

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK FUNGI  
ENDOFIT DAN EKSTRAK DAUN DARI  
*Chromolaena odorata* TERHADAP BAKTERI  
*Shigella dysenteriae***

**SKRIPSI**



**OLEH:  
KHOIRUN NISA  
H01214004**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
JURUSAN SAINS  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL**

**SURABAYA  
2018**

## PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Khoirun Nisa  
NIM : H01214004  
Program Studi : Biologi  
Angkatan : 2014

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul: Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Fungi Endofit dan Daun dari *Chromolaena odorata* terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae* Apabila suatu saat nanti terbukti saya melakukan tindakan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang telah ditetapkan. Demikian pernyataan keaslian ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 19 Juli 2018  
Yang membuat pernyataan

  
Khoirun Nisa  
H01214004

## PERSETUJUAN PEMBIMBING

Setelah memeriksa dan memberikan arahan terhadap skripsi yang ditulis oleh:

Nama : Khoirun Nisa

NIM : H01214004

Program Studi : Biologi

yang berjudul: **“UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK FUNGI ENDOFIT DAN DAUN DARI *Chromolaena odorata* TERHADAP *Shigella dysenteriae*”**, tim berpendapat bahwa skripsi tersebut dapat diajukan untuk disidangkan

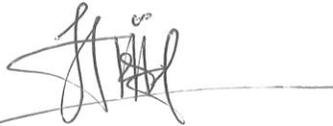
Pembimbing I

  
Misbakhul Munir, S.Si, M.Kes.

NIP. 19810722014031002

Surabaya, Juli 2018

Pembimbing II

  
Dr. Moch. Irfan Hadi, M.KL

NIP. 198604242014031003

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK FUNGI ENDOFIT  
DAN EKSTRAK DAUN DARI *Chromolaena odorata* TERHADAP  
BAKTERI *Shigella dysenteriae***

**Disusun oleh  
Khoirun Nisa  
H01214004**

**Telah dipertahakan di depan Dewan Penguji  
Pada tanggal 19 Juli 2018  
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat  
untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains (S.Si)**

**Susunan Dewan Penguji**

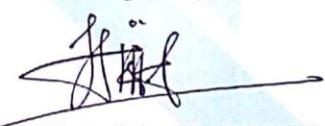
Surabaya, .....2018  
Pembimbing (Penguji) I

  
Misbakhul Munir, S. Si, M.Kes.  
NIP. 19810722014031002

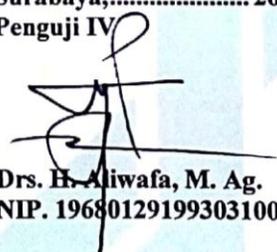
Surabaya, .....2018  
Penguji III

  
Estri Kusumawati, M.Kes.  
NIP. 198708042014032003

Surabaya, ..... 2018  
Pembimbing (Penguji) II

  
Dr. Moch. Irfan Hadi, M. KL.  
NIP. 198604242014031003

Surabaya, ..... 2018  
Penguji IV

  
Drs. H. Aliwafa, M. Ag.  
NIP. 196801291993031002

**Mengetahui  
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN  
Sunan Ampel Surabaya**

  
  
Dr. Eni Purwati, M. Ag.  
NIP. 196512211990022001



KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SUNAN AMPEL SURABAYA  
PERPUSTAKAAN

Jl. Jend. A. Yani 117 Surabaya 60237 Telp. 031-8431972 Fax.031-8413300  
E-Mail: perpus@uinsby.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika UIN Sunan Ampel Surabaya, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : KHOIRUN NISA  
NIM : H01214004  
Fakultas/Jurusan : SAINS DAN TEKNOLOGI / BIOLOGI  
E-mail address : zahraangel89@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah :

Skripsi  Tesis  Desertasi  Lain-lain (.....)  
yang berjudul :

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK FUNGI ENDOFIT DAN EKSTRAK DAUN  
DARI *Chromolaena odorata* TERHADAP BAKTERI *Shigella dysenteriae*

beserta perangkat yang diperlukan (bila ada). Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya berhak menyimpan, mengalih-media/format-kan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (database), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di Internet atau media lain secara **fulltext** untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan UIN Sunan Ampel Surabaya, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini yang saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 03 Agustus 2018

Penulis

(Khoirun Nisa)

















dan berkepanjangan dibandingkan dengan ketiga spesies yang lain (Dwidjoseputro, 2005).

*Shigella dysenteriae* adalah bakteri yang berbentuk basil, fakultatif anaerob, tidak memiliki spora dan termasuk bakteri gram negatif. Habitat alami bakteri *Shigella dysenteriae* terbatas pada saluran cerna manusia dan hewan menyusui (Brooks, *et al.*, 2005; Ervia 2012). *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit disentri dan mengakibatkan diare berat disertai darah, lendir dan nanah pada feses (Brooks, *et al.*, 2005). Insiden diare ditandai dengan gangguan buang air besar (BAB) lebih dari tiga kali sehari dengan konsistensi tinja cair, yang dapat disertai dengan keluarnya darah dan lendir. Diare dapat ditularkan melalui makanan, air, dan penularan lainnya (Kemenkes RI, 2013; WHO, 2013).

Diare merupakan salah satu penyakit yang menyebabkan kematian utama bagi anak-anak yang berusia dibawah lima tahun sebanyak 31,4% di Indonesia (Kemenkes RI, 2015). Kematian anak-anak balita yang disebabkan oleh diare terhitung 8% diseluruh dunia pada tahun 2016, yang berarti lebih dari 1300 anak-anak meninggal setiap hari atau sekitar 480.000 anak pertahun (UNICEF, 2018). Berdasarkan pada Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2013, balita di Indonesia menderita diare dengan persentase 6,7% yang rata-rata terjadi pada kelompok umur 12-23 bulan dan tinggal di pedesaan.

Resistensi bakteri terhadap antibiotik yang semakin meningkat, mendorong para peneliti untuk menemukan antibiotik-antibiotik baru melalui sintesis senyawa murni dari bahan alam atau tanaman obat untuk mengobati

penyakit infeksi. Salah satu tumbuhan yang memiliki banyak manfaat dibidang kesehatan dan telah diteliti oleh banyak peneliti sebagai antibiotik adalah *Chromolaena odorata*.

Tumbuhan *C. odorata*, dalam bahasa Indonesia dikenal dengan nama tekelan atau kirinyuh, merupakan tanaman liar atau gulma yang sangat merugikan bagi tanaman yang hidup disekitarnya. Sifat merugikan ini dikarenakan *C. odorata* adalah kompetitor dalam penyerapan air dan unsur hara. *C. odorata* sudah lama tersebar di Indonesia sejak tahun 1910 (Sipayung *et al.* 1991). Secara ekologi, *C. odorata* dianggap sebagai tumbuhan pengganggu karena tumbuh seperti rumput, bahkan pada lingkungan yang kritis sekalipun tumbuhan ini masih sangat subur untuk berkembang (Grainge dan Ahmed, 2008).

*C. odorata* merupakan kompetitor agresif yang menempati berbagai jenis lahan, dimana gulma ini membentuk jalinan padat yang mencegah tumbuhnya flora lain. Hal ini merupakan salah satu ancaman bagi perkebunan dan ekosistem lainnya, karena *C. odorata* memiliki potensi *allelopathic* dan inhibitor bagi pertumbuhan tanaman lain yang ada disekitarnya (Ambika dan Jayachandra, 1980). *C. odorata* beracun bagi hewan ternak karena memiliki kadar nitrat yang sangat tinggi (5 sampai 6 kali tingkat toksik) pada daun dan tunas muda sehingga akan menyebabkan kematian bagi hewan ternak (Sajise *et al.*, 1974).

Terlepas dari sisi negatifnya, *C. odorata* memiliki potensi dalam bidang pengobatan tradisional seperti ramuan daun yang digunakan untuk

mengobati batuk, obat malaria jika diramu dengan daun serai dan jambu, sebagai obat luka untuk menghentikan pendarahan dengan cara menghaluskan daunnya, juga dapat digunakan pula sebagai obat lain seperti diare, antiinflamasi, antispasmodic, antihipertensif, dan diuretik (Iwu, 1993). Rebusan bunganya dapat digunakan sebagai tonik antipiuretik dan tonik jantung (Bunyapraphatsara dan Chokeyjaroenporn, 2000).

Penyebab *C. odorata* dapat tumbuh subur pada berbagai kondisi lingkungan yang ekstrim dipengaruhi faktor biotik dan abiotik. Faktor biotik yang menjadi salah satu alasan adalah adanya keberadaan agens hayati pada ekosistem tanaman tersebut (Mirsam *et al.*, 2015). Agens hayati memiliki berbagai macam manfaat, salah satunya dapat mengendalikan aktifitas mikroba patogen yang merugikan bagi makhluk hidup lain (Arwiyanto, 2003). Agen hayati meliputi organisme dan substansi yang dihasilkan untuk digunakan sebagai pengendali organisme pengganggu yang merugikan (Marwoto, 2001).

Salah satu agen hayati yang sangat dikembangkan saat ini adalah mikroba endofit. Mikroba endofit merupakan mikroba yang hidup didalam jaringan tanaman tanpa merugikan dan tidak menunjukkan gejala apapun pada tanaman inangnya (Durham, 2004). Potensi mikroba endofit cukup besar karena mikroba hidup langsung didalam jaringan tanaman sehingga secara tidak langsung dapat berperan dalam menghambat perkembangan patogen dan meningkatkan pertumbuhan tanaman (Niere, 2002 dan Weni *et al.*, 2011).

Mikroba endofit ada pada berbagai jenis jaringan tanaman, berada secara tersembunyi diruang interselular, di dalam jaringan vaskular atau di dalam sel (Ulrich *et al.*, 2008). Menurut penelitian, isolat mikroba endofit diketahui memberi efek menguntungkan bagi tanaman inangnya seperti mencegah perkembangan penyakit dengan mensintesis senyawa baru dan metabolit antijamur (Strobel *et al.*, 2004). Senyawa baru itu adalah metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroba endofit. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroba endofit diduga sebagai akibat adanya transfer genetik dari tanaman inang kedalam mikroba endofit (Tan RX, *et al.*, 2001). Senyawa metabolit yang dihasilkan oleh mikroba endofit memiliki banyak fungsi yang menguntungkan terutama bagi kesehatan manusia diantaranya, berfungsi sebagai antibiotik, antivirus, antikanker, antidiabetes, antimalaria, antioksidan, antiimunisupresif (Strobel dan Daisy, 2003), antiserangga (Azevedo *et al.*, 2000), zat pengatur tumbuh (Tan dan Zou, 2001), dan penghasil enzim-enzim hidrolitik seperti amilase, selulase, xilanase, liginase (Choi *et al.*, 2005), kitinase (Zinniel *et al.*, 2002).

Telah banyak penelitian yang dilakukan sebelumnya untuk mengetahui kandungan dan manfaat metabolit sekunder yang dihasilkan oleh fungi endofit. Jenis senyawa yang dihasilkan oleh berbagai spesies mikroba endofit meliputi alkaloid, flavonoid, fenol, peptid, quinines, steroid, dan terpenoid (Yu *et al.*, 2010). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Apori, *et al.*, (2000) menyatakan bahwa *C. odorata* mengandung beberapa komposisi

senyawa kimia meliputi asam aspartat, treonin, serin, asam glutamat, glisin, alanin, valin, isoleusin, tirosin, histidin, arginin, prolin, sistein, dan metionin.

*C. odorata* memiliki banyak keunggulan dibalik sifatnya yang sangat antagonis terhadap tanaman lain. Mengandung berbagai macam senyawa kimia yang dapat dimanfaatkan oleh manusia dalam bidang kesehatan. Namun faktanya, penelitian tentang adanya agen hayati pada *C. odorata* belum banyak diketahui sampai saat ini, oleh karena itu penting sekali dilakukan kajian tentang adanya mikroba endofit yang berperan dalam meningkatkan kemampuan *C. odorata* dalam pertumbuhan dan berkembangbiak pada berbagai kondisi lahan (Mirsam, *et al.*, 2015).

