (PDB), diinkubasi pada suhu ruang (27 °C) selama ± 2 minggu. Setelah terjadi perubahan warna pada medium yang mengindikasikan telah diproduksinya metabolit sekunder selanjutnya kultur medium difraksinasi cair-cair (partisi) dengan pelarut etil asetat. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator*, sehingga didapatkan ekstrak kental etil asetat.

Pengukuran biomassa fungi endofitik

Biomasa fungi yang telah dipisahkan dari medium kultivasi selanjutnya ditimbang berat basah dan berat keringnya. Berat kering didapat dengan cara fungi diletakan di atas kertas saring lalu di oven dengan suhu 60° C selama ± 24 jam kemudian didinginkan di desikator lalu ditimbang. Pengeringan dilakukan berulang sampai didapat berat biomassa fungi yang konstan.

Uji aktivitas antioksidan Ekstrak Etil Asetat dengan metode DPPH

Larutan DPPH 0,05 mM yang terdiri dari DPPH yang dilarutkan dalam methanol disiapkan. Larutan induk dibuat dengan melarutkan sampel dalam dimetil sufoksida (DMSO) dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Variasi konsentrasi sampel dibuat dengan pengenceran larutan induk

menjadi 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, dan 0 µg/mL. Sebanyak 0,2 mL dari berbagai konsentrasi larutan sampel ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH 0,05 mM. Campuran larutan dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 517 nm. Untuk kontrol positif digunakan antioksidan standar (asam askorbat) dengan perlakuan yang sama seperti sampel. Persen Inhibisi sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH. Persen Inhibisi yang diperoleh dari setiap konsentrasi sampel, kemudian ditentukan IC_{50} (*Inhibition Concentration-50*). Data diolah menggunakan analisa regresi linier probit antara log konsentrasi larutan uji (x) dengan persentase Inhibisi (y) sehingga diperoleh IC_{50} . Setelah diperoleh IC_{50} dari setiap sampel, kemudian dilakukan perbandingan antara IC_{50} setiap sampel dengan IC_{50} Asam askorbat sebagai kontrol positif dari antioksidan [12].

Optimalisasi parameter fisiokimia dan nutrisi

Untuk mengoptimalkan parameter fisio-kimia dan nutrisi untuk mengekspresikan potensi antioksidan terbaik, kedua organisme ditanam pada suhu dan nilai pH yang berbeda. Profil waktu untuk potensi antioksidan dilakukan dengan menguji aktivitas antioksidan pada masa inkubasi 30 hari pertumbuhan dalam kondisi statis.

Efek sumber karbon dan nitrogen

Untuk menemukan sumber karbon terbaik, digunakan medium Czapek dox dimana sukrosa dalam media Czapek dox diganti dengan gula yang berbeda (glukosa dan dextrosa) sementara untuk mencari sumber nitrogen terbaik, natrium nitrat diganti dengan sumber nitrogen yang berbeda (ekstrak ragi dan pepton) pada konsentrasi yang sama yaitu 3% dan 0,2%, masing-masing.

Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak fungi endofit yang memiliki aktivitas antibakteri yang tinggi kemudian dilakukan analisis KLT. Analisis kromatografi lapis tipis menggunakan plat *silica gel* 60 dan pelarut etil asetat dan n-heksan dengan perbandingan eluen yang digunakan (etil asetat : n-heksan) yaitu 1:4, 3:2, 2:3, dan 4:1. Bercak yang terbentuk dilihat dengan menggunakan sinar UV dengan panjang gelombang 366 nm, dan ditentukan nilai R_f dari bercak senyawa yang terbentuk [51].

Uji Bioautografi

Ekstrak isolat fungi endofit yang telah dilarutkan dengan pelarut (etil asetat) kemudian diambil menggunakan pipa kapiler dan ditotolkan pada Plat Silika Gel. Selanjutnya plat yang telah ditotolkan ekstrak dimasukkan kedalam bejana berisi pelarut eluen berupa n-heksan : etil asetat (8:2), hingga pelarut naik sampai batas atas plat. Selanjutnya plat disemprot dengan larutan H₂SO₄, dan dipanaskan diatas *hotplate* hingga terbentuk noda. Noda yang muncul lalu diukur untuk menentukan nilai Rf [52].

$$Rf = \frac{\text{Jarak Tempuh Ekstrak}}{\text{Jarak Tempuh Pelarut}}$$

Kromatogram diletakkan dalam cawan petri yang telah berisi biakkan bakteri, noda pada kromatogram dijiplak ke cawan Petri, kromatogram dibiarkan menempel pada medium agar selama 30 menit supaya senyawa aktif berdifusi kedalam medium agar, kemudian diangkat dengan hati-hati. Setelah 24 jam diinkubasi dapat dilihat bercak atau zona bening yang terbentuk merupakan daerah senyawa aktif berada [53].

Karakterisasi dan identifikasi fungi endofitik secara fenotipik

Isolat fungi endofit yang mempunyai aktivitas antibakteri tinggi dari hasil seleksi selanjutnya diidentifikasi berdasarkan karakter fenotipik dan genotipik. Karakterisasi fenotipik meliputi morfologi makroskopis dan mikroskopis, sifat fisiologi dan biokimia. Hasil karakterisasi fenotipik jamur dibandingkan dengan karakter fungi pada Domsch *et al.* [54, 55, 56].

Karakterisasi dan identifikasi fungi endofitik secara molekuler

Identifikasi lebih lanjut dilakukan secara molekular (karakter genotipik) dengan menganalisis urutan DNA ribosom daerah ITS untuk jamur yang kemudian dibandingkan dengan data urutan DNA genus jamur yang sesuai yang telah diketahui. Identifikasi berdasarkan data molekular ditentukan dari perbandingan nilai similaritas dan perbedaan nukleotida dalam urutan fragmen DNA masing-masing isolat jamur terpilih dengan strain acuan. Hasil identifikasi filogenetik dibandingkan dengan data morfologi makroskopis dan mikroskopis masing-masing isolat jamur. Tahapan identifikasi secara molekular (karakter genotipik) meliputi :

1. Ekstraksi DNA Fungi

Pelet fungi diekstraksi masing-masing menggunakan kit ekstraksi DNA fungi. DNA yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C selama semalam (*overnight*) agar larut sempurna dalam bufer TE 1x dan selanjutnya disimpan di suhu -20°C untuk penyimpanan jangka waktu lama. Kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif. Penghitungan secara kuantitatif ditentukan dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm, kemudian dihitung rasio absorbansinya. Uji kualitas DNA dilakukan dengan metode elektroforesis menggunakan gel agarosa dengan konsentrasi 0,8%. Kualitas DNA baik apabila pita DNA nampak jelas, tebal, hanya ada satu pita dan tidak ada bayangan di bawah pita (*smear*) dan dibandingkan dengan marker [57].

1. Amplifikasi Daerah 16s rDNA dan *Internal Transcribed Spacer* (ITS) untuk *Sequencing*

Amplifikasi daerah 16s rDNA bakteri (setelah dilakukan Rep-PCR) dan ITS dilakukan dengan menggunakan satu pasang primer 27F-1492R. Amplifikasi daerah ITS jamur dilakukan menggunakan satu pasang primer ITS1-ITS4 (Tabel 1). Premix PCR untuk amplifikasi dibuat dengan komposisi sesuai dengan kit *Ready To Go* (*Amersham Pharmasia*) dengan volume total adalah 25 µL. Amplifikasi dilakukan dalam mesin PCR (*Biorad T100 Thermal Cycler*) dengan program pada Tabel 2. Tabung yang berisi *product* PCR disimpan pada suhu -20 °C untuk dianalisis melalui elektroforesis dan selanjutnya diurutkan sekuennya.

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA

No.	DNA	Primer	Urutan primer	Referensi
1	Fungi	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	[58]
2		ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	[58]

Tabel 2. Kondisi reaksi PCR untuk amplifikasi daerah ITS rDNA

Reaksi	Amplifikasi daerah ITS rDNA		
	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Prendenaturasi	94	5 menit	1x
Denaturasi	94	50 detik	30x
<i>Annealing</i>	54	50 detik	
Elongasi	72	50 detik	
Post-elongasi	72	10 menit	1x

Produk amplifikasi DNA dipisahkan menggunakan elektroforesis pada 1,5% gel agarose dalam bufer TBE 1x pada *voltage* konstan 90 volt selama 45 menit. Produk DNA hasil

