

Analisis Kandungan Metabolit Sekunder dan Uji aktivitas Antibakteri Jamur Endofit Batang Binahong (*Anredera CORDIFOLIA Steenis*)

Elisabeth I. P. Bria, Antonius R. B. Ola*, Theo Da Cunha

Program Studi Kimia FST UNDANA, Kupang Indonesia

Article Received: 20 August 2019

Article Accepted: 10 October 2019

Abstract

The isolation of endophytic fungi (*penicillium sp*) from binahong stem had been undertaken with the objective to determine its content of secondary metabolites and its antibacterial activity. The content of secondary metabolites was analyzed with HPLC and its antibacterial activity was measured using paper disc diffusion method. The results showed that there were four compounds in the HPLC chromatogram detected at 235 nm. The antibacterial activity for methanol and ethyl acetate extracts were observed for its diameter of zone inhibition at 18.2 mm and 16.7 mm for *S.aureus* and 17.8 mm and 16.3 mm for *E. Coli*.

Keyword : Endophytic fungi, *penicillium sp*, binahong stem, secondary metabolite.

Abstrak

Telah dilakukan isolasi jamur endofit jenis *Penisilium sp* dari batang binahong untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder dan aktivitas antibakterinya. Penentuan kandungan senyawa dianalisis menggunakan HPLC dan pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram kertas. Hasil analisis menunjukkan ada empat senyawa pada kromatogram HPLC yang dideteksi panjang gelombang 235 nm. Aktivitas antibakteri pada ekstrak methanol dan ekstrak etil asetat berturut-turut adalah 18.2 mm dan 16.7 mm untuk *S.aureus* serta 17.8 mm dan 16.3 mm untuk *E. Coli*.

Kata kunci : jamur endofit, *Penisilium sp*, batang binahong, metabolit sekunder

PENDAHULUAN

Penelitian tentang jamur endofit sebagai penghasil senyawa yang baru dan mempunyai aktivitas biologis berkembang dengan sangat pesatnya. Dengan demikian, organisme endofitik memiliki potensi yang sangat besar untuk dieksploitasi, sehingga dapat menghasilkan senyawa yang berguna¹⁻¹¹.

*Corresponding Author: Jl. Adisucipto-Penfui Kupang 85110 telp.(+62380)8037977,
e-mail: antonius.ola@staf.undana.ac.id

Tanaman binahong terdapat di NTT secara empiris dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Seluruh bagian tanaman menjalar ini berkhasiat mulai dari akar, batang dan daunnya¹²⁻¹³. Oleh karena itu, diperkirakan jamur endofit yang terdapat dalam tanaman ini memiliki kandungan senyawa *drug* atau *lead drug* yang selanjutnya dapat dikembangkan.

Hasil dan Pembahasan

Karakteristi Media Agar PDA (Potato dextrose agar)

Pada proses isolasi dan pemurnian jamur media yang digunakan adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA) sebagai makanan dan nutrisi untuk pertumbuhan jamur. Penanaman kultur dilakukan pada media agar PDA dikarenakan dalam media agar tersebut terkandung nutrien-nutrien penting yang dibutuhkan oleh jamur untuk perumbuhannya. Di dalam PDA terdapat beberapa komponen utama antara lain ekstrak kentang, dekstrosa, protein dan agar-agar.

Dalam pembuatan media PDA ditambahkan kloramfenikol yang berperan sebagai antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri dan menghindari terjadinya kontaminasi dengan mikroba disekitar.

Isolat jamur endofit

Jamur endofit yang dihasilkan dari tumbuhan inang dapat menghasilkan jenis isolat yang berbeda-beda dan jumlah bervariasi.. Hal ini merupakan mekanisme adaptasi dari endofit terhadap mikroekologi dan kondisi fisiologis yang spesifik dari masing-masing tumbuhan inang. Dari pengamatan bahwa jamur tumbuh pada media PDA setelah hari kedua. Jamur yang telah tumbuh kemudian dilakukan pemurnian untuk mendapatkan isolat murni.

Isolat murni jamur endofit

Pemurnian jamur bertujuan untuk memisahkan koloni endofit dengan mengamati perbedaan morfologi koloni. Pada umumnya jamur hidup dalam suhu ruangan sehingga sampel diinkubasi pada suhu ruangan. Setelah jamur endofit berhasil dimurnikan, kemudian setiap 2 minggu diremajakan pada media PDA agar jamur tidak berada dalam fase kematian.