Pada penelitian-penelitian sebelumnya, seperti yang dilakukan oleh Naido *et al.*, (2011), bahwa ekstrak methanol daun *C. odorata* dapat menghambat aktivitas beberapa bakteri diantaranya adalah *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus. Epidermis* dan *Escherichia coli*. Dalam penelitian Hasnawati dan Erna Parwita (2010) juga menjelaskan bahwa ekstrak daun *C. odorata* dapat menghambat aktivitas bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. Sehingga dapat dipastikan bahwa *C. odorata* memiliki potensi sebagai antibiotik, namun penelitian mengenai fungi endofit yang ada pada gulma ini masih belum banyak diketahui.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Mirsam, *et al.* (2015) mengenai cendawan endofit adalah untuk menguji kemampuan aktivitas antagonis fungi endofit terhadap fungi patogen dan kemampuannya dalam

memacu pertumbuhan tanaman bawang merah. Berdasarkan pada penelitian sebelumnya dan latar belakang tersebut, penting bagi penulis untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder dan aktivitas antibiotik yang dihasilkan oleh fungi endofit yang diisolasi dari daun *C. odorata* terhadap bakteri patogen.

Saat ini, senyawa antimikroba baru sangat dibutuhkan karena adanya kasus resistensi pada berbagai bakteri patogen terhadap antibiotik (Strobel *et al.*, 2005). Pada dekade terakhir ini telah dikembangkan pemanfaatan mikroba endofit sebagai sumber obat, sebagaimana perannya dalam menghasilkan senyawa metabolit sekunder dengan berbagai aktivitas biologis salah satunya sebagai antibiotik (Rusman, 2006; Iwu, 1993). Endofit merupakan sumber produk yang bernilai ekonomis tinggi dari mikroba yang dapat diproduksi secara lebih mudah dan ekonomis (Strobel dan Daisy, 2003).

Dari latar belakang tersebut penulis ingin melakukan penelitian tentang uji aktivitas antimikroba ekstrak fungi endofit dan ekstrak daun *C. odorata* terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*. Dengan melihat fakta bahwa gulma *C. odorata* memiliki banyak manfaat dibidang pengobatan, maka penulis ingin mengetahui peranan fungi endofit yang diisolasi dari *C. odorata* terhadap bakteri patogen pada manusia yaitu *Shigella dysenteriae*. Selain itu, identifikasi fungi endofit secara konvensional dilakukan dengan pengamatan morfologi yang selanjutnya dibandingkan dengan deskripsi literatur.









diujung setiap cabang dan mencolok saat mekar. Berbunga dimusim dingin pada awal musim kemarau. Produksi benih sangat produktif dan persebaran benihnya dibantu oleh angin.

### 3. Kandungan Kimia dan Khasiat

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Apori *et al.*, (2000) mengungkapkan bahwa daun *C. odorata* memiliki komposisi kimia diantaranya adalah protein kasar, *ash*, lemak, *neutral-detergent fibre*, *acid-detergen lignin*, fenolat, tanin, nitrogen, asam aspartat, *threonin*, *serine*, asam glutamat, glisin, *valine*, isoleusin, leusin, tirosin, fenilalanin, lisin, histidin, arginin, prolin, sistein, dan metionin.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Akinmoladun *et al.*, (2007), mengenai kandungan fitokimia yang ada pada ekstrak daun *C. Odorata*. Hasil uji fitokimian membuktikan bahwa *C. Odorata* mengandung alkaloid, saponin, tanin, *phlobatannins*, *anthraquinones*, steroid, terpenoid, flavonoid dan *cardiac glycosides* (*with steroidal ring* dan *with deoxy - sugar*).

Dalam pengobatan tradisonal, ramuan daun *C. odorata* digunakan sebagai obat batuk, dan sebagai obat malaria jika diramu dengan serai dan daun jambu, digunakan sebagai obat luka untuk menghentikan pendarahan dengan cara menghaluskan daun *C. odorata*, dan berkhasiat sebagai obat lain seperti anti diare, *astringent*, *antispasmodic*, *antihypertensive*, antiinflamasi, dan diuretic (Iwu, 1993). Rebusan bunga

digunakan sebagai tonik, *antypiretic* dan tonik jantung (Bunyapraphastara dan Chokeychairoenporn, 2000), daun dan batang *C. odorata* mengandung minyak atsiri (Chowdhury, 2002).

*C. odorata* juga digunakan sebagai pupuk hijau untuk meningkatkan kesuburan tanah karena memiliki produksi biomassa yang tinggi (15 ton DM ha<sup>-1</sup>) (Oyen, 1995). Dalam keadaan alami hewan cenderung tidak mau memakan daun *C. odorata*, karena kemungkinan disebabkan oleh baunya yang sangat kuat dan bersifat racun karena memiliki kadar nitrat yang sangat tinggi (Sajise *et al.*, 1974; Apori *et al.*, 2000).

#### 4. Distribusi

Menurut Mc Fadyen (1989) *C. odorata* merupakan spesies yang berasal dari Amerika Tengah dan Selatan, dan mulai tersebar ke Asia sebelum tahun 1870. Penyebarannya melalui Kebun Raya Serampore di Calcutta. Dari Calcutta gulma tersebut tersebar ke timur, ke Assam dan Myanmar (Burma), dan kemudian semakin ke timur dan Tenggara melalui Indonesia dan Indochina.

*C. odorata* diidentifikasi sebagai ancaman gulma terbesar bagi Australia Utara, karena penyebarannya yang cepat dan memiliki potensi untuk merusak pertanian dan lingkungan (Michael, 1989). Dalam beberapa dekade terakhir, telah menjadi hama yang serius di daerah tropis yang lembab di Asia Tenggara, Afrika, dan kepulauan Pasifik. *C. odorata*



Fungi endofit menghasilkan berbagai senyawa yang memiliki aktivitas biologi, diantaranya alkaloid, terpenoid, fenolik, dan sebagainya (Tan dan Zou, 2001). Senyawa yang dihasilkan oleh fungi endofit seringkali memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan aktivitas senyawa dari tumbuhan inangnya (Prihatiningtias, 2005). Fungi endofit mendapatkan nutrisi dari hasil metabolisme tumbuhan dan memproteksi tanaman melawan herbivora, serangga, atau jaringan yang patogen sedangkan tanaman mendapatkan derivat nutrisi dan senyawa aktif yang diperlukan selama hidupnya (Tanaka, *et.al.*, 1999).

Fungi endofit yang hidup didalam jaringan tumbuhan membentuk koloni tanpa membahayakan inangnya. Fungi endofit yang terdapat dalam tumbuhan memacu perkecambahan, untuk bertahan dalam kondisi yang kurang menguntungkan, mempercepat pertumbuhan, ketahanan terhadap patogen lemah, dan beberapa kasus yang dapat meningkatkan ketahanan tanaman terhadap tekanan lingkungan. Kemampuan fungi endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya yang merupakan peluang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya (Radji, 2005; Syarmalina, 2008; Nugroho, 2004).

Penggunaan mikroba antagonis seperti fungi endofit dapat dilakukan untuk pengendalian penyakit yang efektif dan ramah lingkungan. Peranan endofit sebagai agensia hayati mulai banyak diteliti

sejak diketahui adanya fenomena mengenai kemampuan tanaman dalam menghadapi stres biotik maupun abiotik terkait dengan keberadaan endofit di dalam jaringannya (Liani, 2015).

Ditinjau dari sisi taksonomi dan ekologi, fungi endofit merupakan organisme yang sangat heterogen. Petrini *et al.*, (1992) menggolongkan fungi endofit dalam kelompok Ascomycota dan Deuteromycota. Fungi endofit yang hidup didalam jaringan inang mampu melindungi inang dari beberapa patogen virulen diantaranya *Acremonium coenophialum*. Berbagai senyawa antibiotik yang sangat bermanfaat dapat dihasilkan oleh fungi endofit, seperti siklosporin oleh *Acremonium luzulae*, dan senyawa taxol oleh *Taxomyces andreanae*.

## 2. Fase Pertumbuhan Fungi

Menurut Gandjar (2006), pertumbuhan fungi adalah penambahan volume sel, karena adanya penambahan protoplasma dan senyawa asam nukleat yang melibatkan sintesis DNA dan pembelahan mitosis. Untuk dapat mengetahui fase pertumbuhan mikroorganisme dapat dijadikan suatu kurva pertumbuhan. Diantara lain fase kurva pertumbuhan:

- a. Fase lag, merupakan fase penyesuaian sel-sel dengan lingkungan, pembentukan enzim-enzim untuk mengurangi substrat.
- b. Fase akselerasi, merupakan fase mulainya sel-sel membelah dan fase lag menjadi fase aktif.

- c. Fase eksponensial, merupakan fase perbanyak jumlah sel yang sangat banyak, aktivitas sel meningkat, dan merupakan fase yang terpenting dalam siklus hidup fungi.
- d. Fase deselari, merupakan fase dimana sel-sel mengalami penurunan pembelahan.
- e. Fase stasioner, yaitu fase dimana jumlah yang bertambah seimbang dengan jumlah sel yang mati. Kurva pada fase ini berbentuk garis horizontal yang lurus.
- f. Fase kematian dipercepat, merupakan jumlah sel-sel yang mati atau sel-sel yang tidak aktif bergerak lebih banyak daripada sel yang masih hidup.

### **3. Mekanisme Kerja Fungi Endofit**

Asosiasi fungi endofit dengan tumbuhan inangnya, oleh Carrol (1988) digolongkan dalam dua kelompok, yaitu mutualisme konstitutif dan induktif. Mutualisme konstitutif merupakan asosiasi yang erat antara fungi dengan tumbuhan terutama rumput-rumputan. Pada kelompok ini fungi endofit menginfeksi ovula (benih) inang, dan penyebarannya melalui benih serta organ penyerbukan inang. Mutualisme induktif adalah asosiasi antara fungi dengan tumbuhan inang, yang penyebarannya terjadi secara bebas melalui air dan udara. Jenis ini hanya menginfeksi bagian vegetatif inang dan seringkali berada dalam keadaan metabolisme inaktif pada periode yang cukup lama.

Salah satu sifat mikroba antagonis adalah pertumbuhannya lebih cepat dibanding dengan patogen dan menghasilkan senyawa antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan patogen. Fungi endofit menghasilkan alkaloid dan mikotoksin sehingga memungkinkan digunakan untuk meningkatkan ketahanan tanaman terhadap penyakit. Fungi endofit membentuk kait di sekitar hifa patogen sebelum penetrasi, atau kadang-kadang masuk langsung (Kloepper dan Ryu 2006). Menurut Hajek, (2004) mekanisme kerja senyawa antimikroba dalam melawan mikroorganisme patogen dengan cara merusak dinding sel, mengganggu metabolisme sel mikroba, menghambat sintesis sel mikroba, mengganggu permeabilitas membran sel mikroba, menghambat sintesis protein dan asam nukleat sel mikroba.

Simbiosis endofit dengan tanaman mampu memicu inang mengaktifkan sistem pertahanannya dengan menghasilkan senyawa oksigen reaktif untuk mengoksidasi atau denaturasi membran sel inang, sehingga akan meningkatkan ketahanannya terhadap tekanan lingkungan. Endofit juga merupakan mikroorganisme yang banyak menghasilkan berbagai macam antioksidan, asam fenol, dan derivatnya, simbiosis tanaman dengan endofit meningkatkan adaptasi terhadap lingkungan yang kurang menguntungkan (Yulianti, 2012; Petrini, *et al.*, 1992).

Mekanisme endofit dalam melindungi tanaman terhadap serangan patogen atau serangga yaitu dengan penghambatan pertumbuhan patogen secara langsung melalui senyawa antibiotik dan enzim litik yang

dihasilkan. Penghambatan secara tidak langsung melalui perangsangan endofit terhadap tanaman dalam pembentukan metabolit sekunder seperti asam salisilat dan etilen yang berfungsi dalam pertahanan tanaman terhadap serangan patogen. Perangsangan pertumbuhan tanaman sehingga lebih kebal dan tahan terhadap serangan patogen. Dan kolonisasi jaringan tanaman sehingga patogen sulit penetrasi (Yulianti, 2012). Menurut Kloepper dan Ryu (2006) fenomena ini disebut sebagai pengendali hayati.