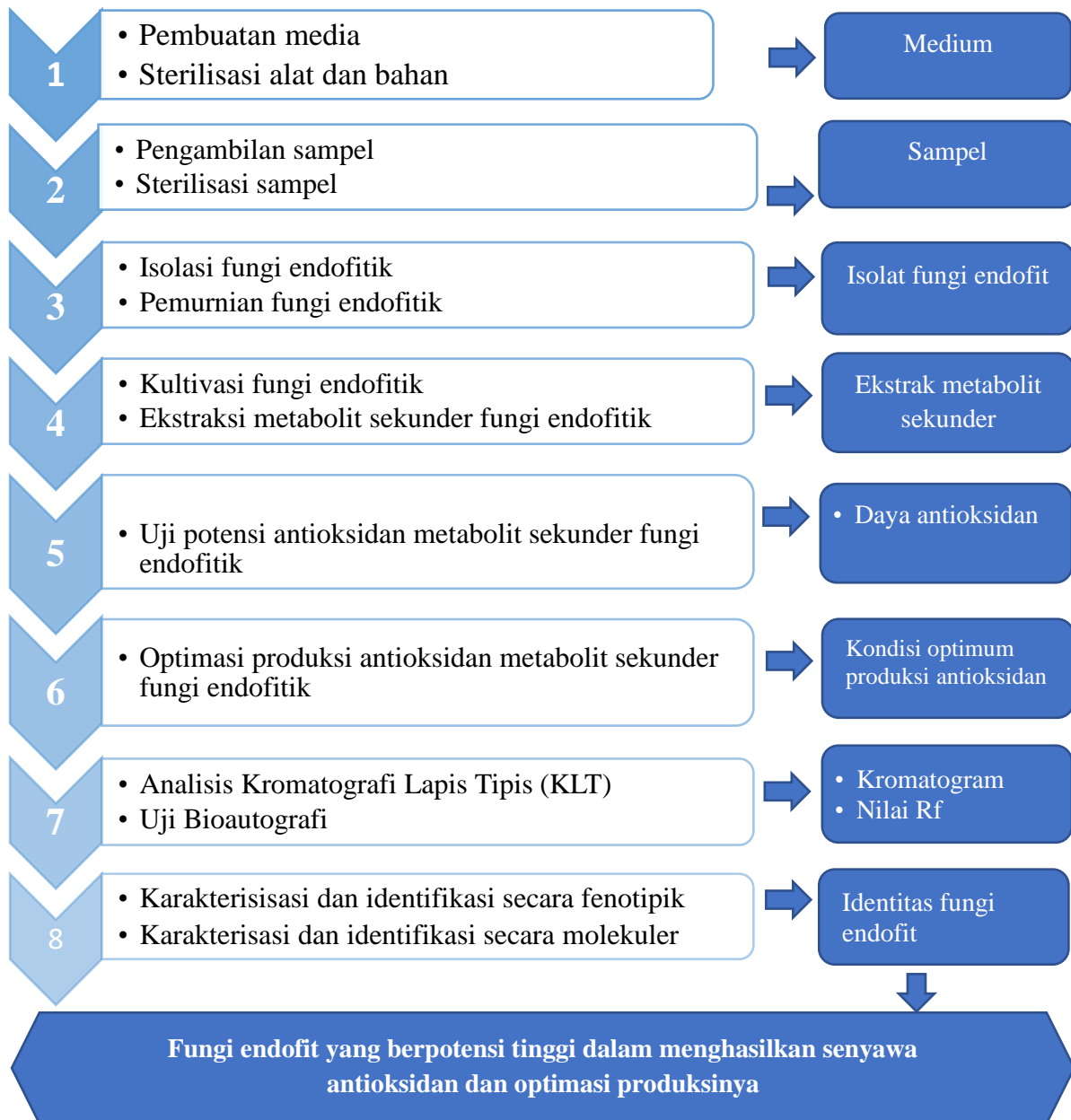
running PCR sebanyak 5 μ L dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose 1,5%. DNA *Marker* ukuran 100-3000 bp digunakan sebagai penanda ukuran produk PCR DNA dan dimasukkan sebanyak 6 μ L. Visualisasi fragmen DNA hasil PCR dilakukan menggunakan transilluminator sinar ultra violet dengan *Cyber safe* sebagai pewarna fragmen DNA.

3. Pemurnian dan *Sequencing* Hasil Amplifikasi

Produk fragmen DNA hasil PCR disiapkan untuk proses pemurnian dan selanjutnya diurutkan basa N nya. Produk hasil PCR masing-masing isolat dimasukkan dalam tube 0,2 mL sebanyak 40 μ L. Masing-masing primer dimasukkan ke dalam tube 0,2 mL lainnya sebanyak 10 μ L pada konsentrasi 10pmol dalam *nuclease-free water*. Sampel dan primer dikemas rapi dan rapat dalam kotak, kemudian disimpan dalam -20°C sebelum dikirim ke 1st BASE Malaysia untuk dimurnikan dan *disequencing*.

4. Analisis Data

Hasil urutan fragmen DNA dianalisis menggunakan program *Chromas Pro*. Homologi urutan fragmen DNA hasil sekuensing dengan data urutan DNA yang telah dilaporkan sebelumnya dicari menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) di situs GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

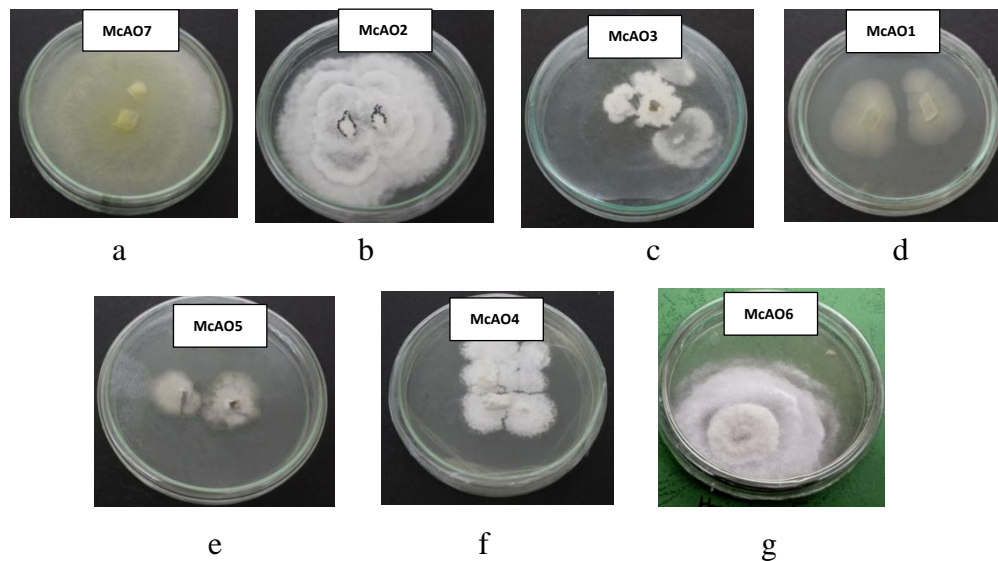
Diagram alir penelitian

Gambar 3. Diagram alir penelitian

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi fungi endofit tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell)

Isolat fungi endofit dari tumbuhan gelam diperoleh 7 isolat yaitu : McAO1, McAO2, McAO3, McAO4, McAO5, McAO6, DAN McAO7. Hasil pemurnian 7 isolat fungi endofitik dari daun tumbuhan Gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell), menunjukkan karakter morfologi yang bervariasi baik dari bentuk koloni, warna koloni dan pertumbuhan koloni (Gambar 4.).



Gambar 4. Isolat murni fungi endofit daun tumbuhan Gelam

Keterangan: a. Isolat McAO7, b. Isolat McAO2, c. Isolat McAO3, d. Isolat McAO1, e. Isolat McAO5, f. Isolat McAO4, g. Isolat McAO6

Isolasi dan pemurnian dari daun Tumbuhan Gelam diperoleh isolat fungi endofit yang berbeda-beda (Gambar 4.). Isolat fungi endofit yang dihasilkan dari tumbuhan inang dapat menghasilkan jenis isolat yang berbeda-beda dengan jumlah yang bervariasi. Hal ini dikarenakan adaptasi dari fungi endofit terhadap mikroekologi dan kondisi fisiologis yang spesifik dari masing-masing tumbuhan inang, bahkan dari satu jaringan hidup suatu tumbuhan dapat diisolasi lebih dari satu jenis fungi endofit. Isolat fungi endofit yang telah diisolasi merupakan koloni fungi yang mampu menembus lapisan luar dari tumbuhan inang dengan cara pemecahan mekanis maupun reaksi enzimatik Hasiani *et al.* (2015). Kolonisasi fungi endofit yang berada pada jaringan tumbuhan inang tergantung pada kemampuan fungi tersebut untuk melakukan penetrasi terhadap lapisan tumbuhan bagian luar yang sangat protektif. Penetrasi

tersebut dapat dilakukan dengan cara pemecahan mekanis jaringan pelindung tumbuhan maupun melalui reaksi enzimatik terhadap lapisan kutikula dan epidermis tumbuhan inang tersebut (Petrini,1992)

Kultivasi dan ekstraksi metabolit sekunder fungi endofit tumbuhan gelam menggunakan etil asetat

Hasil kultivasidan ekstraksi metabolit sekunder 7 isolat fungi endofit di dalam medium Potato Dextrose Broth disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil kultivasi dan ekstraksi metabolit sekunder fungi endofit tumbuhan Gelam

