

**PENGARUH PENAMBAHAN EKSTRAK KHAMIR TERHADAP AKTIVITAS
ANTIBAKTERI ISOLAT FUNGI ENDOFIT GENUS PAECILOMYCES DARI KULIT
BUAH KAKAO
(*Theobroma cacao* L.)**

ASNURBAETY DWIYANA

ABSTRACT

A research about the effect of yeast extract addition on the antibacterial activity of endophytic fungi *Paecilomyces* genus from cacao pod husk (*Theobroma cacao* L.) has been conducted. The purpose of this research was to know the effect of adding yeast extract on the antibacterial activity produced by endophytic fungi of cacao pod husk. Isolate of endophytic fungi fermented in Potato Dextrose Broth (PDB) medium with the addition of yeast extract 0.25% w/v, 0.5% w/v, 1% w/v, 2% w/v, on a rotary shaker at 150 rpm for 7 days and then centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. The antibacterial activity of supernatant was determined by measuring the growth inhibition of pathogenic bacteria *Streptococcus mutans* with agar diffusion method using paper disc for 24 hours incubation. The inhibition zone of negative control and sample with the addition of yeast extract 0.25% w/v, 0.5% w/v, 1% w/v, 2% w/v to *S. mutans* were 7.2 mm, 7.3 mm, 7.7 mm, 8.0 mm, and 8.4 mm, respectively. These results indicated that yeast extract addition 1% w/v and 2% w/v have the most significantly influence toward antibacterial activity effect of endophytic fungi *Paecilomyces* genus.

PENDAHULUAN

Indonesia dikenal sebagai salah satu negara terbesar akan keanekaragaman hayatinya dan sangat potensial dalam mengembangkan obat herbal yang berbasis pada tanaman obat. Tanaman sebagai sumber bahan baku obat yang tak ternilai harganya, perlu terus menerus mendapat perhatian. Eksploitasi tanaman obat yang berlebihan tanpa memperhatikan upaya konservasinya tentu sangat mengkhawatirkan. Peran para ahli budidaya tanaman dan para ahli bioteknologi sangat penting untuk menghindari kelangkaan bahan baku obat herbal yang sampai saat ini masih diambil dari tanaman aslinya secara konvensional.

Pada umumnya untuk mengambil senyawa bioaktif secara langsung dari tanamannya dibutuhkan sangat banyak biomassa atau bagian dari tanamannya. Untuk mengefisienkan cara memperoleh senyawa bioaktif tersebut, maka digunakan mikroba endofit yang diperoleh dari bagian dalam tanaman

yang diharapkan mampu menghasilkan sejumlah senyawa bioaktif yang dibutuhkan tanpa harus mengekstrak dari tanamannya.

Mikroba endofit yang terdapat di berbagai jaringan tanaman merupakan organisme hidup yang berukuran mikroskopik (bakteri dan jamur) yang hidup di dalam jaringan tanaman, daun, akar, buah, dan batang. Mikroba ini hidup bersimbiosis saling menguntungkan dengan tanaman 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 inangnya ke dalam mikroba endofit.

Salah satu tanaman yang memiliki fungi endofit adalah tanaman coklat atau tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.), suku Sterculiaceae yang merupakan suatu jenis tanaman hutan hujan tropis. Tanaman kakao bersifat antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen

dan kariogenik, juga berkhasiat sebagai antioksidan, mencegah penyakit-penyakit degeneratif utamanya penyakit kardiovaskuler, kanker, dan antivirus. Selain manfaat di atas, fungi endofit yang terdapat dalam tanaman kakao berpotensi menghasilkan senyawa antimikroba.

Hasil penelitian Fatima N. I., diperoleh 4 isolat fungi endofit dalam kulit buah kakao dan 3 diantaranya memiliki efek antimikroba, yaitu spesies *Acremonium* sp., *Beauveria* sp., dan *Aspergillus* sp. Hasil penelitian Sartini, juga diperoleh isolat fungi endofit dari tanaman kakao yaitu genus *Paecilomyces* yang berpotensi sebagai antimikroba.