Berdasarkan hasil pengamatan menunjukkan peremajaan yang dilakukan pada jamur endofit batang binahong. menunjukkan pada hari ketiga jamur sudah mulai tumbuh pada permukaan media PDA, dan jamur semakin banyak memenuhi permukaan media PDA pada hari ke tujuh.

Dari hasil pengamatan secara makroskopis isolat diatas teridentifikasi sebagai jamur *penicillium*. Berdasarkan ciri makroskopis bahwa koloni biasanya tumbuh cepat, dalam nuansa hijau, kadang-kadang putih, sebagian besar terdiri dari *konidiofor* yang padat. *Penicillium* dikenali dari struktur bantalan spora seperti sikat yang disebut *penicilli* (*penicillus*). *Konidiofor* sederhana atau bercabang dan diakhiri oleh kelompok *phialides* berbentuk labu. Spora (*konidia*) diproduksi dalam rantai kering dari ujung *phialides*, dengan spora termuda di dasar rantai, dan hampir selalu hijau¹⁴. Hal ini diperkuat berdasarkan hasil foto mikroskop teridentifikasi sebagai jamur *penicillium* dengan ciri-ciri memberikan penampilan seperti sikat (*penicillus*). *Penicillus* berisi cabang dan *metulae* (cabang kedua dari belakang yang mengandung lingkaran *phialides*). *Konidia* berada dalam rantai kering yang panjang, divergen atau dalam kolom, berbentuk bulat, silinder, hialin atau kehijauan, halus dan berding kasar.

Kandungan Senyawa Kimia Jamur Endofit

Media yang digunakan dalam kultivasi ini adalah media beras cap *nona kupang* sebagai pemberi nutrisi seperti karbohidrat dan air yang sebelumnya di disterilkan dengan autoclave. Pada tahap kultivasi ini jamur ditumbuhkan pada media nasi selama 30 hari dengan tujuan jamur dapat tumbuh memenuhi seluruh permukaan media nasi sampai pada dasar.

Jamur mulai tumbuh pada permukaan media nasi pada hari ke-4. Hal ini dapat dilihat dari hifa jamur yang sudah mulai tumbuh di permukaan media nasi. kultivasi jamur dilakukan selama 1 bulan dengan tujuan agar jamur dapat tumbuh mencapai dasar erlenmeyer sehingga menghasilkan senyawa bioaktif yang lebih banyak.

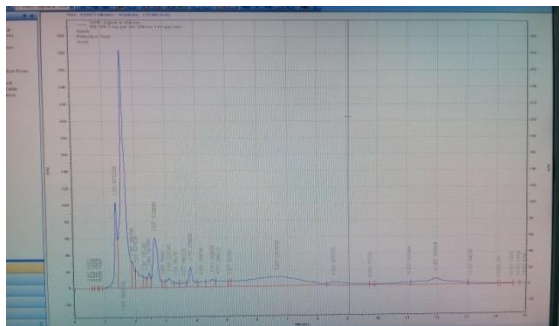
Pelarut yang digunakan dalam proses maserasi ini adalah methanol sebanyak 200 ml. Kisaran waktu perendaman selama 4 hari, agar waktu kontak pelarut dengan sampel semakin banyak dan senyawa aktif yang diekstrak semakin banyak

Berdasarkan hasil evaporasi berat ekstrak yang diperoleh yaitu botol 1 : 14,8 gram, botol 2: 14,34 gram dan berat sampel botol 3: 16,61 gram. Ekstrak tersebut telah menghasilkan rendemen sebesar 11,4375% dari total 400 mL larutan terekstrak. Ekstrak kemudian dipartisi.

. Pada proses partisi ini ekstrak metanol dicampurkan ke dalam pelarut etil asetat sebanyak 200 ml dan ditambahkan dengan akuades dan di evaporasi pada suhu 40 °C Berdasarkan hasil evaporasi berat ekstrak yang diperoleh sebesar 0,203 gram dengan rendemen sebesar 0,1015%.