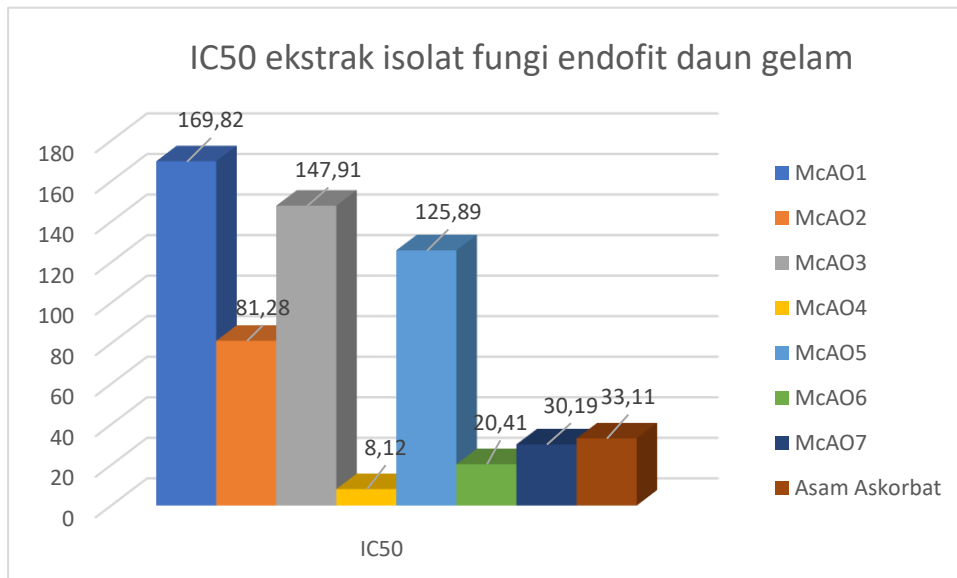
No.	Kode isolat	Persentase ekstrak (b/v)	Biomassa fungi (g)	Berat ekstrak (g)
1	McAO1	40	0,63	0,20
2	McAO2	82	2,83	0,41
3	McAO3	58	2,34	0,29
4	McAO4	60	2,88	0,30
5	McAO5	44	1,77	0,22
6	McAO6	56	2,80	0,28
7	McAO7	48	1,40	0,24

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa antara biomassa fungi dengan berat ekstrak tidak berbanding lurus, artinya tidak selalu yang memiliki biomassa fungi tinggi berat ekstraknya juga akan tinggi, dan sebaliknya. Menurut Gandjar *et al.* (2014), fungi dapat hidup dan tumbuh di dalam medium pertumbuhan pada masa fermentasi dikarenakan fungi endofit dapat menggunakan nutrient yang ada pada medium tersebut (substrat), kemudian mengekskresikannya berupa enzim ekstraseluler kelilingkungan sehingga adanya pertumbuhan fungi endofit dalam medium dapat dilihat perubahan warna pada medium dan penambahan massa sel.

Biomassa fungi endofit yang banyak belum tentu dapat menghasilkan ekstrak metabolit sekunder yang banyak. Hal ini di duga fungi endofit menghasilkan metabolit sekunder yang berbeda-beda dalam masa produksinya. Perbedaan biomassa dan berat ekstrak yang didapatkan dipengaruhi oleh faktor pertumbuhan fungi. Beberapa fungi endofit menghasilkan ekstrak metabolit sekunder dengan cepat dan ada pula yang lambat. Menurut Srikandace *et al.* (2007), fungi endofit akan menghasilkan metabolit sekunder pada fase stasioner. Pada fase stasioner, sel menjadi tua, laju pembiakan berkurang dan beberapa sel mati karena menyusutnya nutrient dalam medium. Metabolisme akan terus berlangsung yang menyebabkan melimpahnya produksi metabolit sekunder di medium.

Aktivitas Antioksidan Isolat Fungi Endofit Tumbuhan Gelam

Hasil pengukuran aktivitas antioksidan metabolit sekunder dari 7 isolat fungi endofit disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Aktivitas antioksidan ekstrak isolat fungi endofit tumbuhan gelam

Aktivitas antioksidan dari ekstrak 7 isolat fungi endofit tumbuhan gelam yang ditampilkan pada Gambar 5. Jika dikelompokkan berdasarkan kriteria kekuatan antioksidannya dimana menurut Phongpaichit (2007) nilai $IC_{50} > 100-250 \mu\text{g/mL}$: lemah, $IC_{50} > 50-100 \mu\text{g/mL}$: sedang, $IC_{50} 10-50 \mu\text{g/mL}$: kuat, dan $IC_{50} \leq 10 \mu\text{g/mL}$: sangat kuat, maka 4 (empat) ekstrak isolat yang memiliki aktivitas kuat yaitu : McAO4, McAO6, dan McAO7, aktivitas sedang yaitu isolat McAO2, dan isolat McAO3, McAO5, dan McAO1 menunjukkan aktivitas lemah.

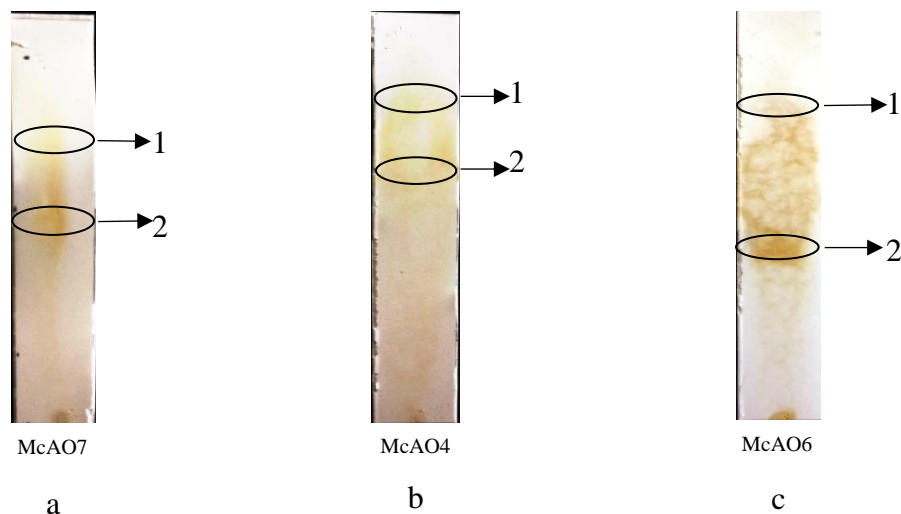
IC_{50} merupakan parameter nilai yang menunjukkan efektivitas suatu senyawa dalam penghambatan radikal bebas. Hal ini dapat dilihat pada (Tabel 2) bahwa ekstrak isolat fungi dengan nilai IC_{50} yang mendekati dengan nilai IC_{50} asam askorbat (standar) yakni McAO4, McAO6, dan McAO7 yang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil analisis KLT ekstrak metabolit sekunder isolat McAO4, McAO6, dan McAO7 dengan eluen (n-heksan:etil asetat, 8:2) dapat dilihat pada Gambar 6. ketiga ekstrak metabolit sekunder fungi endofit terdapat 2 bercak warna yang menandakan jumlah senyawa yang terdapat dalam ekstrak. Bercak yang diperoleh menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya warna jingga, kuning, dan coklat pada ketiga isolat. Menurut pernyataan Yuliani

et al. (2003), jumlah bercak warna yang terbentuk menunjukkan banyaknya komponen atau senyawa yang terdapat dalam ekstrak tersebut.

Ekstrak metabolit sekunder isolat fungi endofit McAO4, McAO6, dan McAO7 yang memiliki aktivitas antioksidan dilakukan analisis kromatografi lapis tipis dengan metode pemisahan komponen kimia berdasarkan fase gerak dan fase diam untuk mengetahui banyaknya senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak metabolit sekunder tersebut dan dihitung jumlah noda yang ada pada plat KLT. Menurut Rusli *et al.* (2015), menyatakan bahwa kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan komponen kimia berdasarkan fase diam dan fase gerak (eluen). Pemisahan senyawa terjadi berdasarkan kompetisi pengikatan solut dan solven pada fase diam. Jika dua senyawa yang berbeda kepolarannya melintas, maka senyawa yang lebih polar akan memiliki interaksi dengan plat silika lebih kuat dari pada yang lainnya. Oleh karena itu, lebih mudah menghilangkan fase gerak dari tempat terikatnya.



Gambar 6. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak metabolit sekunder fungi endofit tumbuhan gelam menggunakan eluen n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 8:2

Keterangan: a. Isolat McAO7 1. bercak 1
 b. Isolat McAO4 2. bercak 2
 c. Isolat McAO6

Berdasarkan jumlah bercak yang terbentuk pada plat kromatogram, diketahui pada ekstrak fungi endofit McAO4, McAO6, dan McAO7 memiliki jumlah bercak yang sama, yang menandakan jumlah senyawa bioaktif yang dihasilkan tiga isolat ini sama. Dapat dilihat dari (Tabel 2.) Nilai Rf dari isolat McAO4 dan McAO7 pada bercak warna nomor 1 bernilai 0,18 yang berwarna kuning. Nilai Rf dari ketiga isolat pada bercak warna nomor 4 bernilai 0,45 yang berwarna coklat. Menurut Harbone (1998), senyawa berwarna coklat tergolong senyawa

tanin dan senyawa yang berwarna kuning tergolong senyawa fenol. Nilai Rf dari ketiga isolat pada bercak warna nomor 2 bernilai 0,36 yang berwarna jingga. Menurut pendapat Bustanussalam *et al.* (2015), bahwa senyawa yang berwarna jingga tergolong dalam senyawa flavonoid.

Tabel 2. Jumlah senyawa dan nilai Rf ekstrak metabolit sekunder fungi endofit tumbuhan gelam.