Mekanisme yang mempengaruhi fungsi endofit sebagai pengendali hayati dikarenakan metabolit organisme yang mempengaruhi tanaman inang dalam meningkatkan ketahanan tanaman terhadap patogen, yang disebut *induce system resistance* (ISR). Selain itu, ketahanan juga bisa didapatkan dari tanaman itu sendiri karena adanya serangan dari patogen yang disebut *systemicacquired resistance* (SAR). Maka dari itu, ISR dipicu oleh organisme nonpatogen, sedangkan SAR dipicu oleh patogen atau kandungan kimia yang dihasilkan dari patogen (Kloepper dan Ryu, 2006).

#### **4. Metabolit Sekunder Fungi Endofit**

Pentingnya fungi sebagai sumber senyawa bioaktif, pertama kali ditemukan penisilin dari *Penicilium notatum* oleh Alexander Fleming tahun. Sejak saat itu penemuan produk alami dari fungi mendapat banyak perhatian setelah diketahui bahwa fungi dapat menghasilkan produk dengan skala besar (Waites, *et al.*, 2001). Dan fungi endofit yang

berasosiasi dengan tumbuhan adalah salah satu mikroorganisme yang menghasilkan metabolit sekunder biologis aktif yang baru (Aly, *et al.*, 2010; Debbabetal, 2010).

Mikroorganisme endofit mampu mengeluarkan suatu metabolit sekunder yang merupakan senyawa yang disintesis oleh suatu mikroba, tidak untuk memenuhi kebutuhan primernya melainkan untuk mempertahankan eksistensinya dalam berinteraksi dengan lingkungannya (Purwanto, 2000). Fungi endofit merupakan mikroorganisme yang kaya akan metabolit sekunder bioaktif. Fungi endofit yang hidup pada jaringan tanaman yang sehat akan menghasilkan enzim dan metabolit sekunder yang sangat bermanfaat bagi fisiologi dan ekologi tumbuhan inang (Tan dan Zou, 2001 dan Zhang *et al.*, 2006).

Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh fungi endofit sangat bervariasi baik dari struktur dan fungsinya, diantaranya alkaloid, flavonoid, kuinon, terpenoid, antrakuinon, fenil propanoid, turunan isokumarin, peptida, dan senyawa lafatik (Agusta, 2009). Selain menghasilkan senyawa-senyawa metabolit, fungi endofit juga mampu menghasilkan senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antimikroba (Strobel dan Daisy, 2003; Agusta *et al.*, 2006; Castillo Iet alI., 2007), antikanker (Kumala, 2005), antiserangga (Azevedo *et al.*, 2000), zat pengatur tumbuh (Tan dan Zou 2001), dan penghasil enzim hidrolitik (Choi *et al.*, 2005). Potensi biologis dari jamur endofit lainnya ialah sebagai antiimunopresif (Lee *et al.* 1995), anti-HIV, antioksidan

(Strobel *et al.* 2002), antivirus (Guo *et al.* 2000), antidiabetes (Zhang *et al.* 1999, Strobel & Daisy 2003), anti-HS V-1, antituberkular (Agusta 2009), dan antimalaria (Lu *et al.* 2000; Simanjuntak *et al.* 2002; Castillo *et al.*, 2003).

### C. Isolasi Fungi Endofit

Isolasi adalah cara untuk memisahkan suatu mikroorganisme dari lingkungannya, sehingga diperoleh biakan yang sudah tidak tercampur biakan lain atau disebut sebagai biakan murni (Gandjar *et al.*, 1992). Sebelum dilakukan isolasi, ada beberapa perlakuan yang dilakukan untuk menghindari kontaminasi dari mikroorganisme yang tidak diinginkan. Hal yang pertama kali dilakukan adalah sterilisasi permukaan bahan yang berasal dari organ tumbuhan yang masih dalam keadaan segar atau yang disebut dengan metode *surface sterilization* (Ando *et al.*, 2003; Agusta, 2009). Tujuan dari metode ini adalah untuk menghilangkan mikroorganisme epifit yang ada dipermukaan tumbuhan, sehingga pada saat isolasi fungi endofit koloni yang diperoleh hanya berasal dari dalam jaringan tumbuhan (Larran, *et al.*, 2001).

Sterilisasi permukaan bahan tumbuhan dilakukan dengan menggunakan alkohol dan hipoklorit sebagai desinfektan (Ando *et al.*, 2003). Desinfektan merupakan senyawa kimia yang digunakan untuk mengurangi mikroorganisme patogen termasuk spora bakteri pada permukaan suatu objek (Rao, 2008). Namun, dalam metode ini desinfektan digunakan untuk menghilangkan mikroorganisme yang ada dipermukaan bahan pada

tumbuhan (Larran *et al.*, 2001). Bahan yang digunakan untuk sterilisasi permukaan adalah alkohol dan hipoklorit yang memiliki fungsi yang berbeda dalam mekanismenya. Alkohol bekerja dengan merusak lapisan membran sel mikroorganisme (Rao, 2008), alkohol juga dapat melarutkan lipid dan mendenaturasi protein yang didalam membran sel, sehingga fungsi membran sel terganggu dalam mengatur transportasi cairan kedalam dan keluar sel dan menyebabkan mikroorganisme menjadi lisis (McDonnel dan Russell, 2999).

Natrium hipoklorit merupakan senyawa klorin (Rao, 2008) yang diketahui berfungsi menghambat pertumbuhan sel mikroorganisme dengan mekanisme kerja yang berbeda dengan alkohol (Valera *et al.*, 2009). Dikarenakan alkohol memiliki spektrum kerja yang relatif sempit sehingga dikombinasikan dengan natrium hipoklorit (Agusta, 2009). Senyawa klorin dapat mengganggu proses oksidasi dari enzim-enzim penting didalam sel sehingga metabolisme sel mikroorganisme terganggu dan tidak dapat tumbuh (Valera *et al.*, 2009).

Untuk mendapatkan fungi endofit yang murni, maka proses isolasi disertai dengan purifikasi (Cappucino dan Sherman, 1996). Dengan menggunakan teknik *quadrant streak* menggunakan jarum inokulasi untuk membantu persebaran sel-sel mikroorganisme. Cara untuk melakukan purifikasi ini adalah dengan menggoreskan ujung jarum inokulasi pada medium, dan proses ini kemudian diikuti dengan inkubasi pada kondisi yang sesuai hingga diperoleh koloni yang presentatif. (Hogg, 2005).

#### D. Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Ditjen POM, 2000).

Ekstraksi adalah peristiwa pemindahan zat terlarut (*solute*) antara dua pelarut yang tidak saling bercampur dengan tujuan untuk memperoleh ekstrak murni (Achmadi, 1992). Menurut Harborne (1987), ekstraksi merupakan proses penarikan komponen atau zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Proses ekstraksi bertujuan untuk mendapatkan bagian-bagian tertentu dari bahan yang mengandung komponen-komponen aktif.

Terdapat dua jenis ekstraksi yang dikenal yaitu dengan menggunakan panas dan tanpa pemanasan. Pembagian jenis ekstraksi dapat juga dilakukan menurut pelarut yang digunakan. Pada pembagian ini, ekstraksi dibagi menjadi ekstraksi tunggal dan ekstraksi bertingkat. Ekstraksi tunggal adalah teknik ekstraksi pada bahan secara langsung menggunakan satu jenis pelarut, sedangkan ekstraksi bertingkat adalah ekstraksi dengan beberapa pelarut organik yang tingkat kepolarannya berbeda-beda (Malthaputri, 2007).

Prinsip ekstraksi menggunakan pelarut organik adalah bahan yang akan diekstrak dikontakkan dengan pelarut selama selang waktu tertentu, sehingga komponen yang akan diekstrak akan terlarut dalam pelarut. Kelebihan dari ekstraksi menggunakan pelarut organik adalah mendapatkan senyawa yang lebih terkonsentrasi dan memiliki aroma yang hampir sama dengan bahan alami awal (Malthaputri, 2007).

Jenis dan mutu pelarut yang digunakan menentukan keberhasilan proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan harus dapat melarutkan zat yang diinginkan, mempunyai titik didih yang rendah, murah, tidak toksik dan tidak mudah terbakar (Ketaren, 1986). Beberapa metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut dibagi menjadi dua cara, yaitu cara dingin dan cara panas. Ekstraksi cara dingin dapat dibedakan sebagai berikut:

1. Maserasi

Maserasi adalah proses penyarian simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur kamar (Ditjen POM, 2000). Keuntungan ekstraksi dengan cara maserasi adalah pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana, sedangkan kerugiannya yakni cara pengerjaannya lama. Dalam maserasi (untuk ekstrak cairan), serbuk halus atau kasar dari tumbuhan obat yang kontak dengan pelarut disimpan dalam wadah tertutup untuk periode tertentu dengan pengadukan yang sering, sampai zat tertentu dapat terlarut. Metode ini cocok digunakan untuk senyawa yang termolabil (Tiwari *et al.*, 2011).



disentri basiler. Terdapat 4 spesies *Shigella* yaitu *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, dan *Shigella sonnei* (Karsinah dkk., 1994).

Sifat koloni *S. dysenteriae* kecil dan halus. Semua spesies *Shigella* tidak memfermentasi laktosa, dengan pengecualian *S. sonnei*, yang memfermentasi laktosa secara lambat, pada media agar Mac Conkey koloni akan berubah menjadi berwarna merah muda sesudah lebih dari 18 jam (Gibson, 1996). *S. dysenteriae* membentuk asam dari karbohidrat tetapi jarang memproduksi gas (Jawetz *et al.*, 2005).

Daya invasi kuman menembus masuk ke dalam lapisan epitel permukaan mukosa usus di daerah ileum terminal dan kolon, pada lapisan epitel tersebut kuman memperbanyak diri. Sebagai reaksi tubuh terjadi reaksi peradangan diikuti dengan kematian sel dan mengelupasnya lapisan tersebut, terjadilah tukak (Karsinah dkk., 1994). Gejala klinik yang menyertainya adalah disentri basiler atau *Shigellosis* yaitu suatu infeksi peradangan akut saluran pencernaan, dengan kondisi klinis meliputi diare, buang air besar berair yang disertai darah, lendir, dan nanah (Pelczar dan Chan, 1988). *S. dysenteriae* dapat menyebabkan 3 bentuk diare: 1). Disentri klasik dengan tinja yang konsisten lembek disertai darah, mucus, dan pus 2). *Watery diarrhea* 3). Kombinasi keduanya (Karsinah dkk., 1994).

Menurut Sack *et al* (2005) bakteri *S. dysenteriae* merupakan bakteri yang mampu menghasilkan suatu toksin protein poten yang

dikenal dengan protein shiga yang terdiri dari dua struktur subunit, yaitu subunit fungsional (pada sitoplasma subunit fungsional akan mengkatalisasi dan menghidrolisis RNA 28S dari subunit 60S ribosom, sehingga menyebabkan hambatan pada sintesis protein yang bersifat permanen sehingga mengakibatkan kematian sel) dan subunit pengikat (bagian subunit pengikat merupakan suatu *glikolipid globotriaosilseramid (Gb3)* yang berfungsi untuk mengikat reseptor seluler spesifik, pengikatan ini akan diikuti oleh pengaktifan mediator reseptor endositosis dari toksin yang dihasilkan).

#### **F. Antimikroba**

Dewasa ini, berbagai jenis antimikroba telah tersedia untuk mengobati penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme. Zat antimikroba yang digunakan dalam pengobatan bertujuan untuk mengeliminasi mikroorganisme infeksius atau mencegah terjadinya infeksi. Zat antimikroba juga harus mampu menunjukkan toksisitas selektif. Zat antimikroba harus mampu menghambat mikroorganisme infeksius dan bersifat toksik hanya terhadap patogen infeksius, tetapi tidak terhadap inangnya (Harmita *et al.*, 2006).