Pada proses fermentasi mikroorganisme, pemilihan medium yang tepat sangat penting terhadap kesuksesan industri fermentasi. Medium menyediakan nutrisi untuk pertumbuhan, energi, zat pembangun sel, dan substrat biosintesis produk fermentasi. Medium yang digunakan untuk menumbuhkan fungi mengandung sumber karbon (umumnya glukosa), sumber nitrogen (umumnya amonia atau nitrat terkadang asam amino), fosfat, sulfat, magnesium, potasium, dan unsur mikro seperti besi, mangan, zink, tembaga. Mikroba endofit di dalam medium fermentasi, umumnya dapat menghasilkan metabolit sekunder yang analog seperti tanaman inangnya dengan bantuan aktivitas suatu enzim.

Mikroba endofit dapat menghasilkan enzim, jika sumber nitrogen cukup tersedia di dalam media, sedangkan pada media yang digunakan yaitu Potato Dekstrosa Broth (PDB) tidak diperoleh sumber nitrogen, sehingga perlu penambahan sumber nitrogen dari luar antara lain dari ekstrak khamir. Ekstrak khamir mengandung asam amino, vitamin, peptida dan polipeptida.

Permasalahannya adalah apakah penambahan ekstrak khamir dalam media PDB dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri isolat fungi endofit genus

Paecilomyces dari tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak khamir terhadap aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh isolat fungi endofit genus *Paecilomyces* dari tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.).

ALAT DAN BAHAN

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf (All American Model 25x-2), cawan petri, enkas, inkubator (WTB Binder), jangka sorong, LAF (Laminar Air Flow) (Envirco), lemari pendingin, mikropipet (Nesco), oven (Meyert), shaker inkubator, sentrifuge (model DKC-1006T), tabung sentrifuge, timbangan analitik, tip.

Bahan-bahan yang digunakan adalah aquadest, amoxicilin, biakan *Streptococcus mutans*, ekstrak khamir, isolat kulit buah kakao genus *Paecilomyces* (Koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar), kertas cakram, medium Nutrien Agar (NA), Muller Hinton Agar (MHA), Potato Dekstrosa Agar (PDA), Potato Dekstrosa Broth (PDB).

Penyiapan Kultur Fungi Endofit

1. Peremajaan Fungi

Dibuat medium Potato Dekstrosa Agar (PDA) dalam bentuk agar miring. Kemudian fungi endofit yang telah didapatkan pada penelitian sebelumnya, diinokulasi pada media agar miring. Diinkubasi selama 3 x 24 jam pada suhu 25 °C.

2. Produksi Metabolit Sekunder dari Fungi Endofit

Dalam media Potato Dekstrosa Broth (PDB) ditambahkan ekstrak khamir dalam beberapa konsentrasi yaitu 0,25% b/v, 0,5% b/v, 1% b/v, 2% b/v, dan kontrol tanpa ekstrak khamir, lalu Isolat fungi endofit yang telah diremajakan, diinokulasi ke dalam media PDY (Potato Dekstrosa

Broth + ekstrak khamir) dan difermentasi pada shaker putar dengan kecepatan 150 rpm selama 7 hari. Hasil fermentasi disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Dipisahkan supernatan dan endapan berupa massa sel. Supernatan hasil fermentasi diteteskan ke atas kertas cakram sebanyak 20 µl, didiamkan hingga kering dan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri.

Uji Aktivitas Antibakteri

1. Penyiapan Bakteri Uji

Bakteri uji yang akan digunakan diremajakan dahulu dengan cara : 1 ose mikroba uji *Streptococcus mutans* digoreskan pada medium Nutrien Agar (NA), kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah masa inkubasi, bakteri uji dipanen dengan penambahan larutan NaCl fisiologis.

2. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Agar

Media uji yang digunakan adalah media Muller Hinton Agar (MHA) untuk uji Aktivitas antibakteri. Ke dalam media MHA diinokulasikan bakteri uji sebanyak 0,2 ml kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Supernatan dari hasil fermentasi dipipet sebanyak 20 µl diteteskan ke atas kertas cakram lalu dikeringkan dan diletakkan di atas media uji yang mengandung larutan uji. Kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37 °C. Zona hambatan yang terbentuk setelah masa inkubasi diukur diameternya.

Uji Kualitatif Metabolit Sekunder Dari Fungi Endofit

Supernatan dari hasil fermentasi yaitu kontrol tanpa ekstrak khamir dan penambahan ekstrak khamir serta ekstrak metanol kulit buah kakao, masing-masing diuji dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Sampel tersebut terlebih dahulu diuapkan, lalu dilarutkan dalam metanol, kemudian ditotolkan pada lempeng KLT *silika gel 60 F₂₅₄* dengan menggunakan pipa kapiler. Selanjutnya sampel dikromatografi di dalam wadah yang telah dijenuhkan dengan eluen metanol hingga mencapai batas lempeng KLT, angkat dan keringkan, kemudian diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, jika terlihat noda, noda tersebut diberi tanda dengan pensil dan dihitung nilai Rfnya, kemudian disemprot dengan berbagai pereaksi semprot seperti H₂SO₄, Lieberman Bouchard, FeCl₃, dan Sitroborat untuk mengetahui jenis senyawa yang dihasilkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penambahan ekstrak khamir diperoleh hasil fermentasi yang memiliki efek antibakteri terhadap mikroba uji yaitu :

Tabel 1. Hasil pengukuran diameter daerah hambat (aktivitas antibakteri) hasil fermentasi isolat fungi endofit genus *Paecilomyces* yang disertai penambahan ekstrak khamir terhadap *Streptococcus mutans*.

| Hasil Fermentasi | Diameter Daerah Hambat (mm) | |
|---|-------------------------------|-----------|
| | <i>Streptococcus mutans</i> . | |
| | Nilai | Rata-Rata |
| Tanpa penambahan ekstrak khamir | 7,0 | 7,2 |
| | 7,4 | |
| | 7,4 | |
| Penambahan ekstrak khamir sebanyak 0,25%b/v | 7,4 | 7,3 |
| | 7,1 | |
| | 7,5 | |
| Penambahan ekstrak khamir sebanyak 0,5%b/v | 7,6 | 7,7 |
| | 7,7 | |
| | 7,9 | |

| | | |
|---|-----|-----|
| Penambahan ekstrak khamir sebanyak 1% b/v | 7,9 | 8,0 |
| | 8,0 | |
| | 8,1 | |
| Penambahan ekstrak khamir sebanyak 2% b/v | 8,4 | 8,4 |
| | 8,5 | |
| | 8,4 | |

Sumber : Data Primer, 2016

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan pengujian tentang pengaruh penambahan ekstrak khamir terhadap aktivitas antibakteri isolat fungi endofit genus *Paecilomyces* dari kulit buah kakao terhadap bakteri uji *Streptococcus mutans*.

Isolat fungi endofit (gambar 1) terlebih dahulu diremajakan dan diinkubasi, kemudian difermentasi ke dalam medium PDB dengan penambahan ekstrak khamir yang berbeda-beda yaitu tanpa penambahan ekstrak khamir dan dengan penambahan ekstrak khamir sebanyak 0,25% b/v, 0,5% b/v, 1% b/v, dan 2% b/v. Hasil fermentasi (gambar 2) selanjutnya disentrifugasi dan diambil supernatannya untuk diuji analisis kualitatifnya dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) (gambar 3) dan diuji aktivitas antibakterinya dengan metode difusi kertas cakram menggunakan mikroba *S. mutans*.

Analisis kualitatif dengan cara KLT menggunakan pereaksi sempnot sitroborat memberikan hasil positif terhadap flavonoid yaitu terlihat noda yang lebih berpendar kuning di bawah sinar UV 366 nm dibandingkan saat noda dilihat di bawah sinar UV 366 nm sebelum disemprot dengan pereaksi sitroborat (gambar 4a dan 4b). Kulit buah kakao mengandung pigmen kakao (campuran dari flavonoid terpolimerasi atau terkondensasi meliputi antosianidin, katekin, leukoantosianidin).