Isolat	Bercak	Warna	Nilai Rf	Senyawa
McAO7	1	Kuning	0,18	Fenol
	2	Jingga	0,36	Flavonoid
McAO4	1	Kuning	0,18	Fenol
	2	Jingga	0,36	Flavonoid
McAO6	1	Kuning	0,18	Fenol
	2	Jingga	0,36	Flavonoid

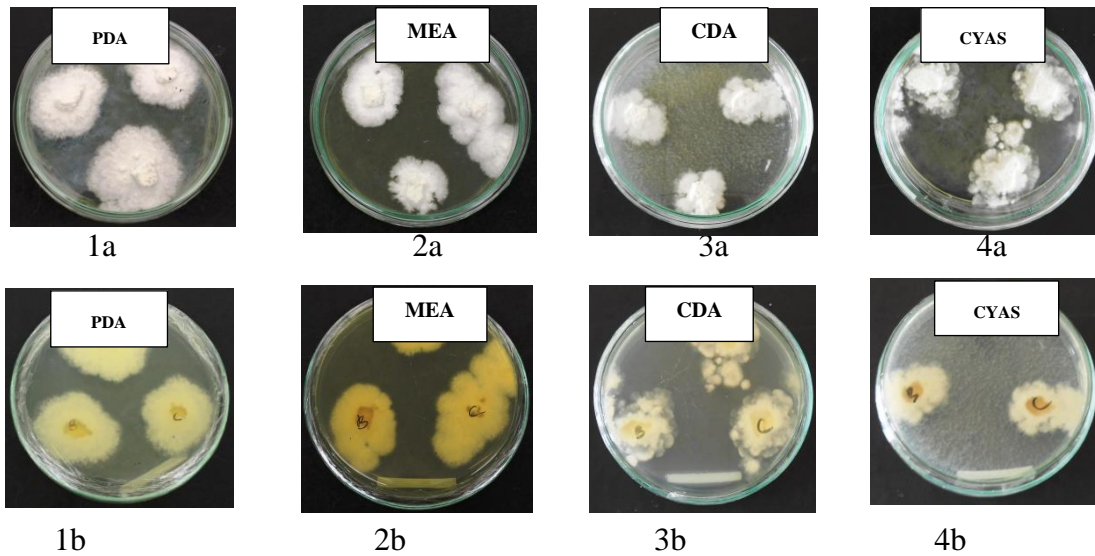
Berdasarkan (Tabel 2) diketahui bahwa dari ketiga ekstrak metabolit sekunder fungi endofit isolat McAO4, McAO6, dan McAO7 memiliki nilai Rf yang berbeda-beda, hal ini menunjukkan bahwa jenis senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh masing-masing ekstrak metabolit sekunder fungi endofit berbeda pula. Menurut pendapat Naufal *et al.* (2017), bahwa jarak yang ditempuh oleh suatu senyawa dari titik penotolan sampai ke pusat bercak disebut nilai Rf. Biasanya nilai tersebut berada pada kisaran 0,00-1,00 dan sangat penting untuk digunakan dalam mengidentifikasi suatu senyawa. Menurut pendapat Santoni *et al.* (2019), suatu senyawa hasil isolasi yang telah murni akan terlihat dari nilai Rf senyawa hasil isolasi yang dielusi dengan berbagai perbandingan eluen yang menunjukkan noda tunggal.

Hasil karakterisasi dan identifikasi fungi endofit tumbuhan gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) yang berpotensi sebagai antioksidan

Berdasarkan pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak metabolit sekunder fungi endofit tumbuhan Gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) yang telah dilakukan, isolat McAO4, McAO6, dan McAO7 memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat, sehingga dilakukan karakterisasi dan identifikasi secara makroskopis dan mikroskopis.

Karakterisasi dan Identifikasi Fungi Endofit Tumbuhan Gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) yang Berpotensi sebagai Antioksidan Isolat McAO4

Karakter makroskopis isolat fungi endofit **McAO4** pada medium PDA, MEA, CDA, dan CYAS, dapat dilihat pada Gambar 7.



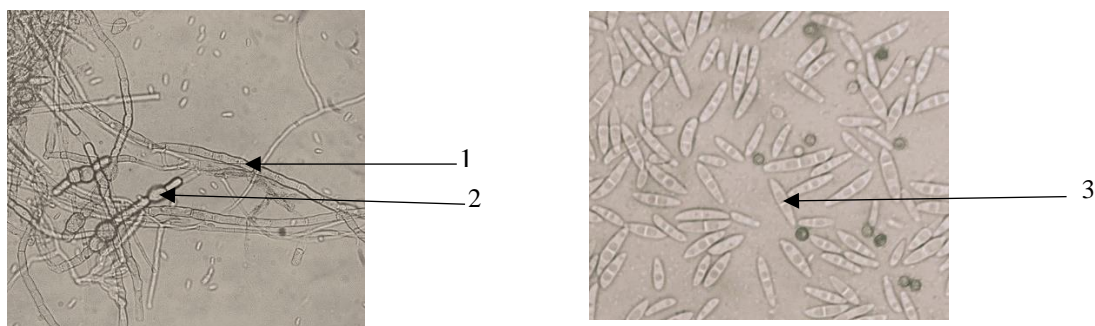
Gambar 7. Koloni fungi endofit isolat McAO4 tumbuhan gelam pada medium PDA, MEA, CDA, dan CYAS

Keterangan : 1a, 2a, 3a, 4a : permukaan koloni
1b, 2b, 3b, 4b: sebalik koloni

Tabel 3. Karakter Makroskopis dan Identifikasi Fungi Endofit Isolat McAO4

Characteristics	PDA medium	MEA medium	CDA medium	CYAS medium
Colony color	White	White	White	White
Colony reverse color	White	White	White	White
Medium color around colony	Yellowish	Yellowish	Hyaline-yellowish	Hyaline
Colony surface	Granular	Granular	Granular	Granular
Colony diameter	3.4 - 4.5cm in 7 days	2.9 - 4.0cm in 7 days	3.00 - 4.30cm in 7 days	2.3 - 3.5cm in 7 days

Karakter mikroskopis dari isolat McAO4 dapat dilihat pada Gambar 8.

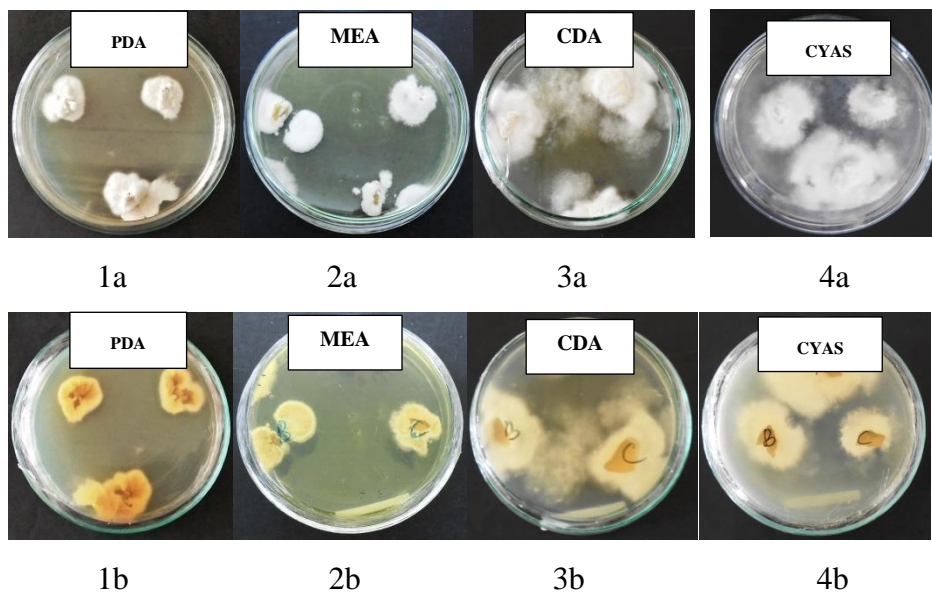


Gambar 8. Karakteristik mikroskopis isolat McAO4
1. Hifa 2.Klamidospora 3. Makrokonidia

Karakteristik mikroskopis isolat fungi endofit McAO4 pada (Gambar 8) memiliki kladospora, percabangan kladospora dan mikrokonidia.

Karakterisasi dan Identifikasi Fungi Endofit Tumbuhan Gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) yang Berpotensi sebagai Antioksidan Isolat McAO6

Karakteristik makroskopis isolat McAO6 pada (Gambar 9) dalam medium PDA, MEA, CDA dan CYAS dengan umur 3-7 hari mengalami pertumbuhan yang berbeda. Pada medium MEA pertumbuhan koloni sangat lambat dibandingkan pertumbuhan pada medium PDA, CDA dan CYAS. Diameter koloni pada pertumbuhan di medium MEA $\pm 0,6 - 1,7$ cm. warna konidia putih dengan warna media dibalik koloni bening kekuningan. Medium CDA dan CYAS mengalami pertumbuhan koloni yang cepat dibandingkan medium PDA dengan diameter $\pm 2,3 - 4,5$ cm dan $\pm 2,3 - 5,1$ cm dalam 3-7 hari, memiliki warna konidia putih, permukaan koloni bergranula dan tekstur kasar. Pertumbuhan koloni pada medium PDA mengalami pertumbuhan dengan kategori sedang dibandingkan yaitu dengan diameter $\pm 2 - 3,3$ cm.