Antibiotik merupakan salah satu kelompok terbesar dari zat antimikroba. Antibiotik adalah zat biokimia yang diproduksi oleh mikroorganisme, yang dalam jumlah kecil dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh organisme lain. Sesuai sifatnya, antibiotik harus memiliki toksisitas selektif karena kelompok obat ini diproduksi oleh mikroorganisme

dan mempunyai derajat toksisitas yang berbeda-beda terhadap mikroorganisme lain (Darmadi, 2008).

Seleksi antimikroba menurut Darmadi (2008), yang tepat untuk mengobati suatu penyakit tergantung pada beberapa faktor, antara lain:

1. Sensitivitas mikroorganisme infeksius terhadap zat antimikroba tertentu.
2. Efek samping zat antimikroba, bergantung pada toksisitas langsung terhadap sel mamalia dan normal mikrobiota (flora normal) yang terdapat pada jaringan tubuh manusia.
3. Biotransformasi zat antimikroba secara *in vivo*, bergantung pada apakah zat antimikroba akan tetap dalam bentuk aktifnya pada jangka waktu yang cukup untuk mempunyai efek toksik pada patogen infeksius atau tidak.
4. Bahan kimia pada zat antimikroba yang menentukan distribusinya dalam tubuh, bergantung pada konsentrasi bahan kimia aktif antimikroba, yang dapat mencapai tempat infeksi untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme patogen penyebab infeksi.

Penetapan kerentanan patogen terhadap antimikroba penting untuk menyelidiki antibiotik yang sesuai untuk mengobati penyakit. Tidak ada gunanya menggunakan antibiotik yang tidak efektif melawan mikroorganisme penyebab penyakit. Ada beberapa prosedur berbeda yang digunakan oleh ahli mikrobiologi untuk menentukan sensitivitas mikroorganisme terhadap antibiotik, antara lain Metode Cakram *Kirby-Bauer*



Menurut Biemer (1973) tingkat difusi zat antimikroba kedalam pelat agar dipengaruhi oleh banyak sifat fisiokimia zat, pH, dan suhu. Sedangkan menurut Harmita *et al.*, (2006) ukuran zona hambatan dapat dipengaruhi oleh kepadatan atau viskositas media biakan, kecepatan difusi antibiotik, dan interaksi antibiotik dengan media.

Setelah inokulasi, mikroba akan mengalami proses proliferasi, selama periode ini diameter zona akan terbentuk dan ukurannya ditentukan oleh konsentrasi agen antimikroba yang efektif pada jarak tertentu ditepi cakram. Diluar dari jarak spesifik ini, konsentrasi antimikroba yang lebih rendah memungkinkan mikroba akan berkembang biak (Biemer, 1973). Ada atau tidak adanya pertumbuhan sekitar cakram antimikroba adalah ukuran tidak langsung dari kemampuan antibiotik untuk menghambat suatu organisme. Kecepatan difusi melalui agar tidak secepat laju ekstraksi antimikroba keluar dari cakram. Laju difusi antimikroba melalui pelat agar tergantung pada sifat difusi dan kelarutan antibiotik dalam agar dan berat molekul senyawa antibiotik (Vineetha *et al.*, 2015)

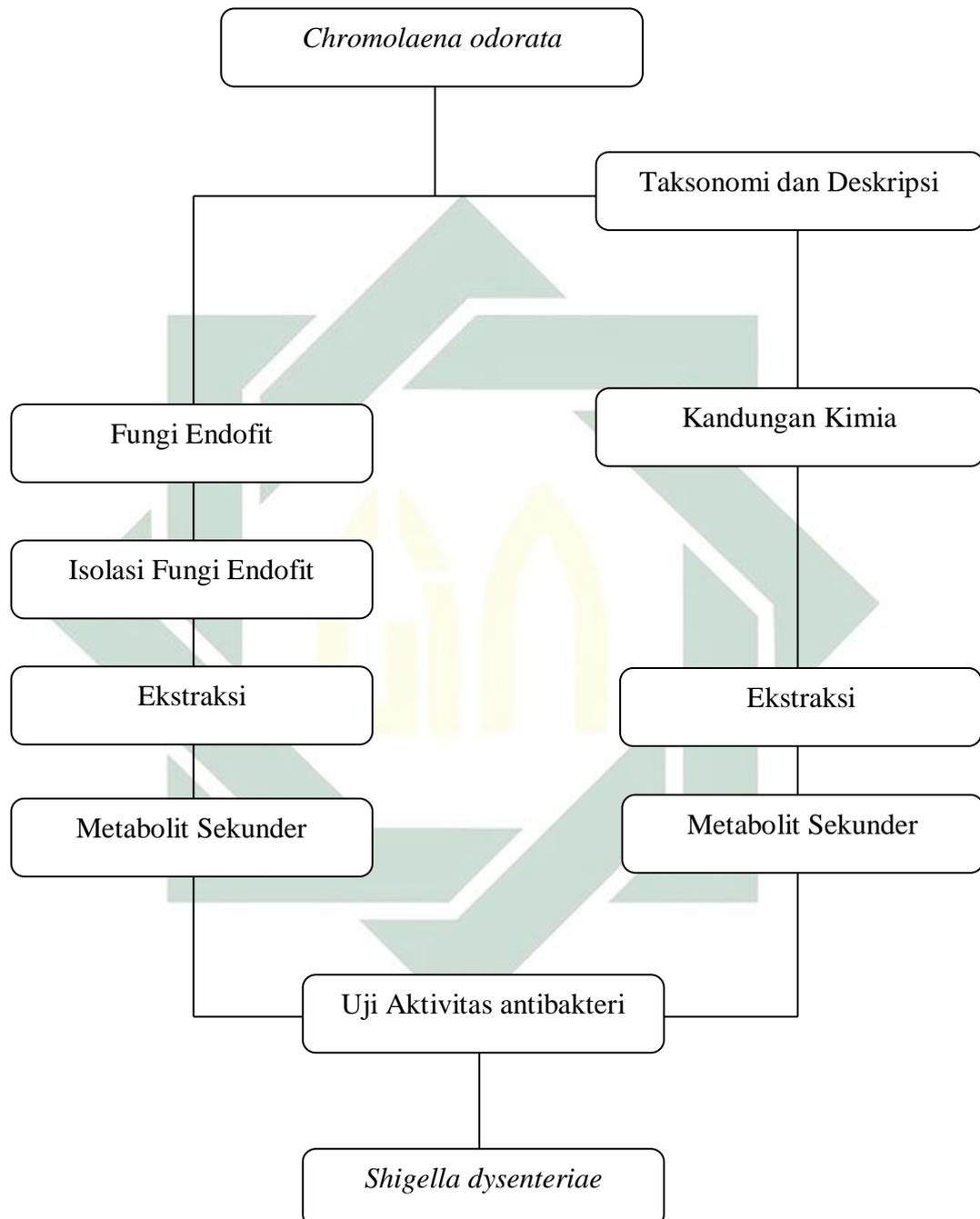
Metode difusi agar telah digunakan secara luas dengan menggunakan cakram kertas saring yang tersedia secara komersial. Efektivitas relatif antibiotik yang berbeda menjadi dasar bagi spektrum sensitivitas suatu organisme. Selain itu, suatu zat yang ditemukan memiliki efek samping signifikan tidak boleh digunakan untuk antibiotik (Harmita *et al.*, 2006).







## G. Kerangka Teori















*stirer* dan dipanaskan hingga mendidih diatas *hot plate*. Ditunggu dengan kapas dan disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dengan tekanan 2 atm. Medium yang telah steril siap digunakan.

## 2. Sterilisasi Permukaan

Sampel daun sehat yang berukuran 10 mm x 5 mm dicuci dengan menggunakan air destilasi untuk menghilangkan debris yang menempel pada daun. Kemudian bahan dipotong menjadi 10 subsampel dengan ukuran 2 x 2,5 mm. (Cannon and Simon, 2002).

Sterilisasi permukaan dilakukan berdasarkan metode Nakagiri *et al.* (2005). Sampel daun disterilisasi menggunakan alkohol 70% selama 1 menit dan sodium hypochlorite (NaOCl) 5.3% selama 2 menit, kemudian dibilas dengan air destilasi 3 kali, dan dikeringkan 3-4 jam diatas kertas saring steril.

## 3. Isolasi Fungi Endofit

Sampel daun yang sudah kering diisolasi dalam media PDA yang ditambahkan dengan 200 mg/l kloramfenikol yang berfungsi untuk menghambat dan mencegah bakteri tumbuh didalam media. Diinkubasi pada suhu ruang 26-28°C (Nakagiri *et al.*, 2005).

#### 4. Pemurnian Fungi Endofit

Pemurnian fungi endofit dilakukan dengan menggunakan metode isolasi spora tunggal. Fungi endofit dimurnikan secara bertahap satu-persatu dan terus menerus sampai diperoleh biakan murni fungi endofit (Ahlich *et al*, 1995; Cao, L.X *et al*, 2001; Gandjar *et al*, 1992; Kumar, *et al*, 2004). Spesimen fungi endofit yang dimurnikan diinokulasi pada media PDA cawan petri. Pemurnian fungi endofit berfungsi untuk memisahkan koloni endofit yang berbeda agar diperoleh isolat murni. Kemudian diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu kamar untuk dilakukan pengamatan morfologi, dan jika masih ditemukan pertumbuhan koloni yang berbeda secara makroskopis, maka dilakukan pemurnian kembali sampai diperoleh isolat murni fungi endofit. (Noverita *et al*, 2009). Setiap isolat fungi endofit dibuat duplo pada agar miring yang masing-masing digunakan untuk kultur stok dan untuk penelitian.

#### 5. Identifikasi Fungi Endofit

Spesimen tunggal dari fungi endofit diidentifikasi menggunakan buku dari Domsch *et al*. (1980), Ellis (1993) dan Nakagiri *et al*. (2005). Identifikasi fungi endofit dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis.

Karakterisasi makroskopis dilakukan dengan mengamati morfologi koloni meliputi warna koloni, warna sebalik koloni (*reverse*

*color*), tekstur (granular, seperti tepung, seperti beludru, seperti kapas), zonasi, dan tetes eksudat (*exudates drops*) (Gandjar, 2000).

Karakterisasi mikroskopis dilakukan dengan mengamati fungi endofit menggunakan mikroskop. Caranya meliputi, kaca preparat dan kaca penutup disterilisasi menggunakan alkohol 70%, isolat dari media PDA cawan petri dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm<sup>2</sup> yang berisi bagian hifa dari fungi endofit dan diletakkan diatas kaca preparat kemudian ditutup dengan kaca penutup. Disiapkan cawan petri steril dan didalamnya diberi alas kertas tissue yang dibasahi dengan air destilasi steril untuk digunakan sebagai alas kaca preparat. Kaca preparat dimasukkan kedalam cawan lalu diinkubasi selama 7 hari dengan suhu 29°C. Setelah diinkubasi, kaca penutup dibuka dan ditetesi 1 tetes alcohol 70% dan 1 tetes *methylene blue*, ditutup dengan kaca penutup lalu diamati pada mikroskop dari perbesaran terkecil hingga terbesar. Pengamatan dilakukan dengan mengamati ada atau tidaknya sekat pada hifa, pertumbuhan hifa, bentuk dan warna kondia (Yulia, 2005; Sundari, 2012).

## **6. Persiapan Inokulasi dan Enumerasi Fungi Endofit**

Sebanyak 2 mL air destilasi steril ditambahkan kedalam PDA miring yang berisi isolat fungi endofit, digores lalu di homogenkan dengan memnggoyangkan tabung PDA miring. Kemudian dihitung menggunakan *colony forming unit* (CFU) (Gandjar *et al*, 1992).

## 7. Peremajaan Mikroba Uji

Masing-masing mikroba yang diuji diremajakan terlebih dahulu ke media PDA untuk kapang dan NA untuk bakteri. Bakteri *Shigella dysenteriae* diinokulasikan ke dalam media NA miring dengan cara mengambil biakan menggunakan jarum ose secara aseptis, lalu diinkubasi selama 5 hari pada suhu 37°C selama 24 jam. Peremajaan mikroba uji dilakukan dalam kondisi steril di dalam *laminar air flow* (Jauhari, 2010).