Supernatan yang diuji aktivitas antibakterinya memberikan efek penghambatan terhadap *S. mutans* dan efek tersebut semakin meningkat sebanding dengan peningkatan konsentrasi ekstrak khamir yang ditambahkan (gambar 5). Hal ini

disebabkan ekstrak khamir yang digunakan merupakan sumber nitrogen yang mengandung asam amino, peptida, dan polipeptida hasil pecahan ikatan peptida secara enzimatis di dalam khamir, vitamin, dan sebagai sumber nutrisi di dalam medium mikrobiologi yang akan membantu pembentukan enzim dalam menghasilkan metabolit sekunder. Ekstrak khamir juga memiliki total nitrogen sebanyak 10,70 % dan amino nitrogen 5,40%.

Hasil uji aktivitas antibakteri menghasilkan diameter hambatan berturut-turut sebesar 7,2 mm, 7,3 mm, 7,7 mm, 8,0 mm, dan 8,4 mm. Adanya efek penghambatan diduga terjadi karena isolat fungi endofit yang berasal dari kulit buah kakao menghasilkan metabolit sekunder yang analog dengan tanaman inangnya berupa flavonoid. Flavonoid mempunyai aktivitas antibakteri karena kemampuannya membentuk kompleks dengan ekstraselular dan protein dari dinding sel bakteri. Salah satu flavonoid yang dikandung oleh kulit buah kakao yaitu katekin yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans*. Katekin akan menginaktifkan toksin kolera dan menghambat enzim glucosyltransferase dalam *S. mutans*.

Hasil analisis statistika dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) diperoleh F hitung sebesar 23,33. Karena F hitung lebih besar dari F tabel pada taraf 1%, maka terlihat perbedaan yang sangat signifikan dari penambahan ekstrak khamir terhadap diameter daerah hambat. Analisis lanjutan dengan menggunakan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) menunjukkan bahwa penambahan ekstrak khamir pada konsentrasi 0,5% b/v memiliki pengaruh signifikan terhadap aktivitas antibakteri dari isolat fungi endofit genus *Paecilomyces* sedangkan konsentrasi ekstrak khamir 1% b/v dan 2% b/v berpengaruh sangat signifikan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian dan analisis statistik yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa penambahan ekstrak khamir pada konsentrasi 0,5% b/v memiliki pengaruh signifikan terhadap aktivitas antibakteri dari isolat fungi endofit genus *Paecilomyces* sedangkan konsentrasi ekstrak khamir 1% b/v dan 2% b/v berpengaruh sangat signifikan. Oleh Karena itu, disarankan kepada peneliti selanjutnya mengenai variasi media dan kondisi fermentasi untuk memproduksi senyawa antibakteri dari isolat fungi endofit genus *Paecilomyces* dan mengenai aktivitas antibakteri dari massa sel hasil fermentasi isolat fungi endofit genus *Paecilomyces*.