Gambar 9. Koloni fungi endofit isolat McAO6 tumbuhan gelam pada medium PDA, MEA, CDA, dan CYAS

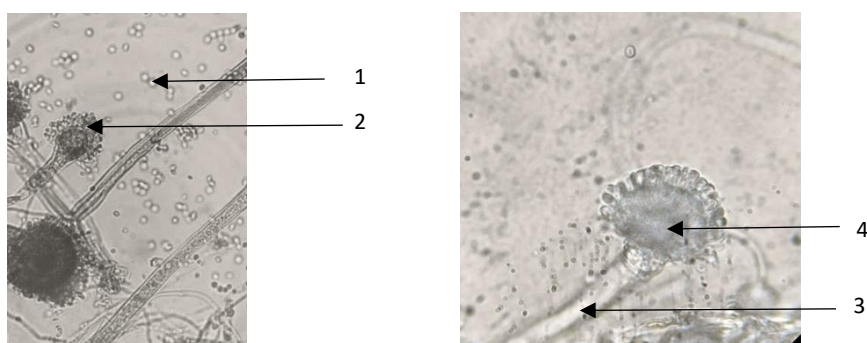
Keterangan : 1a, 2a, 3a, 4a : permukaan koloni
1b, 2b, 3b, 4b: sebalik koloni

Karakter makroskopis fungi endofit tumbuhan gelam isolate McAO6 disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Karakter Makroskopis Fungi Endofit Isolat McAO6

Characteristics	PDA medium	MEA medium	CDA medium	CYAS medium
Colony color	White	White	White	White
Colony reverse color	Brownish white	White	White	Brownish white
Medium color around colony	Hyaline-yellowish	Hyaline-yellowish	Hyaline-yellowish	Yellowish white
Colony surface	Granular	Granular	Granular	Granular
Colony diameter	2.0 – 3.3cm in 7 days	0.6 – 1.7cm in 7 days	2.3 – 4.5cm in 7 days	2.3 - 3.5cm in 7 days

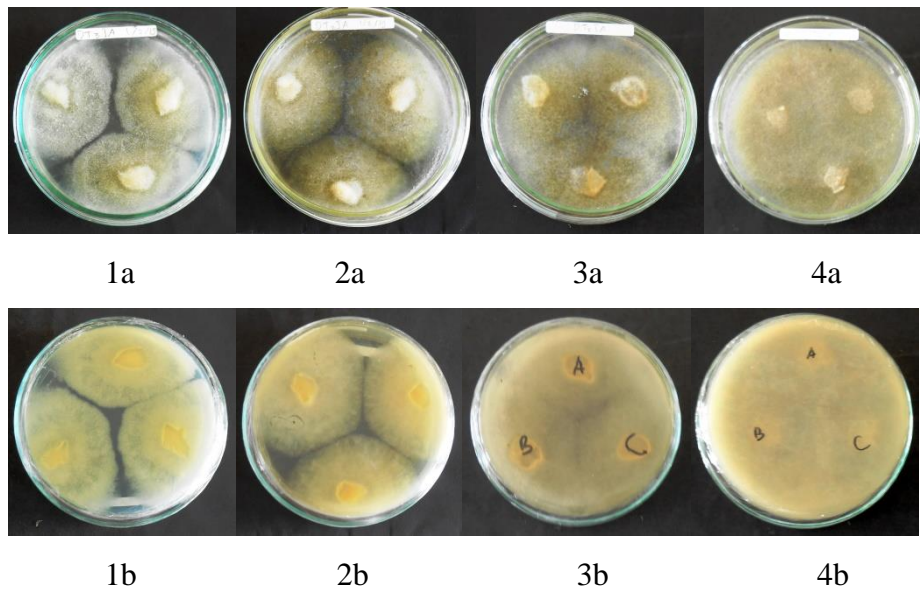
Karakterisasi mikroskopis isolat fungi endofit McAO6 pada (Gambar 10.) memiliki kepala konidia yang umum, fialid, versikel, konidiofor dan konidia.



Gambar 10. Karakteristik mikroskopis isolat McAO6
1. Konidia 2. Fialid 3. Konidiofor 4. Vesikel

Karakterisasi dan Identifikasi Fungi Endofit Tumbuhan Gelam (*Melaleuca cajuputi* Powell) yang Berpotensi sebagai Antioksidan Isolat McAO7

Karakter makroskopis isolat fungi endofit McAO7 pada medium PDA, MEA, CDA dan CYAS dapat dilihat pada (Gambar 11.) pada medium PDA dan MEA koloni fungi mengalami pertumbuhan yang sedang dibandingkan medium CDA dan CYAS selama 3-7 hari dengan diameter PDA $\pm 3,8 - 6,5$ cm dan MEA $\pm 3,8 - 6$ cm dengan warna koloni putih kekuningan sedikit krem. Pada medium CDA dan CYAS koloni fungi memiliki warna yang sama dengan medium PDA yaitu berwarna putih kekuningan sedikit krem tetapi memiliki pertumbuhan koloni yang berbeda. Isolat fungi DT3IA pada medium CDA dan CYAS pertumbuhan koloni sangat cepat selama 3-7 hari dengan diameter koloni CDA $\pm 4 - 6,6$ cm dan CYAS $\pm 4,4 - 7,5$ cm.



Gambar 11. Koloni fungi endofit isolat McAO7 tumbuhan gelam pada medium PDA, MEA, CDA, dan CYAS

Keterangan : 1a, 2a, 3a, 4a : permukaan koloni
1b, 2b, 3b, 4b: sebalik koloni

Tabel 5. Karakter makroskopis Fungi Endofit Isolat McAO7

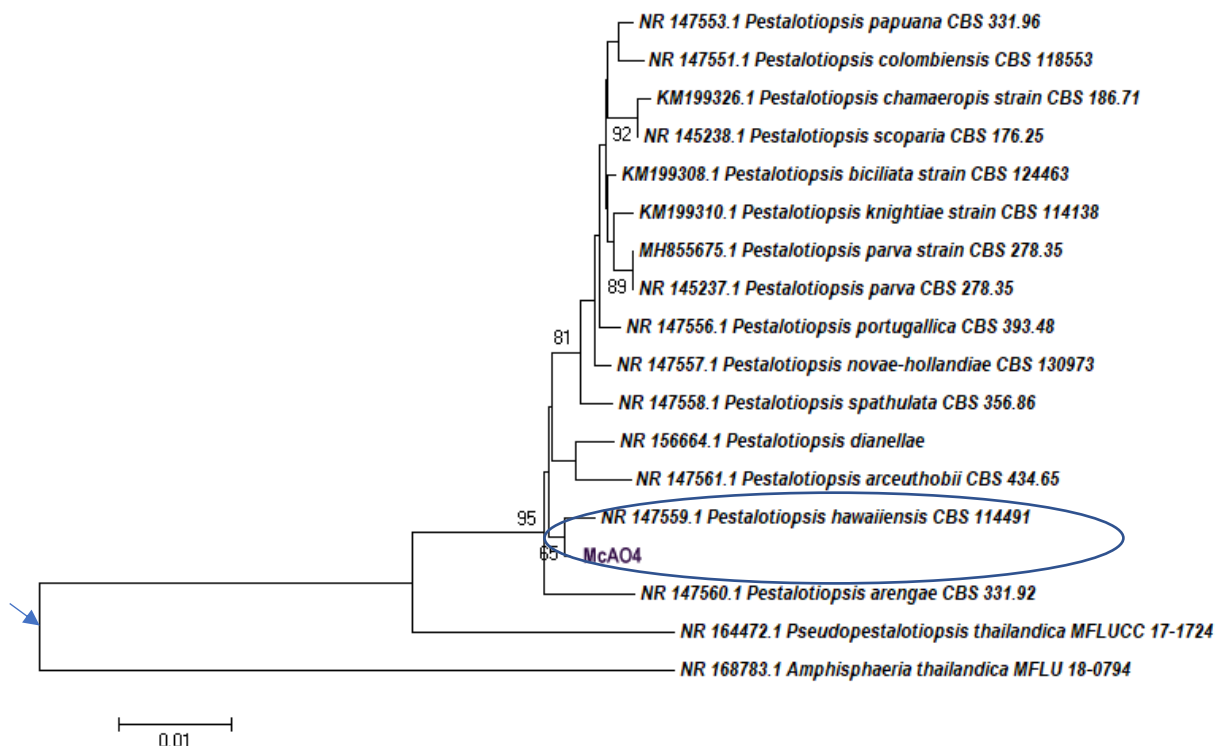
Characteristics	PDA medium	MEA medium	CDA medium	CYAS medium
Colony color	Yellowish white	Creamy yellow	Creamy yellow	Creamy yellow
Colony reverse color	Yellowish white	Hyaline yellowish	Yellowish hite	Yellowish white
Medium color around colony	Hyaline-yellowish	Hyaline-yellowish	Yellowish cream	Yellowish cream
Colony surface	Granular	Granular	Granular	Granular
Colony diameter	3.6 – 6.5cm in 7 days	3.8 – 6.0cm in 7 days	4.0 – 6.6cm in 7 days	4.4 – 7.5cm in 7 days



Gambar 12. Karakteristik mikroskopis isolat McAO7
Keterangan : 1. Kolumela 2. Hifa 3. Suspensor 4. Zigospora

Karakterisasi mikroskopis isolat fungi endofit McAO7 pada (Gambar 12.) memiliki zigospora, suspensor, sporangiofor dan kolumela.