Analisis Ekstrak High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

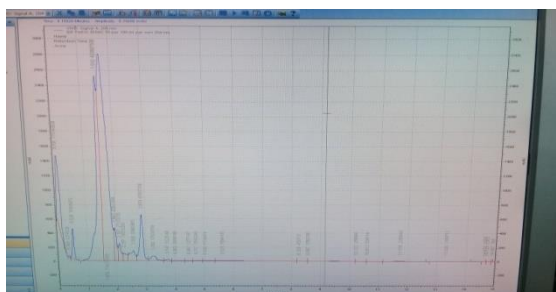
Hasil Analisis HPLC jamur endofit ekstrak metanol batang binahong dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kromatogram HPLC Ekstrak methanol batang binahong

Berdasarkan Gambar 1 bahwa ekstrak batang binahong yang dianalisis menghasilkan kromatogram dalam bentuk *peak*. *Peak* yang ditampilkan muncul pada menit 1.373, laju alir 1 ml/menit dengan waktu 15 menit dengan panjang gelombang 204 nm. *Peak* tertinggi berada Pada *retention time* 1.607 dengan tinggi 280 nm menggunakan jenis kolom ACE 5 C18 dengan ukuran kolom 150 x 4.6 mm ACE-121-1346 A87562.

Analisis HPLC Ekstrak etil setat batang binahong hasil partisi



Gambar 2. Kromatogram HPLC ekstrak etil asetat hasil partisi

Berdasarkan Gambar 2 menunjukkan bahwa pada menit 0,100 *peak* pertama muncul dan *peak* tertinggi muncul pada *retention time* 1.670 dengan tinggi *peak* 2.800 nm dan panjang gelombang 204 nm pada laju alir 1 ml/menit Selama 15 menit menggunakan jenis kolom ACE 5 C18 dengan ukuran kolom 150 x 4,6 mm ACE-121-1346 A87562.

Aktivitas Antibakteri

a. Metode Pecandang

Pada penentuan daya hambat setiap bakteri patogen, digunakan antibiotik tetrasiklin 200 μL dengan konsentrasi 30 mg/mL sebagai kontrol positif dan akuades 200 μL sebagai kontrol negatif, sedangkan sampel yang digunakan adalah ekstrak methanol 5 mg yang diencerkan dalam 1 mL metanol.

Tabel 1. Diameter daerah hambatan pertumbuhan bakteri oleh ekstrak methanol jamur endofit batang binahong menggunakan pecandang.

No	Jenis Bakteri	Diameter Daerah Hambat (mm)		
		Ekstrak methanol jamur endofit batang binahong (200 μL)	Tetrasiklin (kontrol positif) (200 μL)	Akuades (kontrol negatif) (200 μL)
1	<i>Staphylococcus aureus camp</i>	18,2	18,9	0
2	<i>Escherichia coli 0175H7</i>	17,8	18,9	0

Berdasarkan data Tabel 1, hasil uji aktivitas antibakteri dari ekstrak methanol jamur endofit dari batang binahong terhadap bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*) memiliki daya hambat bakteri sebesar 18,2 mm dan pada gram negatif (*Escherichia coli*) memiliki daya hambat bakteri sebesar 17,8 mm. Sedangkan pada kontrol positif menggunakan antibiotik tetrasiklin memiliki daya hambat terhadap bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*) sebesar 18,9 mm dan bakteri gram negatif (*Escherichia coli*) yaitu 18,9 mm. sedangkan pada kontrol negatif menggunakan aquades tidak memiliki daya hambat.

b. Metode Cakram Kertas

Diteteskan 10 μL ekstrak yang merupakan hasil partisi dengan pelarut etil asetat sebanyak 3 mg diencerkan dengan methanol 100 μL dan akuades 900 μL (1 : 9), sedangkan antibiotik tetrasiklin dengan konsentrasi 30 mg/mL sebagai kontrol positif dan kontrol negatif yang digunakan adalah metanol 100 μL dan akuades 900 μL (1 : 9). Aktivitas antibakteri dapat dilihat pada daerah jernih di sekitar kertas cakram.

Tabel 2. Diameter daerah hambatan pertumbuhan bakteri oleh ekstrak etil asetat hasil partisi menggunakan kertas cakram.

No	Jenis Bakteri	Diameter Daerah Hambat (mm)		
		Ekstrak methanol jamur endofit batang binahong (10 µL)	Tetrasiklin (kontrol positif) (10 µL)	Methanol +Akuades (kontrol negatif) (10 µL)
1	<i>Staphylococcus aureus camp</i>	16,7	17,4	14,8
2	<i>Escherichia coli 0175H7</i>	16,3	18,9	14,4

Berdasarkan data Tabel 2, hasil uji aktivitas antibakteri dari ekstrak hasil partisi jamur endofit dari batang binahong terhadap bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*) memiliki daya hambat bakteri sebesar 16,7 mm dan pada gram negatif (*Escherichia coli*) memiliki daya hambat bakteri sebesar 16,3 mm. Sedangkan pada kontrol positif menggunakan antibiotik tetrasiklin memiliki daya hambat terhadap bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*) sebesar 17,4 mm dan bakteri gram negatif (*Escherichia coli*) yaitu 18,9 mm. sedangkan pada kontrol negatif methanol ditambahkan dengan aquades pada gram positif (*Staphylococcus aureus*) memiliki daya hambat bakteri sebesar 14,8 mm dan pada gram negatif (*Escherichia coli*) memiliki daya hambat bakteri sebesar 14,4 mm.

