

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Indonesia merupakan negara yang memiliki kawasan pesisir pantai sangat luas yang ditumbuhi berbagai jenis tumbuhan pantai. Salah satu contoh tumbuhan pantai yang banyak dijumpai adalah mangrove. Mangrove merupakan salah satu jenis tumbuhan pantai, yang memiliki fungsi terutama untuk mempertahankan keseimbangan, mencegah abrasi pantai serta menjaga keindahan dari kawasan pantai. Mangrove terdiri atas berbagai jenis seperti semak, palma, dan tumbuhan paku-pakuan. Secara umum hutan mangrove yang masih utuh terdiri dari jenis-jenis vegetasi dominan yang diklasifikasikan ke dalam empat famili yaitu *Rhizophoraceae*, *Avicenniaceae*, *Sonneratiaceae*, dan *Ceriops*. (Bengen, 2001).

Hutan mangrove adalah komunitas vegetasi pantai tropis dan merupakan komunitas yang hidup didalam kawasan yang lembab dan berlumpur serta dipengaruhi oleh pasang surut air laut. Mangrove disebut juga sebagai hutan pantai, hutan payau atau hutan bakau. Pada umumnya formasi tanaman didominasi oleh jenis-jenis tanaman bakau, oleh karena itu istilah bakau digunakan hanya untuk jenis-jenis tumbuhan dari genus *Rhizophora*, sedangkan istilah mangrove digunakan untuk segala tumbuhan yang hidup di sepanjang pantai atau muara sungai yang dipengaruhi pasang surut air laut (Harahap, 2010).

Dari keseluruhan mangrove di dunia, Indonesia memiliki kawasan terluas (3,189 juta hektar), diikuti oleh Brazil (1,300 juta

hektar), Australia (0,991 juta hektar) dan Meksiko (0,77 juta hektar). Luas mangrove Indonesia diperkirakan sekitar 20,9% dari total mangrove dunia (Spalding, Kainuma and Collins, 2010).

Menurut Soemodihardjo *et al.* (1993), jenis mangrove di Indonesia terdiri dari 15 famili, 18 genus, 41 spesies mangrove sejati, dan 116 spesies asosiasi mangrove. Salah satu dari spesies yang banyak ditemukan di Indonesia adalah *Rhizophora mucronata* Lam. atau yang biasa dikenal dengan sebutan bakau. Batang dari *Rhizophora mucronata* umumnya digunakan oleh masyarakat pesisir sebagai bahan kayu bakar, bangunan, dan pembuat kapal. Belum banyak dari masyarakat pesisir yang mengetahui manfaat dari *Rhizophora mucronata* sebagai bahan obat terutama sebagai antimikroba.

Pencarian sumber senyawa bioaktif terus-menerus dilakukan seiring dengan semakin banyaknya penyakit-penyakit baru yang bermunculan, mulai dari penyakit infeksi, kanker dan beberapa penyakit berbahaya lainnya. Menurut Prihatiningtias (2005), senyawa bioaktif dapat diperoleh dari beberapa sumber, yakni dari tumbuhan, hewan, mikroba dan organisme laut. Oleh sebab itu penting untuk mengeksplorasi lebih lanjut potensi mangrove *Rhizophora mucronata* terutama sebagai salah satu zat antimikroba yang bisa diaplikasikan sebagai bahan obat pada manusia khususnya sebagai antimikroba. Salah satu cara eksplorasi untuk menemukan sumber antimikroba alami yakni dengan mengembangkan mikroba endofit. Mikroba endofit merupakan mikroba yang hidup pada jaringan tanaman sebagai agen penghasil senyawa metabolit sekunder. Mikroba endofit hidup di antara sel

tumbuhan dan bersimbiosis mutualisme dengan tanaman inangnya (Kumala, Dwi, dan Priyo, 2008).

Salah satu penyebab infeksi adalah bakteri, dan pengobatan untuk infeksi yang disebabkan bakteri adalah dengan pemberian agen antimikroba yang dapat menghambat atau membunuh mikroba yang menginfeksi (Wasito dkk., 2008). Hingga saat ini kebutuhan antibiotik baru masih sangat diperlukan, terutama antibiotik yang dapat melawan bakteri yang resisten, virus, fungi maupun antitumor. Mikroba endofit dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang sangat potensial untuk dikembangkan menjadi obat karena mikroba merupakan organisme yang mudah ditumbuhkan, memiliki siklus hidup yang pendek dan dapat menghasilkan jumlah senyawa bioaktif dalam jumlah besar dengan metode fermentasi. Mikroba endofit dapat diisolasi dari jaringan akar, batang dan daun dan yang paling umum ditemukan adalah dari jenis fungi (Strobel and Daisy, 2003).

Penelitian yang menggunakan bahan alam sebagai sumber senyawa antimikroba telah banyak dilakukan, baik itu dalam bentuk ekstrak maupun fraksi. Penelitian tersebut memiliki kekurangan, yakni bagian tanaman yang digunakan untuk mendapatkan simplisia harus tersedia dalam jumlah besar dan memerlukan waktu tumbuh yang lama agar didapatkan senyawa bioaktif yang banyak. Pengambilan tanaman obat dalam jumlah besar dan terus-menerus dapat mengganggu kelestarian alam, sehingga diperlukan cara yang lebih efektif dalam mengatasi permasalahan tersebut. Cara efektif yang dapat digunakan untuk mengefisienkan sumber senyawa bioaktif yaitu dengan

menggunakan mikroba endofit yang berasosiasi dengan tumbuhan inangnya. Mikroba endofit yang berupa jamur atau bakteri, yang diperoleh dari bagian dalam tumbuhan mampu menghasilkan sejumlah senyawa bioaktif yang sama dengan senyawa bioaktif tumbuhan tanpa harus mengekstraksi bagian tumbuhan, sehingga tidak mengganggu kelestarian tumbuhan tersebut (Radji, 2005).