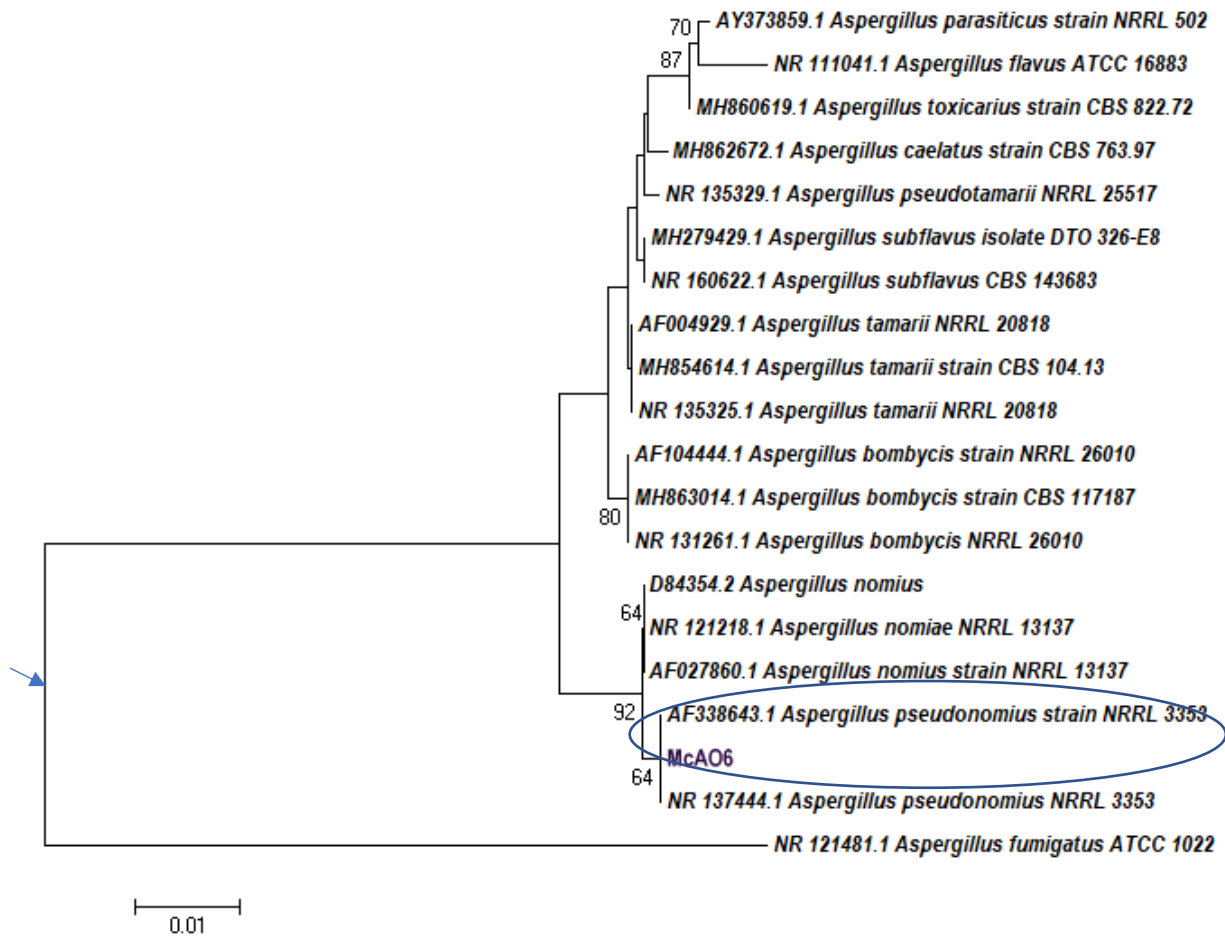
Hasil identifikasi molekuler isolat McAO4



Gambar 13. Pohon filogeni isolat jamur McAO4 beserta strain acuan hasil konstruksi berdasarkan algoritma Neighbour-joining. Angka di setiap cabang menunjukkan bootstrap. Tanda panah mengindikasikan perkiraan posisi akar pohon filogeni. Skala menunjukkan substitusi 2 per 100 nukleotida pada sequence daerah ITS rDNA.

Isolat McAO4 memiliki homologi sebesar 98,81% dengan *Pestalotiopsis hawaiiensis* CBS 114491. Hal ini sesuai dengan visualisasi pohon filogeni (Gambar 13.) yang menunjukkan bahwa isolate McAO4 berada dalam satu subkluster dengan *Pestalotiopsis hawaiiensis* CBS 114491 (subkluster II) dan dalam kluster genus *Pestalotiopsis* (kluster I). *Pestalotiopsis hawaiiensis* merupakan spesies baru yang pertama kali dipublikasi oleh Maharachch, Hyde & Crous (2014).

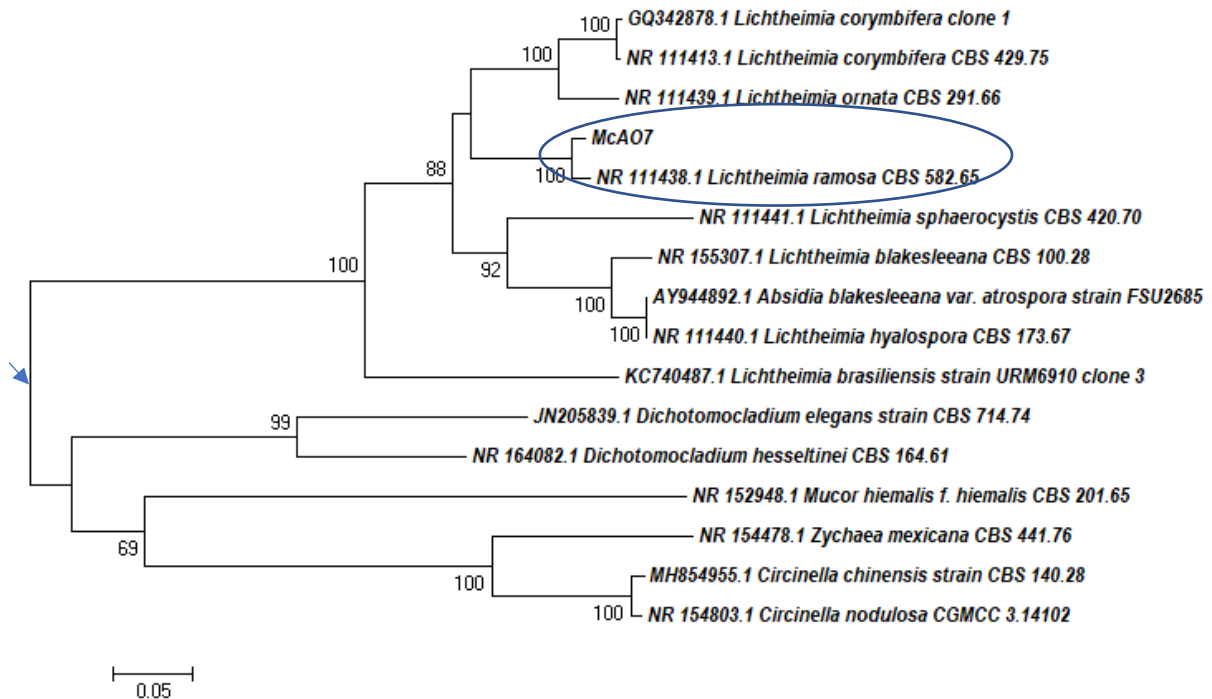
Hasil identifikasi molekuler isolat McAO6



Gambar 14. Pohon filogeni isolat jamur McAO6 beserta strain acuan hasil konstruksi berdasarkan algoritma Neighbour-joining. Angka di setiap cabang menunjukkan bootstrap. Tanda panah mengindikasikan perkiraan posisi akar pohon filogeni. Skala menunjukkan substitusi 2 per 100 nukleotida pada sequence daerah ITS rDNA.

Konstruksi pohon filogenetik isolat McAO6 menunjukkan bahwa isolat jamur ini berkerabat dekat dengan *Aspergillus pseudonomius* strain NRRL 3353 (subkluster III) (Gambar 14.). Hal ini ditunjukkan dengan nilai homologi sebesar 99,83%. *Aspergillus pseudonomius* merupakan spesies baru yang mirip dengan *A. nomius* (kluster II) dan memiliki sinonim *A. pseudonomia* yang dipublikasikan pertama kali oleh Varga, Frisvad & Samson (2011). Spesies ini adalah anggota dari *Aspergillus* section *Flavi* bersama dengan anggota kluster I.

Hasil identifikasi molekuler isolat McAO7



Gambar 15. Pohon filogeni isolat jamur McAO7 beserta strain acuan hasil konstruksi berdasarkan algoritma Neighbour-joining. Angka di setiap cabang menunjukkan bootstrap. Tanda panah mengindikasikan perkiraan posisi akar pohon filogeni. Skala menunjukkan substitusi 2 per 100 nukleotida pada sequence daerah ITS rDNA.