Berdasarkan uji aktivitas antibakteri yang telah dilakukan, dapat dilihat bahwa ekstrak methanol jamur endofit *penisilium sp.* menunjukkan kekuatan daya hambat. Jika dibandingkan dengan antibiotik tetrasiklin yang telah teruji memiliki sifat antibakteri sangat kuat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri hingga mampu menghambat pergerakan sampel ekstrak lain.

Penentuan kekuatan aktivitas antibakteri ditentukan berdasarkan standar yang dikemukakan oleh Greenwood yang dikutip oleh Pratama (2005) dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Klasifikasi respon daerah hambatan pertumbuhan bakteri¹⁵

Diameter Daerah Hambatan (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri
≤ 5	Lemah
5-10	Sedang
10-20	Kuat
≥ 20	Sangat Kuat

Pada uji aktivitas antibakteri menggunakan metode pecandang, didapatkan diameter daerah hambat (DDH) yang sangat besar oleh karena itu untuk memastikan DDH tersebut merupakan DDH dari ekstrak methanol jamur endofit dari batang binahong maka dilakukan lagi uji menggunakan metode kertas cakram yang diketahui lebih efektif karena penggunaan ekstraknya lebih sedikit dibandingkan dengan metode pecandang.

Tabel 3 menunjukkan bahwa DDH ekstrak jamur endofit dari batang binahong terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif termasuk dalam aktivitas antibakteri lemah. Hal ini dikarenakan pada uji menggunakan metode pecandang ekstrak tersebut diencerkan dengan pelarut metanol yang diketahui memiliki sifat sebagai antiseptik sehingga memperbesar DDH. Jika DDH dari ekstrak dikurangi dengan DDH dari methanol + aquades diperoleh nilai yang kecil yakni 1,9. Oleh sebab itu diduga bahwa ekstrak dari jamur endofit dari batang binahong memiliki aktivitas antibakteri yang lemah. Untuk uji antibakteri menggunakan metode kertas cakram, bakteri gram negatif dan gram positif yang digunakan dalam penelitian ini memiliki konsentrasi 10^8 CfU/mL. Bakteri tersebut telah dihambat dengan antibiotik tetrasiklin 10 μ L dari konsentrasi 30 mg/mL dan 10 μ L ekstrak methanol dari konsentrasi 3 mg/mL. Perbandingannya 10:1, yang berarti jumlah ekstrak tersebut memiliki kandungan 10 kali lebih kecil dari antibiotik tetrasiklin. Hal ini menunjukkan bahwa jika jumlah ekstrak jamur endofit dibuat dalam konsentrasi yang lebih besar atau sama dengan tetrasiklin kemungkinan akan mampu menghasilkan daya hambat bakteri yang kuat. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak methanol jamur endofit dari batang binahong memiliki potensi antibiotik walaupun hanya sedikit.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil kromatogram HPLC pada ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat hasil partisi berturut-turut menunjukkan empat senyawa dengan satu peak mayor sebagai senyawa bioaktif yang muncul pada waktu retensi 1.607 dengan tinggi peak 280 nm dan waktu retensi 1.670 dengan tinggi peak 2800 nm. Ekstrak methanol dari batang binahong termasuk antibakteri lemah yaitu pada gram positif *Staphylococcus aureus camp.* memiliki daya hambat

bakteri sebesar 1,9 mm dan gram negatif *Escherichia coli* 0175H7 memiliki daya hambat bakteri sebesar 1,9 mm.