DAFTAR RUJUKAN

- Azizah Nur. Uji Efek Antibakteri dari Ekstrak Aseton dan Etanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*). *Skripsi* Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Makassar. 2008. Hal 2.
- Brooks, G. F., Butel, S J., Morse, S. A. *Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan oleh Bagian Farmakologi FK-UNAIR. 2005. Penerbit Salemba Medika, Jakarta. 2001. Hal 8, 224
- Casida Jr. L. E. *Industrial Microbiology*. John wiley and sons.inc, New York. 1968. Hal 5, 7-8, 55, 100-113,117, 219.
- Campbell N. A. dkk. *Biologi*. Terjemahan oleh Prof. Dr. Ir. Wasmen Manalu. Penerbit Erlangga. Jakarta. 2000. Hal 185.
- Djide N. dan Sartini. *Mikrobiologi Farmasi Dasar*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi. Makassar. 1996. Hal 41-44.
- Difco Laboratories. *Difco manual* 11th edition. Divisin of Becton Dickinson and Company. Sparks, Maryland-USA. 1998.
- Djide N. dan Sartini. *Dasar-Dasar Bioteknologi Farmasi*. Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi. Makassar. 1996. Hal 303-304.
- Fatima N I. Skringing Awal Fungi Endofit Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) sebagai Penghasil Bahan Baku Antimikroba. *Skripsi* Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Makassar. 2008. Hal 2, 35.
- Fardiaz, S.. *Fisiologi Fermentasi*. Lembaga sumber daya informasi – IPB. Bogor. 1988. Hal 79, 105-107
- Fitrawan M. Isolasi Mikroba Endofitik Penghasil Antibiotika dari Akar Rumput Belulang (*Eleusine indica L.*). *Skripsi* Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia. Makassar. 2009. Hal 8.
- Ganiswara, G.S. *Farmakologi dan Terapi* edisi 4. FK-UI. Jakarta.1995. hal 571-573
- Harborne J. B. *Metode Fitokimia*. Penerbit ITB. Bandung. 1987. Hal 76
- Mutchler, E.. *Dinamika Obat*. Ed. 4. Penerbit ITB. Bandung. 1991. Hal 634-635.
- Sartini dan Natsir Hasnah. Seleksi Fungi Endofit dari Kulit Buah Kakao sebagai Penghasil Enzim Polifenol Oksidase. Laporan Penelitian Fundamental. Lembaga Peneltian Unhas. 2009.
- Simarmata R. Lekatompessy S. Sukiman H. Isolasi Mikroba Endofitik dari Tanaman Obat Sambung Nyawa (*Gynura procumbens*) dan Analisis Potensinya sebagai Antimikroba. LIPI Cibinong. Bogor. 2005. Hal 85.
- Sunanto H. *Cokelat Budidaya*, Pengolahan Hasil dan Aspek Ekonominya. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 1992. Hal 13-15.
- Pelczar, M.J., dan Chan, E.C.S. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. jilid 2. diterjemahkan oleh Hadioetomo R.S.. Universitas Indonesia Press. Jakarta.1988.
- Sugijanto N. E., dkk. Isolasi dan Determinasi berbagai Jamur

- Endofit dari Tanaman *Aglaia elliptica*, *Aglaia eusideroxylon*, *Aglaia odorata*, dan *Aglaia odoratissima*. *Jurnal Penelitian Medika Eksakta* vol. 5 no. 2 Agustus 2004. Hal 136-139.
- Strobel, G. Daisy, B, Castillo, U. Natural Products from Endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. 2004. Vol. 67 no. 2
- Steenis, van C.G.G.J. *Flora*. PT. Praditya Paramita. Jakarta. 2005. Hal 196.
- Syarmalina & Adeng F H. Endofit dan Pelestarian Alam. [serial on the internet] 2008 [dikutip 15 januari 2010]. Available from : <http://www.isfinal.or.id/>
- Radji M. Peranan Bioteknologi dan Mikrobiologi Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Desember 2005. Vol II. No.3. Hal 113.
- Rodiah binti M.H. Pengekstrakan dan Sifat-Sifat Ekstrak Yis daripada *Candida utilis*. Universitas Sains Malaysia. 2007. Hal 20.
- Rubini M. R. Silva-Riberio R. T. *Diversity of Endophytic Fungal Community of Cacao (Theobroma cacao L.) and Biological Control of Crinipellis Perniciosa, Causal Agent of Witches Broom Disease*. *International J. of Biological Science*. 2005. Hal 1, 24-33.
- Turner, W. B. *Fungal Metabolites*. Academic Press. London and New York. 1971. Hal 16-18.
- Tjitrosoepomo, G. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 2004. Hal 178.
- Tropical Data Base. *Chocolate (Theobroma cacao L.)*, Raintree Nutrition, inc. Carson City. 1996.
- Worang, R.L. Fungi Endofit Sebagai Penghasil Antibiotika. *Makalah Individu*, Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 2003. hal. 2