## 8. Fermentasi dan Ekstraksi Fungi Endofit

Untuk memperoleh hasil dari fermentasi fungi endofit maka dilakukan dengan fermentasi cair menggunakan media PDB (*Potato Dextrose Agar*). Diambil 3 potongan biakan koloni fungi endofit yang telah diinkubasi pada cawan petri selama 5-7 hari, menggunakan *core borer* dengan ukuran 1 x 1 cm. potongan fungi endofit diinokulasi ke dalam media PDB sebanyak 20 mL di dalam labu Erlenmeyer yang berukuran 100 mL. fermentasi dilakukan di dalam *rotary shaker* selama 14 hari dengan kecepatan putar 140 rpm (rotary per minute) pada suhu kamar. Media disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan miselium dan biomasnya. Hasil fermentasi yang telah dipisahkan antara filtrat dan biomasnya akan diproses kembali untuk dijadikan ekstrak metabolit sekunder. Filtrat ditampung dalam labu bulat dan dikering-bekukan kemudian bobotnya ditimbang sampai

diperoleh bobot kering, kemudian dihancurkan sampai halus. Miselium dan filtrat direndam menggunakan pelarut metanol. Miselium dan filtrat dimaserasi menggunakan metanol sebanyak 1:1 dan didiamkan selama 72 jam sambil dilakukan pengadukan.

Ekstrak disaring menggunakan kertas saring, kemudian filtrat hasil maserasi diuapkan untuk memisahkan pelarutnya menggunakan *Rotary evaporator* 40<sup>o</sup> C sehingga didapatkan ekstrak kental daun *C. odorata* (Manik *et al.*, 2014).

#### **9. Ekstraksi daun *C. odorata***

Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan, daun dibersihkan terlebih dahulu, dikering anginkan, kemudian daun yang sudah kering dihaluskan. Serbuk daun ditimbang sebanyak 250 g dengan neraca analitik. Sampel di ekstraksi dengan cara maserasi yaitu merendam sampel dalam pelarut metanol sebanyak 500 ml (1:2) dan diinkubasi pada suhu kamar selama 72 jam dengan dilakukan pengadukan sesering mungkin (Pathan *et al.*, 2012).

Ekstrak disaring dengan kertas saring, kemudian filtrat hasil maserasi diuapkan untuk memisahkan pelarutnya menggunakan *Rotary evaporator* 40<sup>o</sup> C sehingga didapatkan ekstrak kental daun *C. odorata* (Manik *et al.*, 2014).



### **11. Preparasi inokulum dan enumerasi fungi endofit**

Preparasi inokulum dilakukan dengan diambil air destilasi sebanyak 2 mL dan ditambahkan kedalam kultur fungi endofit agar miring yang berusia 7 hari, digores lalu di homogenkan. Jumlah dari spora dihitung dengan menggunakan CFU (Gandjar, *et al.*, 1992).

### **12. Preparasi inokulum dan enumerasi bakteri atau fungi**

Bakteri *Shigella dysenteriae* disubkultur dimedia NA dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Sebanyak 5 mL NB ditambahkan kedalam masing masing media bakteri yang sudah diinkubasi, kemudian digores lalu dihomogenkan. Langkah selanjutnya dituang kedalam 15 mL NB, dan kemudian diinkubasi didalam waterbath dan dishaker 90 rpm pada suhu 37°C (Agusta *et al.*, 2005). Jumlah sel dihitung menggunakan CFU (Gandjar *et al.*, 1992).

### **13. Uji Aktivitas Antimikrobia**

Uji aktivitas antimikrobia dilakukan dengan berdasarkan metode Kirby-Bauer atau yang disebut dengan cakram kertas (Harmita and Radji, 2004). Cakram kertas yang akan dilakukan untuk uji antimikrobia disterilisasi terlebih dahulu sebelum digunakan untuk membunuh mikroba yang tidak diinginkan. Sebanyak 2 mL suspensi spora dari fungi endofit  $(2.4-3.0) \times 10^4$  cfu/mL ditambahkan ke erlenmeyer 100 mL yang berisi 20 mL media PDB, dan kemudian diinkubasi didalam shaker inkubasi dengan ruang  $(26^{\circ}-28^{\circ}\text{C})$ . Kemudian, suspensi dishaker pada kecepatan 90 rpm selama 5 hari

(Syarmalina *et al.* 2003; Agusta *et al.* 2005; Kumala, 2005). Setelah diinkubasi, suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk uji antimikroba.

Disiapkan media MH dalam tabung reaksi sebanyak 17 mL, diinokulasi dengan 0.2 ml bakteri *Shigella dysenteriae* (7.1-93) x 10<sup>8</sup> cfu/mL lalu dihomogenkan. Tabung yang sudah berisi sampel uji masing-masing dituang ke dalam cawan petri dan ditunggu hingga memadat. 3 cakram kertas diletakkan di atas media, kemudian diambil sebanyak 5 µl supernatan fungi endofit dan ekstrak daun diteteskan di atas cakram kertas. Sebagai kontrol negatif diberi air destilasi steril, sedangkan untuk kontrol positif digunakan tetracyclin (50 µg .m<sup>-1</sup>). Masing-masing sampel uji aktivitas bakteri diinkubasi pada suhu 37°C 24 jam. Eksperimen ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Aktivitas antimikroba akan ditandai dengan terbentuknya zona hambat yang mengindikasikan terhambatnya aktivitas mikroorganisme oleh ekstrak fungi endofit. Diameter zona hambat dihitung menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat dihitung dengan menghitung indeks penghambatan menggunakan rumus berdasarkan Vilaseñor, *et al.*, (2004):

$$\text{Indeks penghambatan} = \frac{\text{Diameter zona hambat} - \text{diameter paper disk}}{\text{diameter paper disk}}$$









Tabel 5.1. Pengamatan Makroskopis Isolat Fungi Endofit

Isolat	Warna		Bentuk	Elevasi	Tepi
	Permukaan	Sebalik Koloni			
NE 1	Putih	Putih kecoklatan	Bulat	Cembung	Rata
NE 2	Hitam	Hitam	Tidak teratur	Memiliki tonjolan	Berombak
NE 3	Putih	Putih kehitaman	Berfilamen	Rata	Filiform
NE 4	Putih	Putih kemerah mudaan	Berfilamen	Rata	Filiform
NE 5	Putih Kehitaman	Hitam	Berfilamen	Rata	Filiform

(Data Primer, 2018)

## 2. Fermentasi Fungi Endofit

Fungi endofit difermentasi pada media cair untuk menghasilkan metabolit sekunder. Fungi endofit yang berusia 7 hari pada media padat diinokulasikan pada media cair, kemudian di *rotary shaker* selama 14 hari. Proses fermentasi fungi endofit dilakukan pada media PDA dengan volume 250 ml. Hasil fermentasi fungi endofit pada media cair dapat dilihat pada tabel 5.2.







Ekstrak daun dan fungi endofit diuji komponen fitokimianya dan dilakukan pengenceran menggunakan DMSO 10% untuk mendapatkan konsentrasi 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml dan 100 mg/ml. Hasil pengenceran diuji terhadap bakteri *S. dysenteriae*.

#### 4. Uji Fitokimia Ekstrak Daun dan Fungi Endofit *C. odorata*

Skrining fitokimia ekstrak metabolit sekunder fungi endofit dan ekstrak daun *C. odorata* dilakukan terhadap uji flavonoid, terpenoid, tannin dan saponin. Hasil pengujian ekstrak metabolit sekunder fungi endofit dan ekstrak daun *C. odorata* dapat dilihat dalam tabel .

Tabel 5.5 Uji Fitokimia Metabolit Sekunder Ekstrak Daun dan Ekstrak Fungi Endofit *C.odorata*

No	Ekstrak	Flavonoid	Terpenoid	Tanin	Steroid
1	<i>C. odorata</i>	+	+	+	+
2	NE 1	+	+	+	-
3	NE 2	-	+	+	+
4	NE 3	+	+	+	-
5	NE 4	+	+	-	-
6	NE 5	-	+	-	+

Keterangan : + : Positif mengandung senyawa  
 - : Tidak Mengandung senyawa  
 (Data Primer, 2018)





Dari data hasil penelitian, ekstrak daun *C. odorata* dan ekstrak metabolit sekunder fungi endofit menunjukkan aktivitasnya terhadap bakteri uji. Hal ini dibuktikan dengan adanya zona hambat yang terbentuk di sekeliling kertas cakram. Semua ekstrak metabolit sekunder fungi endofit dan ekstrak daun *C. odorata* mampu menghambat aktivitas bakteri *S. dysenteriae*. Pada ekstrak *C. odorata*, zona hambat tertinggi berada pada konsentrasi 25 mg/ml dengan rerata diameter zona hambat sebesar  $31,67 \pm 2,88$ . Pada ekstrak NE1 zona hambat terbesar berada pada konsentrasi 75 mg/ml dengan diameter sebesar  $38,33 \pm 2,88$ . Pada ekstrak NE2 zona hambat terbesar berada pada konsentrasi 100 mg/ml dengan diameter sebesar  $40,00 \pm 0$ . Pada ekstrak NE3 zona hambat terbesar berada pada konsentrasi 100 mg/ml dengan diameter sebesar  $33,33 \pm 4,62$ . Pada ekstrak NE4 diameter zona hambat terbesar berada pada konsentrasi 50 mg/ml dengan diameter sebesar  $36,67 \pm 5,77$ . Pada ekstrak NE5 zona hambat terbesar berada pada konsentrasi 50 mg/ml dan 100 mg/ml dengan diameter masing-masing  $4,00$  dan  $0,00$ .

Menurut *Greenwood* (1995), zona hambat mikroba uji memiliki 4 kategori diantaranya adalah tidak menghambat jika diameter zona hambat  $\leq 10$  mm; lemah jika diameter zona hambat 11-15 mm; sedang jika diameter zona hambat 16-20mm; dan kuat jika diameter zona hambat  $\geq 20$ . Data hasil uji aktivitas antimikroba terbukti bahwa semua

ekstrak daun dan fungi endofit masuk dalam kategori kuat, karena diameter zona hambat lebih dari 20mm.

Data yang telah diperoleh kemudian diuji dengan menggunakan program SPSS versi 24. Langkah awal dalam mengolah data adalah dengan mengetahui normalitas dan homogenitas suatu data untuk diuji lebih lanjut pada SPSS. Uji normalitas suatu data digunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dengan nilai signifikansi  $> 0,05$ . Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa data yang diperoleh tidak berdistribusi normal dengan angka signifikansi hitung  $0,000 < 0,05$  (lampiran 2). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan menggunakan *Oneway Anova* dengan nilai signifikansi  $> 0,05$ . Dari hasil pengujian pengujian homogenitas, diperoleh nilai signifikansi hitung  $0,000$  yang artinya data uji diameter zona hambat tidak homogen ( $< 0,05$ ) (lampiran 3). Hasil dari *Kolmogorov-Smirnov* dan *Oneway Anova* menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal dan variansi data tidak homogen, sehingga dilakukan uji *Kruskall-Wallis* dengan nilai signifikansi  $< 0,05$ .

Hasil analisis *Kruskall-Wallis* data terhadap diameter zona hambat diperoleh nilai signifikansi sebesar  $(0,005) < 0,05$  (lampiran 4). Hal ini dapat dikatakan bahwa  $H_0$  ditolak dan  $H_a$  diterima, artinya terdapat perbedaan diameter zona hambat pada masing-masing ekstrak terhadap aktivitas bakteri *S. dysenteriae*. Untuk mengetahui kelompok perlakuan mana saja yang memiliki perbedaan, maka dilakukan uji





mengnadung beberapa fungi endofit yang mampu menghasilkan metabolit sekunder sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik dari tanaman inang kedalam mikroba endofit.