Daftar Pustaka

- Ola, A. R. B., Amal, H. A., Ilka, Z., Alexandra, H., Attila, M., Matthias, K., Heike, B. O., Tibor, K., Peter, Proksch., Abdessamad, D., 2014, Absolute Configuration and Antibiotic Activity of Neosartorin from the Endophytic Fungus *Aspergillus fumigatiaffinis*, *Tetrahedron Letters.*, 55, 1020–1023.
- Ola, A. R. B., Amal, H. A., Ilka, Z., Alexandra, H., Attila, M., Matthias, K., Heike, B. O., Tibor, K., Peter, Proksch., Abdessamad, D., 2014, Absolute Configuration and Antibiotic Activity of Neosartorin from the Endophytic Fungus *Aspergillus fumigatiaffinis*, *Tetrahedron Letters.*, 55, 1020–1023.
- Ola, A. R. B., Amal, H. A., Wen, H. L., Victor, W., Abdessamad, D., 2014, Absolute configuration and Revision of the Structure of Lateritin, *Tetrahedron Letters.*, 55, 3147–3150.
- Ola, A. R. B., Heike, B. O., Abdessamad, D., Peter, P., and Amal, H. A., 2014, Dihydroanthracenone Metabolites from the Endophytic Fungus *Diaporthe melonis* Isolated from *Annona squamosa*, *Tetrahedron Letters.*, 55, 3133–3136.
- Gutierrez, R.M.P., Gonzalez, A.M.N., and Ramirez, A.M., 2012, Compounds Derived from Endophytes: A Review of Phytochemistry and Pharmacology., 19, 2992-3030.
- Hammerschmidt, L., Ola, A., Werner, E. G. M., WenHan, L., Attila, M., Tibor, K., Peter, P., Amal, H. A., 2015, Two New Metabolites from the Endophytic Fungus *Xylaria* sp. Isolated from the Medicinal Plants *Curcuma Xanthorrhiza*, *Tetrahedron Letters.*, 56, 1193–1197.
- Huang *et al.*, 2008, Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus of *phomopsins* sp., *ZHU_H76. Phytochemistry.*, 69, 1604-1608.
- Kjer, J., Wray, V., Edrada-Ebel, R. A., Ebel, R., Pretsch, A., Lin, W. H., 2009, Proksch P. Xanalteric Acids I and II and Related Phenolic Compounds from an Endophytic *Alternaria* sp. Isolated from the Mangrove Plant *Sonneratia Alba*, *J Nat Prod.*, 72, 2053-2057
- Kour, A., Shawl, A. S., Rehman, S., Sultan, P., Qazi, P. H., Suden, P., Khajuria, R. K., Verma, V., 2008, Isolation and Identification of an Endophytic Strain of *Fusarium Oxysporum* Producing Podophyllotoxin from *Juniperus Recurva*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology.*, 24, 1115-1121.
- Losgen, S., Magull, J., Schulz, B., Draeger, S., and Zeeck, A., 2008, Isofusidienols: Novel Chromone-3-Oxepines Produced by the Endophytic Fungus *Chalara* sp., *Eurp J, Org Chem.*, 4, 698-703.
- Aly, Amal H, Abdessamad Debbab, Julia Kjer, dan Peter Proksch.2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungi Diversity* 41(1), 1-16.
- Darsana, I.G.O., Besung, I.N.K., & Mahatmi, H. (2012). Potensi daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (tenore) Steenis) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia Coli* secara *In Vitro*. *Indonesia Medicus Veterinus*, 1(3), 337-351.
- Rimporok, S., Kepel, B. J., Siagian, K. V., 2015, Uji Aktivitas Ekstrak Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* Steenis) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus Mutans* Secara *In Vitro*, *Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT* Vol. 4 No. 4 2302 – 2493
- Visagie CM, Houbraeken J, Frisvad JC, et al. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 78: 343–371.
- Pratama, M. R. 2005. Pengaruh ekstrak jeruk kayu siwak (*Salvadora persica*) terhadap pertumbuhan bakteri *staphylococcus mutans* dan *S. Aureus* dengan metode difusi agar.

Laporan hasil penelitian program studi biologi Fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam Institut teknologi sepuluh November.

Metode

Pembuatan PDA (Potato Dextrose Agar)

Sebanyak 19,5 gram PDA dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan dengan 0,02 gram kloramfenikol kemudian dilarutkan dengan 500 ml akuades. Setelah itu *diautoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 1,5 atm selama 30 menit. Hasil dari *autoclave* kemudian didinginkan ± 15 menit lalu dituang perlahan ke dalam cawan petri steril.