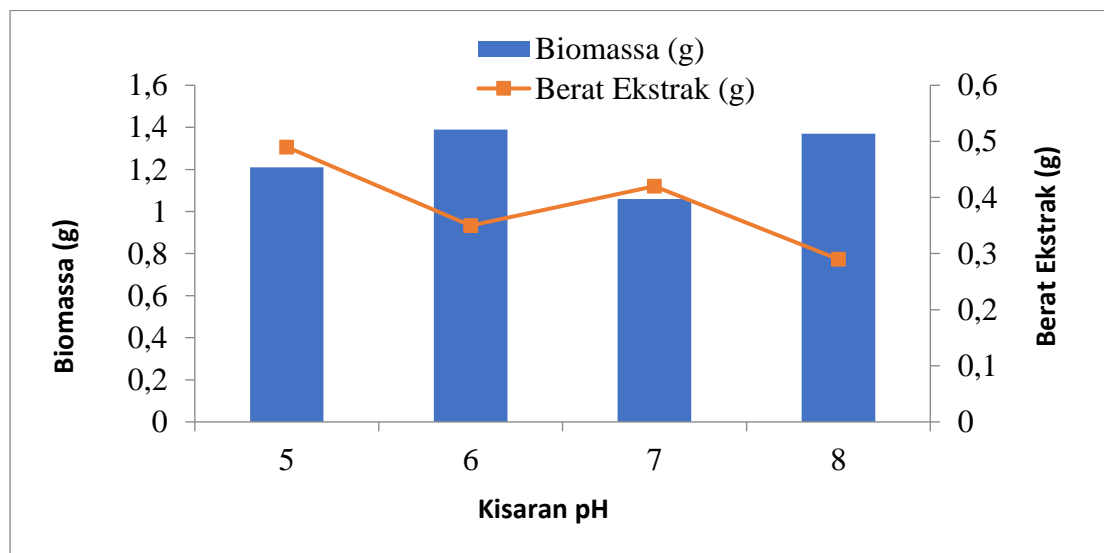
Berdasarkan konstruksi pohon filogenetik (Gambar 15), diketahui bahwa isolat McAO7 bergabung dalam satu kluster genus *Lichtheimia* (II) dan berkerabat dekat dengan *Lichtheimia ramosa* CBS 582.65 (subkluster D). Hal ini didukung oleh nilai homologi daerah ITS rDNA sebesar 92,48% dan kesamaan morfologi dengan *Lichtheimia ramosa*. Dalam kluster I genus *Lichtheimia*, masuk genus *Absidia blakesleeana* var *atrospora* strain FSU2685, karena genus *Lichtheimia* dan *Absidia* merupakan sinonim (Mycobank). Dalam Gambar 15, genus *Lichtheimia* dalam Kluster II berkerabat dengan *Dichotomocladium* yang berada dalam satu family Lichtheimiaceae, *Zychoaea*, *Circinella* dan *Mucor*. Genera tersebut merupakan anggota Ordo Mucorales.

Hasil optimasi dengan variasi pH isolat fungi McAO4

Hasil optimasi dengan variasi pH isolat fungi McAO4 disajikan pada Tabel 6 dan Gambar 16

Tabel 6. Hasil optimasi dengan variasi pH isolate fungi McAO4

pH	Volume Medium (mL)	Berat Basah (g)	Berat Kering (g)	Berat Ekstrak (g)
5	465	10,72	1,21	0,49
6	470	10,80	1,39	0,35
7	480	8,51	1,06	0,42
8	475	7.85	1,37	0,29



Gambar 16. Hasil optimasi dengan variasi pH isolat fungi McAO4

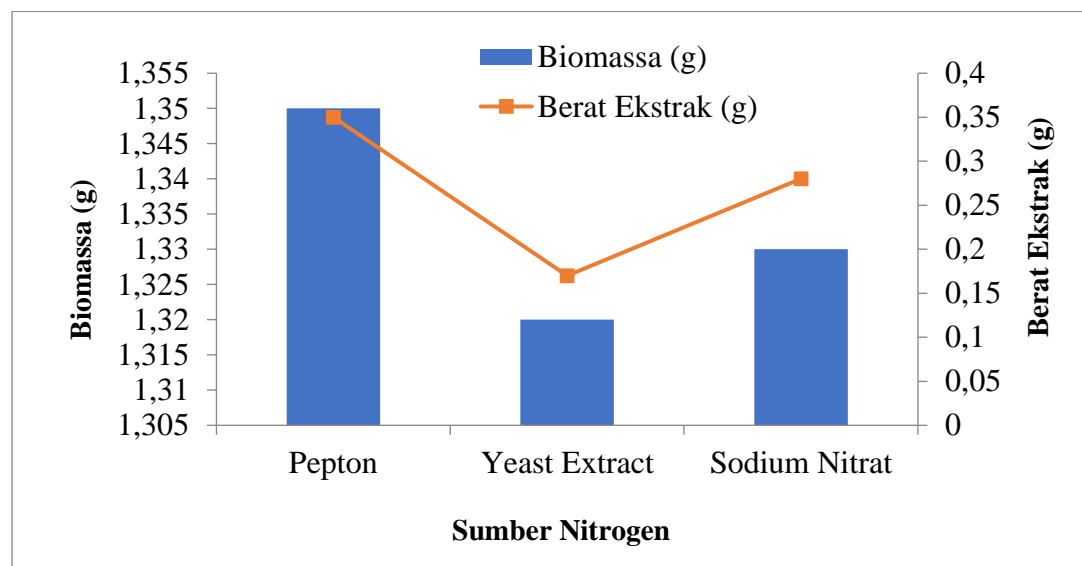
Dari Tabel 6 dan Gambar 16 bahwa ternyata pH 5 memberikan hasil berat ekstrak yang paling tinggi.

Hasil optimasi dengan variasi sumber Nitrogen isolat fungi McAO4

Hasil optimasi dengan variasi pH isolat fungi McAO4 disajikan pada Tabel 7 dan Gambar 17

Tabel 4.3. Hasil optimasi dengan variasi sumber Nitrogen isolat fungi McAO4

Sumber Nitrogen	Volume Medium (mL)	Berat Basah (g)	Berat Kering (g)	Berat Ekstrak (g)
Pepton	480	6,89	1,35	0,35
<i>Yeast Extract</i>	475	5,95	1,32	0,17
Sodium Nitrat	480	9,22	1,33	0,28



Gambar 4.7. Hasil optimasi dengan variasi sumber Nitrogen isolat fungi McAO4

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan sementara sebagai berikut:

1. Fungi endofit yang diperoleh dari tumbuhan Gelam sebanyak 7 isolat fungi, yaitu isolate McAO1, McAO2, McAO3, McAO4, McAO5, McAO6, DAN McAO7
2. Ekstrak metabolit sekunder isolat fungi endofit yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat yakni ekstrak isolat McAO4, McAO6, McAO7 dengan nilai IC₅₀ berturut-turut 8,12 µg/mL, 20,41 µg/mL dan 30,19 µg/mL.
3. Ekstrak metabolit sekunder isolat fungi endofit McAO4, McAO6, dan McAO7 mengandung senyawa fenol dan flavonoid.
4. Isolat McAO4 memiliki homologi sebesar 98,81% dengan *Pestalotiopsis hawaiiensis* CBS 114491, isolat McAO6 memiliki homologi sebesar 99,83% dengan *Aspergillus pseudonomius* strain NRRL 3353, isolat McAO7 memiliki homologi dengan *Lichtheimia ramosa* CBS 582.65 dengan nilai homologi sebesar 92,48%.
5. Hasil optimasi pH menunjukkan pH 5 yang memberikan hasil berat ekstrak tertinggi (0,49 gram), dan sumber nitrogen berupa pepton juga memberikan hasil berat ekstrak tertinggi (0,35 gram).

DAFTAR PUSTAKA

1. Munawar dan Elfita, 2007. Penelusuran aktivitas antibakteri kulit akar tumbuhan Medang seluang (*Litsea spatulata*) terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dan *Shigella dysenteriae*. *Biosfera*, 24(1): 31-37.
2. Tan, RX and WX.Zou.2001. Endophytes : a rich source of functional metabolites. *Nat Prod.Rep.*18:448-459.
3. Strobel, GA, and B.Daisy (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol.and Mol. Biology Rev* 67(4):491-502.
4. Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian Vol.II,No.3:113-126*.
5. Stierle, A.,D.Stierle, G.Strobel, G.Bignami, and P.Grothaus. 1995. Bioactive metabolites of the endophytic fungi of pacific yew *Taxus brevifolia*. Elsevier Scientific Publ.,Ireland.
6. Widiana, A., Taufikurahman, Limin S.H., Hernaman I. Dan Manurung R. 2014. The Potential of Gelam Leaves (*Melaleuca cajuputi* Powell) as Cattle Feed. *Pakistan Journal of Nutrition*. 13(6) : 348 – 350.
7. Al-Abd¹, N.M., Zurainee Mohammed Nor, Marzida Mansor, Fadzly Azhar, M.S. Hasan dan Mustafa Kassim. 2015. Antioxidant, Antibacterial Activity, and Phytochemical Characterization of *Melaleuca cajuputi* extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15 : 385 – 397.
8. Al-Abd², N.M., Zurainee M.N., Marzida M., MS Hasan dan Mustafa K. 2016. Antifilarial and Antibiotic Activities of Methanolic Extracts of *Melaleuca cajuputi* Flowers. *Korean J Parasitol*. 54(3) : 273 – 280.
9. Daud, D., Nor N.M.S.G., Mohd Tajudin M.A. dan Alene T. 2015. The effect of *Melaleuca cajuputi* methanolic leaves extract on body growth, puberty and sperm quality of juvenile male rats. *Biotechnology an Indian Journal*. 11(9) : 335 – 339.
10. Asikin, S. 2016. Efektivitas Ekstrak Galam Sebagai Pestisida Nabati Terhadap Hama Krop Kubis (*Crocidolomia pavaonana*) Skala Laboratorium. *Prosiding Seminar Nasional Lahan Basah*. Jilid 3 : 921 – 926.
11. Ajizah, A. 2004. Sensivitas *Salmonella typhimurium* terhadap Ekstrak Daun *Psidium guajava* L. *Bioscientiae*. 1(1) : 31 – 38.
12. Wahdaningsih, S., Setyowati, E.P., dan S. Wahyuono. 2011. Aktivitas penangkap radikal bebas dari batang pakis (*Alsophila glauca* J.Sm). *Majalah Obat Tradisional* 16 (3) : 59-68.
13. Sasikumar, JM, U Jinu, R Shamna.2 009. Antioxidant activity and HPTLC analysis of *Pandanus odoratissimus* L. Root. *Journal of Biological Sciences* 1 (2): 17-22
14. Pietta, PG. 2000. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 2000, 63 (7) : 1035–1042
15. Dewi, S.R, Ulya,N., dan B.D.Argo1. 2018.Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak *Pleurotus ostreatus*. *Jurnal Rona Teknik Pertanian*, 11(1) : 1-11
16. Marxen, K, Vanselow, K. H. , Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A. And Peter Hansen, U. 2007. Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. *Sensors* 2007. 7, 2080-2095
- 17.Kaul, S.S.G., Ahmad, M., Dhar, M.K. 2012. Endophytic Fungi fro Medical Plants: A Treasure Hunt for Bioactive Metabolites, *Phytochemistry Reviews* 11: 487-505.