Proses isolasi fungi endofit membutuhkan waktu yang cukup lama. Wahyudi (2001) menyatakan bahwa pertumbuhan fungi endofit bersifat sangat lambat (*Slow grower*) sehingga memerlukan waktu inkubasi yang cukup panjang untuk isolasi dan pemurnian fungi endofit. Isolat fungi endofit dari daun *C. odorata* yang tumbuh dimurnikan berdasarkan kriteria bentuk koloni dan morfologi yang berbeda. Pemurnian dilakukan sebanyak 6 kali untuk mendapatkan isolat tunggal fungi endofit. Hasil yang diperoleh dari isolasi fungi endofit berdasarkan karakteristik morfologinya maka didapatkan 5 isolat fungi endofit dengan kode isolat NE1, NE2, NE3, NE4 dan NE5. Lima isolat fungi endofit kemudian diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi makroskopis dan mikroskopis, untuk diketahui jenis dari fungi endofit tersebut.

#### **a. Isolat NE1**

Isolat NE1 memiliki warna permukaan putih tebal, warna sebalik koloni putih kecoklatan, bentuk koloni bulat, elevasi cembung dan tepi rata. Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis isolat fungi endofit dapat dilihat pada gambar 5.6. Isolat NE1 diduga sebagai *Mucor sp.*











ditemukan sebagai endofit dari beberapa tanaman herba *Polygala elongate* yang dikumpulkan dari Western Ghats yang berperan sebagai sumber antioksidan alami.

## 2. Fermentasi Fungi Endofit

Proses fermentasi fungi endofit pada medium PDY dilakukan selama 14 hari didalam *rotary shaker* dengan kecepatan 140 rpm pada suhu ruang. Proses fermentasi dilakukan selama 14 hari karena fungi endofit dapat memproduksi metabolit sekunder secara maksimum setelah mencapai fase stasioner. Pada akhir tahap stasioner (setelah hari ke 15) proses produksi fermentasi metabolit sekunder oleh fungi endofit akan menurun secara signifikan (Pokhrel & Ohga, 2007; Merlin *et al*, 2013). Pemilihan medium cair sebagai media dalam proses fermentasi metabolit sekunder karena lebih efektif dalam memproduksi biomassa dan senyawa bioaktif dibandingkan dengan medium padat (Pokhrel & Ohga, 2007).

Warna medium PDY akan mengalami proses perubahan menjadi berbagai warna tergantung dari jenis spesies fungi endofit. Berdasarkan hasil pengamatan selama proses fermentasi metabolit sekunder fungi endofit, terlihat perbedaan warna medium pada masing-masing isolat. Sebagaimana yang terlihat pada tabel 5.2.

Perubahan warna medium disebabkan oleh adanya pertumbuhan fungi didalam media, dimana terjadi penambahan massa sel dan proses

metabolisme fungi pada media, sehingga mengakibatkan terjadinya perubahan warna medium PDY yang semula bening menjadi kekeruhan. Adanya aktivitas fungi didalam medium fermentasi PDY merupakan proses produksi metabolit sekunder oleh fungi endofit (Gandjar, 2006).

Suwandi (1989) menyatakan bahwa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh fungi endofit disekresikan kedalam medium pertumbuhan dalam jumlah yang besar. Tujuan dari penggunaan rotary shaker pada saat fermentasi adalah untuk menjaga agitasi, aerasi dan agar pertumbuhan fungi endofit dalam media lebih homogen. Aerasi dibutuhkan untuk mensuplai oksigen fungi endofit, sedangkan agitasi bertujuan untuk meningkatkan suplai oksigen didalam medium, meningkatkan homogenitas suhu, dan mempertahankan homogenitas konsentrasi nutrisi (Kumala *et al*, 2014; Wahyono *et al*, 2010; Basha *et al*, 2012).

Pada pemanenan fungi endofit, didapatkan volume filtrate yang berbeda pada masing-masing isolat. Volume filtrate yang diperoleh dari isolat NE1 sebesar 189 ml, NE2 sebesar 190 ml, NE3 sebesar 126 ml, NE4 sebesar 130 ml dan NE5 sebesar 185 ml. Fungi endofit memiliki kecepatan tumbuh yang berbeda pada masing-masing spesies. Kecepatan tumbuh diamati dari pertumbuhan dan penambahan ukuran diameter koloni pada rentang waktu tertentu (Sinaga *et al*. 2009). Isolat NE2 memiliki pertumbuhan yang sangat lambat dari semua isolat, sehingga

filtrate yang dihasilkan banyak namun miselium fungi yang didapat sedikit dibandingkan dengan isolat yang lain.

### 3. Ekstraksi Fungi Endofit dan Daun *C. odorata*

Hasil filtrat medium PDY kemudian di ekstraksi menggunakan metode cair-cair (partisi). Ekstraksi cair-cair atau ekstraksi *solvent* adalah proses pemisahan fasa cair berdasarkan kelarutan zat terlarut yang akan dipisahkan antara larutan asal dan pelarut pengestrak (*solvent*) (Mirwan, 2013). Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi metabolit sekunder fungi endofit adalah methanol. Menurut hasil penelitian Asmaliyah *et al.* (2010) menunjukkan bahwa methanol merupakan pelarut universal yang mampu melarutkan senyawa polar, semi polar, dan non polar. Pelarut methanol juga paling banyak digunakan untuk ekstraksi dan proses isolasi senyawa organik bahan alami, karena dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder dan dapat menarik zat aktif yang terkandung didalamnya (Lenny, 2006; Noor *et al.* 2006).

Media cair dan miselium disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan media dan miseliumnya. Miselium ditimbang untuk mengetahui berat basah dan kemudian di oven pada suhu 60°C sampai diperoleh berat keringnya. Maserasi dilakukan terhadap miselium fungi endofit. Miselium yang sudah kering dihaluskan lalu direndam dalam methanol (1:3) selama 48 jam dengan mengaduk sesering mungkin.

Kemudian dilakukan penyaringan untuk memperoleh filtrate metanol. Filtrat hasil ekstraksi methanol diuapkan sehingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat diuji kandungan metabolit sekunder dan diuji aktivitasnya terhadap bakteri *S. dysenteriae*.

#### **4. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun *C. odorata* dan Ekstrak Metabolit Sekunder Fungi Endofit**

Uji aktivitas antimikroba dilakukan untuk mengetahui kemampuan ekstrak dalam menghambat bakteri uji, dengan menggunakan metode *Kirby-Bauer* (kertas cakram). Kertas cakram yang digunakan pada penelitian ini berdiameter 6 mm. Media yang digunakan untuk bakteri *S. dysenteriae* adalah media *Nutrient agar* (NA). Medium NA mengandung pepton, yeast, dan beef extract yang berfungsi sebagai sumber nitrogen, sumber karbon, vitamin, dan sebagai penyokong pertumbuhan bakteri. Sebelum dilakukan uji aktivitas antibakteri, terlebih dahulu dilakukan peremajaan bakteri selama 24 jam karena diperlukan bakteri dalam keadaan aktif dan sedang mengalami masa pertumbuhan yang optimal.

Pada kontrol positif digunakan kloramfenikol, DMSO 5% sebagai kontrol negatif. Kloramfenikol digunakan untuk melihat sensitifitas dan resistensi bakteri uji terhadap antibiotik. Bakteri yang sudah resisten memiliki diameter zona hambat sebesar 12 mm atau kurang, sedangkan bakteri yang masih sensitif memiliki diameter zona

hambat sebesar 18 mm atau lebih (Rianto *et al*, 2015). Kloramfenikol memiliki spectrum luas dalam menghambat aktivitas bakteri gram negatif dan bakteri gram positif yang berpenetrasi kedalam jaringan dengan sangat baik (Fayyaz *et al*, 2013). Diameter yang terbentuk kemudian diukur dengan menggunakan jangka sorong termasuk kertas cakram.

Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri adalah 25mg/ml, 50mg/ml, 75mg/ml dan 100mg/ml. Masing-masing ekstrak diinokulasikan pada kertas cakram sebanyak 20 $\mu$ l. Penentuan konsentrasi berdasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Natheer *et al*. (2012) yang menggunakan ekstrak daun *C. odorata* terhadap bakteri *Shigella* dengan konsentrasi 12.5mg/ml, 25mg/ml, 50mg/ml dan 100mg/ml. Pada penelitian Natheer *et al*. (2012), konsentrasi hambat minimal (MIC) ekstrak daun *C. odorata* terhadap *Shigella* berada di range antara konsentrasi 50-100mg/ml. Sehingga pada penelitian ini digunakan konsentrasi mulai dari 25mg/ml sampai dengan 100mg/ml.

Pada penelitian ini, dihasilkan ekstrak fungi endofit yang memiliki kemampuan dalam menghambat mikroba uji sangat kuat, dengan dibuktikan besarnya zona hambat yang melebihi 20 mm. pada uji statistika yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa perbedaan konsentrasi mempengaruhi besarnya zona hambat, hal ini dibuktikan dengan uji *Krukall-Wallis* pada nilai signifikansi (0,005) <

0,05 dan dibuktikan pada hasil data zona hambat yang diperoleh pada setiap ekstrak isolat. Kekuatan zona hambat pada masing-masing ekstrak dapat dipengaruhi oleh tinggi rendahnya konsentrasi ekstrak. Sedangkan pada uji *Mann-Whitney* dengan nilai signifikansi 0,05 diperoleh hasil data yang dapat dilihat pada lampiran 6. Ekstrak *C. odorata* pada konsentrasi 100mg/ml berbeda nyata dengan semua konsentrasi ekstrak fungi endofit. Hal ini dikarenakan ekstrak *C. odorata* pada konsentrasi 100 mg/ml memiliki rata – rata zona hambat paling kecil diantara konsentrasi yang lain yaitu sebesar 23,33 mm.

Zona hambat ekstrak daun *C. odorata* lebih bening daripada zona hambat ekstrak metabolit sekunder fungi endofit. Sehingga jika dibandingkan dengan ekstrak fungi endofit, maka ekstrak daun *C. odorata* lebih baik daripada ekstrak metabolit sekunder fungi endofit. Hal ini disebabkan karena metabolit sekunder yang ada didalam daun lebih banyak. Terbukti pada uji skrining metabolit sekunder bahwa ekstrak *C. odorata* mengandung flavonoid, terpenoid, tannin, dan saponin. Gambar hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak fungi endofit dan daun *C. odorata* dapat dilihat pada lampiran 1.

Antibiotik yang dihasilkan oleh fungi endofit memiliki kemampuan menghambat mikroorganisme melalui 4 jalur, yaitu: menghambat sintesis dinding sel, menghambat fungsi selaput sel, menghambat sintesa protein dan menghambat sintesis asam nukleat (Suwandi, 1992). Yutika *et al* (2015) menyatakan bahwa aktivitas zona

hambat pada setiap perlakuan tidak harus memiliki peningkatan yang sama. Hal ini terjadi karena adanya perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media.

Para ilmuwan telah banyak melakukan penelitian mengenai fungi endofit yang memiliki potensi sebagai produsen potensial penghasil senyawa aktif baru dan biologis. Dalam dua decade terakhir, banyak senyawa bioaktif yang ditemukan dari fungi endofit seperti antimikroba, insektisida, sitotoksik dan antikanker. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Stierle *et al* (1993) yang menemukan senyawa bioaktif paclitaxel (taxol) dari fungi endofit *Taxomyces andreanae*. Fungi endofit sebagai sumber daya mikroorganisme baru dan berlimpah yang memiliki kemampuan khusus untuk menghasilkan senyawa yang sama atau serupa yang berasal dari tanaman inangnya dan senyawa bioaktif lainnya (Zao *et al*, 2010). Hal ini mendukung penelitian bahwa fungi endofit yang diisolasi dari daun *C. odorata* merupakan mikroorganisme sebagai penghasil senyawa antibakteri. Senyawa metabolit sekunder yang dimiliki fungi endofit ini sama dengan senyawa yang terkandung didalam ekstrak daun *C. odorata*. Metabolit sekunder pada ekstrak fungi endofit memiliki tabel

kemampuan dalam menghambat bakteri uji. Tabel 5.4 menunjukkan bahwa masing-masing ekstrak memiliki senyawa kimia diantaranya, flavonoid, terpenoid, tanin dan steroid.