Isolasi Jamur Endofit

Sampel batang binahong dipotong menjadi bagian-bagian kecil dengan masing-masing ukuran 0,5 x 0,5 cm. Potongan sampel kemudian direndam selama 30 detik secara bergantian dengan alkohol 70% dan akuades, sebanyak 3x. Setelah itu potongan sampel ditiriskan dalam cawan petri berisi tissue, lalu dipindahkan menggunakan pinset steril dan diletakkan di atas media PDA dalam cawan petri. Setiap cawan petri dimasukkan 4 potongan sampel dan di samping cawan petri diisolasi menggunakan parafilum kemudian diinkubasi pada suhu ruangan.

Pemurnian Jamur Endofit

Pemurnian jamur dilakukan dengan memotong jamur menjadi 3 bagian yaitu ujung, tengah dan depan sampel. Selanjutnya bagian dari jamur tersebut diambil menggunakan jarum ose yang sebelumnya dipijarkan terlebih dahulu di atas bunsen, kemudian diletakkan ke dalam media PDA baru dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu ruangan.

Kultivasi

Persiapan Media

Sebanyak 100 gram beras cap nona kupang dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1000 mL, kemudian ditambahkan dengan 120 mL akuades. Setelah itu erlenmeyer ditutup dengan kapas steril dan alumunium foil, lalu *diautoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 30 menit.

Proses Kultivasi

Jamur endofit murni dibagi menjadi 4 bagian dan setiap bagian jamur dipotong kotak-kotak 0,5 x 0,5 cm. Selanjutnya dimasukkan 5-7 potongan ke dalam masing-masing media beras yang telah diautoclave. Kemudian erlenmeyer ditutup dengan kapas steril dan aluminium foil, lalu diisolasi dengan parafilm. Setelah itu, disimpan pada suhu ruangan (25 °C) dan diamati pertumbuhan jamur 3-4 minggu.

Maserasi

Jamur hasil kultivasi yang telah tumbuh memenuhi media beras hingga bagian dasar erlenmeyer, selanjutnya dimasukkan metanol sebanyak 120 mL (b/v dalam mg/mL) lalu diaduk hingga tercampur. Kemudian campuran didiamkan selama 4 hari dan disaring menggunakan kertas saring whatman. Filtrat yang diperoleh kemudian dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C .

Analisis HPLC

Ekstrak metanol jamur endofit sebanyak 19,2 mg yang diperoleh dari hasil evaporasi dihomogenkan dengan 1 mL etil asetat kemudian diambil 0,5 mL dan ditambahkan 1,5 mL metanol HPLC 100 % kemudian dianalisis jumlah kandungan senyawa kimia dengan HPLC menggunakan kolom analitik C18 (150 x 4,6 mm) dengan laju alir 0,5 mL/min dan waktu alir 20 menit.

Uji Aktivitas Antibakteri

Pembuatan Media

Sebanyak 2 gram *Nutrien agar* dilarutkan dengan 100 mL akuades, kemudian dipanaskan sampai homogen. *Nutrien agar* yang ada disterilisasi dalam autoclave sampai suhu 121 °C. *Nutrien agar* dituang ke dalam cawan petri dan didiamkan sampai membentuk agar.

Preparasi Kultur Uji

Setiap isolat uji diinokulasi ke dalam *Nutrien agar* dan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Tahap selanjutnya, dibuat pengenceran bakteri 10^1 Cfu/mL dengan standar kekeruhan *Mc Farland*. Jumlah sel yang hidup dipakai untuk diuji pada media hidup.

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Kultur taburan (*S.aereus*, *S.enteritidis* dan *E. coli*) dibuat pada media *Nutrien agar*. Kemudian dengan pinset yang steril, diambil potongan kertas saring berbentuk cakram dengan

diameter 0,66 cm diletakan di permukaan kultur taburan, selanjutnya diteteskan ekstrak etil asetat jamur endofit konsentrasi 5 mg/mL dan akuades dengan mikro pipet, dan diinkubasi lagi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian diameter zona hambat diukur dengan *colony counter*. Daya penghambatan terlihat dengan adanya zona jernih di sekitar kertas saring.

Sensidisk atau pecandang diletakkan diatas permukaan media dan diisi 200 µL larutan pembanding dan larutan uji. Untuk 1 medium terdiri dari 3 pecandang yang terbagi menjadi 1 kontrol positif berisi tetrasiklin 30 mg/ml, 1 kontrol negatif berisi akuades dan 1 pecandang berisi ekstrak dengan konsentrasi 5 mg/mL. Setelah itu diinkubasi lagi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian diameter zona hambat diukur dengan *colony counter*. Daya penghambat terlihat dengan adanya zona jernih disekitar pecandang.