18. 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.
19. 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
20. Huang, W.Y, Cai, Y.Z, Xing, J., Corke, H, and M.Sun.2007.A potential antioxidant resource: Endophytic fungi from medicinal plants. *Economic Botany*.March 2007, 61:14
21. 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.
22. Zhao J¹, 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.
23. Prihatiningtias, W. 2006. Mikroba Endofit, Sumber Penghasil Antibiotik Yang Potensial. Fakultas Farmasi UGM.
24. Tanaka, K., Masumori M., Yamanoshita, T. Dan Tange T. 2011. Morphological and Anatomical Changes of *Melaleuca cajuputi* Under Submergence. *Original Paper Trees*. 25 : 695 – 704.
25. Siddique, S., Zahida, P., Firdaus, E.B., and Sania, M. 2017. Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities Of Essential Oils From Leaves Of Three *Melaleuca* Species Of Pakistani Flora. *Arabian Journal of Chemistry*. 30: 1-8.
26. Meisarani, A., dan Zelika, M.R. 2013. Kandungan Senyawa Kimia dan Bioaktivitas *Melaleuca cajuputi* Powell. *Jurnal Farmaka*. 14(2): 123-144.
27. Nuyim, T. 1998. Potentiality of *Melaleuca cajuputi* Powell Cultivation to Develop for Economic Plantation Purpose. *Journal of Research*. 1(1) : 1 – 10.
28. Kumala, S. 2014. Mikroba Endofit: Pemanfaatan Mikroba Endofit dalam Bidang Farmasi. Jakarta: PT. ISFI Penerbitan. V + 105 hlm
29. 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.
30. Pelczar, M.J. dan Chan E.C.S. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Terjemahan oleh Ratna Siri Hadioetomo, Teja Imas, S.Sutarmi Tjitrosomo, dan Sri Lestari Angka. Jakarta : Universitas Indonesia. Iii + 998 hlm
31. Sandhu, S.S, Kumar, S, R.P.Aharwal. 2014. Isolation and identification of endophytic fungi from *Ricinus communis* Linn and their antibacterial activity. *IJRPC* 4(3):611-618.
32. Widjajanti, H, Munawar, Hanum, L dan E.Nurnawati.2016. Eksplorasi senyawa antibakteri dan antioksidan fungi endofitik tumbuhan obat *Helminostachys zeylanica* dan *Tristaniopsis merguensis*. Laporan Penelitian Lanjutan Ristoja.
33. Elfita, Munawar, dan Muharni. 2012a. Antibacterial metabolite of an endophytic fungus from brotowali (*Tinaspora crispa*). *Prosiding Simposium Nasional Kimia Bahan Alam XX*.
34. Noverita, Fitria. D, dan E.Sinaga. 2009. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri jamur endofit dari daun dan rimpang *Zingiber ottensii* Val. *Jurnal Farmasi Indonesia* 4(4) : 171-174.
35. Posangi, J., dan Robert A, B. 2014. Analisis Aktivitas dari Jamur Endofit yang Terdapat dalam Tumbuhan Bakau *Avicennia marina* di Tasik Ria Minahasa. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 1(1): 30-38.

36. Hussain, H, Sopy, C.K, Harrasi, A.A, Rawahi, A.A, Abbas, G, Green, I.R, Schulz, B, Krohn, K, and A.Shah. 2014. Antimicrobial constituents from three endophytic fungi. *Asian Pac J Trop Med* 7 (Suppl 1) : S224-S227.
37. Katoch, M, Phull, S, Vaid, S, and S.Singh. 2017. Diversity, Phylogeny, anticancer and antimicrobial potential of fungal endophytes associated with *Monarda citriodora* L. *BMC Microbiology* : 17-44.
38. Widjajanti, H., Hanum, L., E.Nurnawati.2017. Isolation and screening endophytic fungi from *Bellucia pentamera* Naudin for their antibacterial activities (**Hary Widjajanti**, Munawar, Laila Hanum, Elisa Nurnawati, Dwitya Dewanti) The 9th International Seminar of Indonesian Society for Microbiology, 14-15 November 2017, Palembang, Indonesia
39. Wahlqvist, M.L. Antioxidant relevance to human health. *Asia Pac J Clin Nutr* 22 (2):171-176.
40. Yadaf, M, Yadaf, A, and J.P.Yadaf. 2014. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pac J Trop Med* 7S1:S256-S261.
41. Khiralla, A, Mohammed, I, Thomas, J, Mignard, B, Spina, R, and S Yagi. 2015.A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 8(9) : 701-704.
42. Nagda, V, Gajbhiye, A, and D.Kumar. 2017. Isolation and characterization of endophytic fungi from *Calotropis procera* for their antioxidant activity. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 10(3) : 254-258.
43. Elfita, Muharni, Munawar, dan Rizki. 2012b. Isolation of antioxidant compound from endophytic fungi *Acremonium* sp from the twigs of Kandis Gajah. *Makara Journal of Science* 16 (1) : 46-50.
44. Widjajanti, H., Hanum, L., E.Nurnawati.2018. Exploration of endophytic fungi producing antioxidant compounds from kardia (*Bellucia pentamera* Naudin) Sriwijaya International Conference On Basic And Applied Sciences (SICBAS), 6-7 November 2018, Palembang, Indonesia.
45. Enriquez, G.L, L.S.Saniel, R.R.Matias, G.I.Garibay. 1995. Laboratory Manual in General Microbiology. University of The Philippines Press.
46. Fatisa, Y.2013.Daya antibakteri ekstrak kulit dan biji buah pulsa terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara in vitro. *Jurnal Peternakan* (10) : 31-38.
47. Nuria.M.C, E.P. Astuti, dan Sumantri. 2010. Antibacterial activities of ethyl acetate fraction from sosor bebek leaves (*Kalanchoe pinnata* Pers). *Jurnal Mediagro* 6 (2) :51-61.
48. Choi, J.G., Kang, O.H., Lee, Y.S., Chae, H.S., Chang, Y., Brice, O.O., Kim, M.S., Sohn, D.H., Kim, H.S., Park, H., Shin, D.W., Rho, J.R., and Kwon, D.Y. 2011. In Vitro and In Vivo Antibacterial Activity of Punica granatum Peel Ethanol Extract against *Salmonella*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011 : 105-113.
49. Huys, G. 2002. Antibiotic Susceptibility Testing of Aquaculture-Associated Bacteria With the Disc Diffusion Method, Laboratory of Microbiology, Universiteit Gent, Belgium.
50. Harley, J.P., dan Prescott, L.M., 2002. Laboratory Exercises in Microbiology, 5th Edition. The McGraw-Hil Companies, USA.
51. 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.
52. Rusnaeni., Sinaga, D.I., dan Lanuru, F. 2016. Identifikasi Asam Mefenamamat dalam Jamu Rematik yang Beredar di Distrik Heram Kota Jayapura, Papua. *Jurnal Pharmacy*. 13(1): 84-91.

53. Salni., Marisa, H., dan Harmida. 2016. Uji Aktivitas Bahan Bioaktif dari Daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) terhadap Bakteri *Salmonella thypi* secara *In Vitro* dan *In Vivo*. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia, 14 (1): 13-18
54. Domsch, K.H., W, Gams & T.H, Anderson, 1980, Compendium of Soil Fungi, Academic Press, London.
55. Pitt, J, I, & A,D, Hocking, 1994, Fungi and Food Spoilage, Springer, New York.
56. Samson, R, A, Hoekstra E,S, & Prisvad J,C, 2004. Introduction to Food and Airborne Fungi, Seventh Edition, Centralbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands, 389 p.
57. Sambrook, J, Fritsch E, F, & Maniatis T, 1989. Molecular Cloning : a Laboratory Manual 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
58. White, T. J, Bruns T, Lee S, & Taylor J, 1990, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, Innis, M, A., D, H, Gelfand, J, J, Sninsky, & T, J, White (Eds.) Dalam : PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc, New York, Hal:315-322.