Berdasarkan literatur dan penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya, senyawa terpenoid mampu menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri dengan mengganggu terbentuknya membran dan dinding sel (Ajizah, 2004). Senyawa tannin merupakan senyawa antibakteri dengan mekanisme kerja menghambat enzim *reverse transcriptase* dan DNA *topoisomerase* sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Nuria, 2009). Mekanisme kerja steroid sebagai antibakteri adalah menyebabkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan senyawa intraselular berdifusi melalui membran luar dan dinding sel sehingga menyebabkan kematian sel (Nuria, *et al*, 2009). Flavonoid berperan dalam inhibisi pada sintesis DNA-RNA dengan ikatan hydrogen yang mengakibatkan penumpukan basa asam nukleat, flavonoid juga memiliki kemampuan dalam menghambat metabolisme energi, karena dapat menyerap aktif berbagai metabolit dan biosintesis makromolekul yang ada didalam sel mikroba (Cushnie dan Lamb, 2005). Flavonoid juga mampu mengganggu fungsi dinding sel dan menyebabkan lisis pada sel (Dewi 2010). Rijayanti (2014) menyatakan bahwa mekanisme penghambatan bakteri pada senyawa tanin adalah dengan mempreitasi protein, yaitu melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan inaktivasi fungsi materi genetik, selain itu dengan menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk.









Menurut tafsir dari Ibnu Katsir, tidak sekali-kali Engkau ciptakan semuanya sia-sia melainkan dengan sebenarnya, agar orang-orang yang berbuat buruk dalam perbuatannya Engkau berikan balasan yang setimpal kepada mereka, dan Engkau berikan pahala yang baik kepada orang-orang yang berbuat baik. Kemudian orang-orang mukmin menyucikan Allah dari perbuatan sia-sia dan penciptaan yang batil. Hiburan orang mukmin adalah bertafakkur, kesenangan orang mukmin adalah mengambil pelajaran. Kami memuji kepada Allah semata, kami semua berada dalam bahaya. Banyak orang yang lalai (berzikir) umurnya telah habis, sedangkan dia tidak menyadarinya. Banyak kehidupan terpenuhi semua yang dicita-citakannya, bunga-bunga yang mekar dengan gemericik air dari mata air, naungan pepohonan, tumbuh-tumbuhan yang segar, dan buah-buahan yang masak, semuanya itu menjadi berubah oleh lewatnya masa yang begitu cepat demikian pula pemilik-Nya.

Ayat tersebut menjelaskan bagaimana Allah SWT menciptakan segala sesuatu di bumi dengan sebaik-baiknya, dan disetiap penciptaan terdapat tanda-tanda bagi orang yang berakal dengan mengingat, memikirkan, serta mempelajari apa yang telah diciptakan Allah SWT. Sesuai dengan hadits yang diriwayatkan oleh Abu Nu'aim dari Ibnu Abbas yang berbunyi:











- Azevedo JL, Maccheroni JR, Pereira JO, Araujo WL. 2000. Endophytic Microorganism: A Review on Insect Control and Recent Advances on Tropical Plants. *Elect. Journal. Biotech.* 3:1-4.
- Baxter, J. 1995. *Chromolaena odorata*: Weed for killing or shrub for tilling. *Journal Article Agroforestry Today.* 7(2): 6-8.
- Basha NS, Ogbaghebriel A, Yemane K, Zenebe M. Isolation and screening of endophytic fungi from Eritrean traditional medicinal plant *Terminalia brownie* leaves for antimicrobial activity. *Int J Green Pharm.* 2012;6(1):40-4.
- Biemer, J. J. 1973. Antimicrobial Susceptibility Testing by the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method. *Clinical Laboratory Science.* 1(2): 135-140.
- Bunyapraphatsara, N. and Chokechaijaroenporn, O. 2000. Thai Medicinal Plants. Faculty of Pharmacy, Mahidol University and National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Bangkok, pp. 4: 622-626.
- Brooks, G.F., Janet, S.B., Stephen A.M. 2005. Jawetz, Melnick and Adelbergs, *Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology) Buku I*, Alih Bahasa oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E.B., Mertaniasih, N.M., Harsono, S., dan Alimsardjono, L. Jakarta : Salemba Medika.
- Cannon, P. F., Lu, G., Simmons, C. F., and Alex R. 2002. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycological Research.* 94 (2): 210-220.
- Cao, L.X., J.L. You and S.N. Zhou, 2002. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 18: 169–171.
- Cappuccino. J.G. and N. Sherman. 1996. *Microbiology: A Laboratory Manual.* 5<sup>th</sup> Ed. The Benjamin Cummings Publishing Inc., California.
- Carrol, G. C., 1988. Fungal Endophytes in Stems and Leaves from Latent Pathogens to Mutualistic Symbions. *Ecology.* 69: 2-9.
- Castillo A. G., Mellone B. G., Partridge J. F., Richardson W., Hamilton G. L. 2007. Plasticity of fission yeast CENP-A chromatin driven by relative levels of histone H3 and H4. *PLoS Genet.* 3(7): e121.
- Castillo, U. J., Harper, K., Strobel, GA., Sears, J., Alesi, K., Ford, E., Lin, J., Hunter, M., Maranta, M., Ge, H., Yaver, D., Jensen, JB., Porter, H., Robinson, R., Millar, D., Hess, WM., Condrón, M., and David T. 2003.

- Kakandumycins, Novel Antibiotica from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, An Endophyte of *Grevillea pteridifolia*. *FEMS Microbiology Letters*. 24: 183-190.
- Choi, YW., Hodgkiss, JJ., Hyde, KD. 2005. Enzyme Production by Endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology*. 1: 55-65.
- Chowdhury, A. R.. 2002. Essential Oils of The Leaves of *Eupatorium odoratum* L. from Shillong (N. E.). *J. Essen. Oil-Bearing Plants*. 5: 14-18.
- Cushnie, T.P dan Lamb. 2005. Antimicrobial activity of Flavonoids. *International Journal Of Antimicrobial Agents*. 26.
- Darmadi. 2008. *Infeksi Nosokomial: Problematika dan Pegendaliannya*. Salemba Medika, Jakarta.
- Day, R.A., JR, dan A.L. Underwood. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Edisi ke 6. Erlangga, Jakarta.
- Debbab, A., Aly, A. H., Lin, W.H., dan Proksch.,P. 2010. Bioactive Compounds from Marine Bacteria and Fungi. *Microbial Biotechnology*. 3: 544–563.
- Dewi, F. K. 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morindacitrifolia, linnaeus*) terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret.
- Dewi, Asiska Permata dan Fauzana, Annisa. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Etanol Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni*) Terhadap *Shigella dysenteriae*. *JOP*, 01.
- Domsch KH, Gams W, Anderson T. 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Vol I. Academic Press, London.
- Durham, N. C. 2004. *Armies of fighting fungi protect chocolate trees*. Diakses pada 2 Maret 2017. < <https://www.highbeam.com/doc/1G1-115835614.html> >.
- Dwidjoseputro. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta.
- Ellis MB. 1993. *Dematiaceous hyphomycetes*. International Mycological Institute, London.
- Ervia, 2012, Uji Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Etanolik Daun Pare (*Momordica charantia* L.) Dan Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae* ATCC 9361, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.

- Fayyaz, M. Irfan A.M., Zaheer A., Shahid., Aamir, dan Shanshad. 2013. In Vitro Susceptibility of Chloramphenicol Against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus. *Journal of the Collage of Physycians and Surgeons Pakistan*. 23 (9).
- Gandjar, I. 2000. Pengenalan Kapang Tropic Umum. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
- Gandjar, I., Koentjoro IR, Mangunwardoyo W, Soebagya L. 1992. *Guidelines for Basic Microbiology Laboratory*. Department of Biology, Faculty of Mathematic and Science. University of Indonesia, Depok.
- Gandjar, I., R.A. Samson, K. van den Tweel-Vermeulen, A. Oetari, dan I. Santoso. 1999. *Pengenalan Kapang Tropic Umum*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
- Gandjar, Indrawati., Sjamsuridjal, W. 2006. *Mikologi: Dasar dan Terapan*. Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.
- Gautier, Laurent. 1992. Taxonomy and Distribution of a Tropical Weed: *Chromolaena odorata* (L.) R. King & H. Robinson. *Conservatoire et Jardin Boyaniques de Geneve*. 47 (2): 645-662.
- Gerald TK, Dennis JK, Harrison's. 1998. Principles of Internal Medicine.14. Vol. 1. New York: Mc Graw Hill.
- Gibson, J.M, 1996, *Mikrobiologi dan Patologi Modern untuk Perawat*. EGC, Jakarta.
- Graige, M. dan Ahmed, S. 1988. *Handbook of Plant With Pest Control Properties*. John Willey & Sons, Singapore.
- Guo B, Dai J, Ng S, Huang Y, Leong C, Ong W, Carte BK. 2002. Cytonic Acid A and B, Novel Tridepside Inhibitor Of hCMV Protease from The Endophytic Fungus *Cytospora* Sp. *Journal of Natural Products*. 63(5): 602-604.
- Hajek AE. 2004. *Natural enemies: an introduction to biological control*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Harmita, dan Maksum Radji. 2006. *Analisis Hayati*. EGC, Jakarta.
- Hasnawati, dan Erna Prawita. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antibakteri dari Daun *Eupatorium odoratum* L. Terhadap Bakteri *Staphylococcus*



- Kusumaningtyas, E., E. AStuti, dan Darmono. 2008. Sensivitas Metode Bioautografi Kontak dan Agar Overlay dalam Penentuan Senyawa Antikapang. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 6(2): 75-79.
- Larran, S., Monaco, C., and H.E Alippi. 2001. Endophytic Fungi in Leaves of *Lycopersicon esculentum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17: 181-184.
- Lee, J. C., Lobkovsky, E., Pliam, N. B., Strobel, GA., Clardy, J. 1995. Subglutinols A and B; immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *J Org Chem*. 60:7076-7077.
- Lenny, S. 2006. *Senyawa Terpenoida dan steroida*. Karya Ilmiah departemen Kimia FMIPA Universitas Sumatra Utara Medan.
- Liani, Esthi. 2015. *Fungi Endofit*. Diakses pada 20 maret 2017. <<http://tgc.lk.ipb.ac.id/2015/05/18/fungi-endofit/>>.
- Lu, H., Zou, W. X., Meng, J. C., Hu, J., dan Tan R. X. 2000. New Bioactive Metabolites Produced by *Colletotrium* sp., An Endophytic Fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science*. 151: 76-73.
- Marutani, M., and Muniappan, R. 1991. Interactions between *Chromolaena odorata* (Asteraceae) and *Pareuchaetes pseudoinsulata* (Lepidoptera, Arctiidae). *Annals of Applied Biology*. 119: 227-237.
- Marwoto. 2001. Potensi dan peluang parasitoid *Trichogramma* untuk menekan populasi hama pada tanaman kedelai. *Prosiding Seminar Nasional Kinerja Teknologi untuk Meningkatkan Produktivitas Tanaman Kacang-kacangan dan Umbi-umbian*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor.
- Mc Donnell, G., and A. D. Russell. 1999. Antiseptic and disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology review*. 12(1): 147-179.
- McFadyen, R.E.Crutwell, 1989. Siam Weed: A New Threat to Australia's North. *Plant Protection Quarterly*. 4(1): 3-7.
- McFadyen, R.E.Crutwell, 1996. National Report from Australia and the Pacific. In: U.K. Prasad, R. Muniappan, P. Ferrar, J.P. Aeschlimann and H. de Foresta (Editors), Distribution, Ecology and Management of *Chromolaena odorata*. *Proceedings of 3rd International Chromolaena odorata Workshop*. University of Guam, Mangilao, USA.

- McFadyen, Rachel Cruttwell dan Bryce Skarratt. 1996. Potential distribution of *Chromolaena odorata* (siam weed) in Australia, Africa and Oceania. *Agriculture, Ecosystems and Environment Elsevier* 59: 89-96.
- Miles PG and ST Chang. 1997. *Mushrooms Biology*. Concise Basics and Current Developments. Singapore (SG), World Scientific.
- Michael, P.W.. 1989. Review Paper on Weeds of Concern to Northern Australia. Unpublished Report to AQIS, Canberra.
- Mirsam, H., Rosya, A., Rahim, Y. F., Rusae, A., dan Abdul Munif. 2015. Eksplorasi Cendawan Antagonis dari Tanaman Kirinyuh (*Chromolaena odorata* L.) sebagai Agens Hayati dan Pemacu Pertumbuhan. *Prosiding Seminar nasional Perlindungan Tanaman II*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Mirwan, Agus. 2013. Keberlakuan Model Hb-Gft Sistem N-Heksana – Mek – Air Pada Ekstraksi Cair-Cair Kolom Isian. *Konversi*, Volume 2.
- Nakagiri, A., Okane, I., Ito, T., Kramadibrata, K., Suciati, Retnowati, A. 2005. *A Guidebook to Identification of Fungi Inhabiting Mangrove and Surrounding Area in Indonesia*. Research Center for Biology, Bogor.
- Natheer, S. E., Seekar, C, Amutharaj, M. S Abdul Rahman dan K. Feroz Khan. 2012. Evaluation of antibacterial activity of *Morinda citrifolia*, *Vitex trifolia* and *Chromolaena odorata*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 6(11).
- Niere B. 2002. *Banana Endophyte: Potential for Pest Biocontrol*. IITAESARC. Kampala, Uganda.
- Noor, S. Purwoko. 2006. Aktivitas Ekstrak Lengkuas terhadap Pertumbuhan Jamur *Aspergillus spp.* Fakultas MIPA, *Skripsi*. UNS. Surakarta.
- Noverita, Dinah Fitria, dan Ernawati Sinaga. 2009. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit dari Daun dan Rimpang *Zingiber ottensii* Val. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 4: 171 -176.
- Nugroho, D. 2004. Eksplorasi Bakteri Endofit Pada Akar Tanaman Kentang Yang Berpotensi Sebagai Antagonis *Pseudomonas solanacearum*. *Skripsi*. Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang.
- Nuria, Cut., 2009, Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*, *Jurnal uji antibakteri*, 5 (2), h 10-12.

- Oyen, L. 1995. Experiences from South East Asia aggressive colonisers work for the farmers. *ILEIA (Centre for Research and Information on Low External Input and Sustainable Agriculture)*. 11(3).
- Pelczar, M. J. and Chan, ECS. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. UI Press, Jakarta.
- Pelczar, M. J., & Chan, E. C. S. 1988, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Volume 2. UI PRESS, Jakarta.
- Petrini, O., P. J. Fisher, dan L. E. Petrini. 1992. Fungal Endophytes of Bracken (*Pteridium aquilinum*), with Some Reflections on Their Use in Biological Control. *Sydowia*. 44: 282-293.
- Petrini, Stone, and Carroll, E. 1982. Endophytic Fungi in Evergreen Shrubs in Western Oregon A Preliminary Study. *Canadian Journal of Botany*. 60: 789-796.
- Prihatiningtias, W. Widyastuti, S.M, dan Wahyuono, S. Tanpa tahun. *Aktivitas Anti-bakteri Fungi Endofit Thievalia Polygonoperda, Isolat Dari Tumbuhan Akar Kuning (Fibraurea Chloroleuca Miers)*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Pokhrel CP and S Ohga. 2007. Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. *Food Chemistry*.105,641-646.
- Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2(3): 113-126.
- Rao, S. 2008. *Sterilization and Disinfection*. Diakses pada 14 Juni 2017. [www.microrao.com/micronotes/sterilization.pdf](http://www.microrao.com/micronotes/sterilization.pdf).
- Reynolds, Jackie & Richland college. 2011. Kirby-Bauer Test for Antibiotic Susceptibility. BIOL 2420. 1-4.
- Rianto, L. Indri. Annisa. 2015. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Biji Srikaya (*Annona Squamosa L.*) Sebagai Antidiare Yang Disebabkan Oleh Bakteri *Shigella Dysenteriae* Dengan Metode Difusi Cakram. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 1(2).
- Rijayanti, R. K., 2014, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mangga Bacang (*Mangifera Foetida L.*) terhadap *Staphylococcus Aureus* Secara *In Vitro*, *Naskah Publikasi*, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura.

- Rubiyanto, Dwiwarso. 2016. *Teknik Dasar Kromatografi*. CV Budi Utama, Yogyakarta.
- Rubiyanto, Dwiwarso. 2017. *Metode Kromatografi: Prinsip Dasar, Praktikum, dan Pendekatan Pembelajaran*. CV Budi Utama, Yogyakarta.
- Rusman, Y., 2006. Isolation of new secondary metabolites from sponge associated and plant derived endophytic fungi. *Disertasi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Heinrich-Heine, Dusseldorf Jerman.
- Sack DA, Lyke C, Laughlin CM, Suwanvanichkij V. *Antimicrobial Resistance In Shigellosis, Cholera And Campylobacteriosis*. Diakses pada 13 April 2017. <<http://www.who.int/emc-documents/antimicrobial-resistance/docs/shigellosis.pdf>>.
- Saifudin, Aziz. 2012. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder: Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*. CV Budi Utama, Yogyakarta.
- Sajise PE, Palis RK, Norcio NV, Lales JS. 1974. The biology of *C.odorata* L. King and Robinson. 1. Flowering behaviour, pattern of growth and nitrate metabolism. *Philippine Weed Science Bulletin*. 1:17-24.
- Setiabudi, R. 2007. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI, Balai Penerbit FKUI, Jakarta.
- Sherma, J. dan B. Fried. 2003. *Handbook of Thin-layer Chromatography*. 3<sup>rd</sup> Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Simanjuntak, P., Parwati, T., Bustanussalam, Prana, T. K., Wibowo, S., Shibuya, H. 2002. Isolasi dan kultivasi mikroba endofit penghasil senyawa alkaloid kinkona dari *Chinchona* spp. *Mikrobiologi Indonesia*. 7: 27-30.
- Sinaga, E., Noverita, Dinah Fitria, 2009. Isolasi Dan Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit Dari Daun Dan Rimpang Zingiber ottensii Val. *Jurnal Farmasi Indonesia* Vol. 4
- Sipayung A., RD, DE, Chenon dan, PS, Suhadto. 1991. Observations on *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King and H. Robinson in I: 43-49 Indonesia. Second International Workshop on the Biological Control and Management of *Chromolaena odorata*. *Biotrop Special Publication* 44: 43-49.
- Strobel G, Daisy B, dan Castillo U, Harper J. 2004. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *J Nat Prod*. 67:257-268.

- Strobel GA., and B. Daisy. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(4):491-502.
- Strobel, G., Daisy, B. dan Castillo, U. 2005. The biological promise of microbial endophytes and their natural products. *Plant Pathology Journal.* 4: 161-176.
- Strobel, G.A. 2003. Endophytes as Sources of Bioactive Products. *Microbes and Infection, Elsevier.* 5(6): 535-544.
- Strobel, GA., Ford, E., Woapong, J., Harper, J. K., Arif, A. M., Grant, D. M., Fung P. C. W., Chan, K. 2002. Isopestacin, An Isobenzopuranone from *Pestalotiopsis Microspora*, Prossesing Antifungal and Antioxidant Activities. *Phytochemistry.* 60:179-183.
- Sundari. 2012. Suatu Model Pengembangan Media Pembelajaran Slide Culture untuk Pengamatan Struktur Mikroskopik Kapang pada Matakuliah Mycology. *Jurnal bioedukasi.* 1.
- Suwandi, U. 1989. *Mikroorganisme Penghasil Antibiotik.* Pusat Penelitian dan Pengembangan PT. Kalbe Farma. Jakarta.
- Suwandi U. 1992. Mekanisme Kerja Antibiotik. Pusat Penelitian dan Pengembangan P.T. Kalbe Farma. Jakarta. *Cermin Dunia Kedokteran* 76: 10-11.
- Syarmalina. 2008. *Endofit dan Pelestarian Alam.* Diakses pada Mei 10 2017. <http://www.isfinational.or.id>.
- Tan, R.X. dan W.X. Zou. 2001. Endophyte: A Rich Source of Functional Metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18: 448-459.
- Tanaka, M., Sukiman, H., Takebayashi, M., Saito, K., Suto, M., Prana, M.S., and Tomita, F., 1999. Isolation, Screening and Phylogenetic Identification of Endophytes from Plants in Hokaido Japan and Java Indonesia. *Microbes and Environment* 14(4):237–241.
- Todar, Kanneth. 2012. *Todar's Online Textbook of Bacteriology.* Diakses pada 7 April 2017. <<http://textbookofbacteriology.net/Shigella.html>>.
- Todar,K. 2009. *Online Textbook of Microbiology.* Diakses pada 21 April 2017 <<http://www.textbookofbacteriology.net/>>.
- Ulrich K, Ulrich A, dan Ewald D. 2008. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiol Ecol.* 63:169–180

- UNICEF (2018). Undernutrition contributes to nearly half of all deaths in children under 5 and is widespread in Asia and Africa. Diakses pada 12 September 2017. <<https://data.unicef.org/topic/nutrition/malnutrition/>>.
- Valera, M. C., Silva, K. C. G., Maekawa, L. E., Carvalho, C. A. T., Kogaito, C. Y., Camargo, C. H. R., Lima, R. S. 2009. Antimicrobial Activity of Sodium Hypochlorite Associated with Intracanal Medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* Inoculated in Root Canals. *Journal of Applied Oral Science*. 17(6): 555-559.
- Villaseñor, I.M., A.P. Canlas, K.M. Faustino, & K.G. Plana. 2004. Evaluation of the Bioactivity of Triterpene Mixture Isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam Leaves. *Journal of Ethnopharmacol*. 92: 53-56.
- Vineetha, N., R. A. Vignesh, dan D. Sridhar. 2015. Preparation, Standarization of Antibiotic Disc and Study of Resistance Pattern for First-Line Antibiotics in Isolates from Clinical Samples. *International Journal of Applied Research*. 1(11): 624-631.
- Wahyono, Pudjiono, Widyati P. Uji aktivitas senyawa antiplasmodium dari fungi endofit tanaman *Artemisia annua* L. *Majalah Farmasi Indonesia*. 2010;21(4):230-5.
- Waites, M. J., Morgan, N.L., Higton. G., dan Rockey, J.S. 2001. *Industrial Microbiology: An Introduction*. Blackwell Science, London.
- Welk, Gerk dan Hager, Ron. 2010. *Lifestyles for Health, Fitness, and Wellness* (Vol.1). New York: Mc Graw Hill.
- Weni, Wilia, Sri Mulyati, Husda Marwan, Yulia Alia, Rike Puspitasari Tamim. 2008. Penyuluhan pemanfaatan Cendawan Antagonis *Trichoderma sp.*, untuk Pengendalian Penyakit Tanaman pada Petani di Desa Sumber Jaya Kec. Kumpeh Ulu Kab. *Jurnal Pengabdian pada Masyarakat*. 45: 19-23.
- WHO. (2013). *Diarrhoeal Disease*. Diakses pada 12 September 2017. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>>
- Yu, H., Zhang, L., Lin, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P., and Qin, L. 2010. Recent Developments and Future Prospects of Antimicrobial Metabolites Produced by Endophytes. *Microbiology Research Elsevier*. 265: 437-449
- Yulia, P. R. 2005. Isolasi Dan Seleksi Kapang Endofit Penghasil Antimikroba Pada Beberapa Tanaman Obat Tradisional Indonesia. Skripsi. Universitas Indonesia.

- Yulianti, Titiek. 2012. Menggali potensi endofit untuk meningkatkan kesehatan tanaman tebu mendukung peningkatan produksi gula. *Perspektif*. 11 (2): 111-122.
- Zhang, B., Salituro, G., Szalkowski, D., Li, Z., Zhang, Y., Royo, I., Vilella, D., Dez, M., Pelaes, F., Ruby, C., Kendal, RL., Griffin, P., Calaycay, J., Zierath, JR., Heck, JV., Smith, RG., and Moller, DE. 1999. Discovery of small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science*. 284(5416): 974-981.
- Zinniel, DK, Lambrecht, P, Haris, NB., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, CA., Arunakumari, A., Barletta, RG., and Vidader, AK. 2002. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomics Crops and Prairie Plants. *Appl Environ Microbiol*. 68: 2198-2208.