Pengembangan mikroba endofit yang diisolasi dari suatu tanaman lalu kemudian dibiakkan, dapat lebih memudahkan dalam mendapatkan metabolit sekunder tanpa harus melalui proses ekstraksi dari suatu tanaman (Simarmata, Lekatompessy dan Sukiman, 2007). Menurut Susilowati, Saraswati dan Yuniarta (1992) pemanfaatan mikroba endofit dalam memproduksi senyawa aktif mempunyai kelebihan yaitu dapat diproduksi dengan skala yang besar tanpa biomassa yang sangat banyak, kemungkinan diperoleh komponen bioaktif baru dan penanganan yang lebih cepat dengan hasil mutu yang seragam. Kelebihan lain dari pemanfaatan mikroba endofit menurut Kumala (2014) adalah mikroba endofit lebih mudah dimanipulasi secara genetik dibandingkan tanaman atau inangnya.

Tarman, Safitri dan Setyaningsih (2013) telah melakukan percobaan untuk mengisolasi fungi endofit dari daun tanaman bakau (*Rhizophora mucronata*) dengan menggunakan metode sterilisasi permukaan. Daun tanaman bakau (*Rhizophora mucronata*) diinokulasi atau ditempelkan langsung ke dalam media PDA (*Potato Dextrose Agar*), kemudian diinkubasi pada suhu ruang (27–29 °C) selama 2-14 hari. Fungi dipilih melalui uji antagonisme (uji yang digunakan untuk membuktikan bahwa

mikroorganisme yang bersifat antagonis dapat menghambat aktivitas mikroorganisme lain yang berada di tempat berdekatan). Uji antagonisme dilakukan untuk mendapatkan isolat fungi yang potensial untuk selanjutnya digunakan pada uji aktivitas antibakteri. Isolat fungi yang dipilih kemudian dikarakterisasi secara makroskopis dan mikroskopis. Pemanenan dilakukan dengan memisahkan kultur media dan miselium. Konsentrasi ekstrak miselium yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,5 mg, 1 mg dan 2 mg. Pada penelitian ini diperoleh lima isolat fungi dengan morfologi berbeda, fungi DS1 merupakan isolat terpilih dari hasil uji antagonisme. Kurva pertumbuhan fungi menunjukkan bahwa isolat DS1 mencapai fase stasioner pada hari ke-15. Ekstrak media kultur menunjukkan daya hambat paling besar terhadap *Pseudomonas aeruginosa* yaitu $18,5 \text{ mm} \pm 3,32$. Zona hambat ekstrak miselium paling besar terhadap *Staphylococcus aureus* yaitu sebesar 2 mm. Ekstrak media kultur lebih efektif sebagai antibakteri dibandingkan dengan ekstrak miselium.

Menurut Suciati, Wardiyanto dan Sumino (2012), kandungan senyawa dalam daun bakau adalah golongan fenolik, alkaloid, saponin dan beberapa senyawa lain. Penelitian tersebut menggunakan ekstrak daun *Rhizophora mucronata* yang diperoleh dari ekstraksi dengan tiga pelarut yaitu metanol, etil asetat, dan heksan. Uji *in vitro* dilakukan untuk melihat aktivitas antibakteri dari ekstrak daun *Rhizophora mucronata* terhadap bakteri *A. salmonicida* dan *Vibrio harveyi*. Uji ini dilakukan dengan menentukan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). Metode ini dilakukan dengan cara menentukan konsentrasi terendah dari

ekstrak daun *Rhizophora mucronata* yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji. Pengujian MIC dilakukan dengan metode *serial tube dilution* dengan cara membuat larutan ekstrak pada media MHB (*Muller Hinton Broth*) dengan konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, dan 500 ppm, pada masing-masing tabung diinokulasi bakteri dengan kepadatan 10^7 CFU/ml lalu diinkubasi selama 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun *Rhizophora mucronata* memiliki aktivitas penghambatan pada uji *in vitro* terhadap bakteri *Vibrio harveyi*. Hal ini ditunjukkan juga pada kurva uji *in vitro* ekstrak daun *Rhizophora mucronata* terhadap *Vibrio harveyi*, jenis sampel DPM (Daun Pucuk Metanol) pada konsentrasi 200 ppm memiliki zona hambat yang paling besar dibanding jenis sampel lainnya yaitu sebesar 14,80 mm. Dari pengamatan diperoleh bahwa jenis sampel DPM (daun pucuk metanol) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* mulai pada konsentrasi 200 ppm. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun bakau berarti kandungan bahan antibakteri juga semakin besar sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi*. Pada perhitungan jumlah koloni bakteri *Vibrio harveyi*, diperoleh pada konsentrasi 300 ppm mampu menekan pertumbuhan secara signifikan dari 1×10^7 CFU/ml menjadi $5,502 \times 10^3$ CFU/ml. Sifat antimikroba suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas yang tinggi, apabila nilai konsentrasi penghambatan bakteri yang terendah (MIC) kecil, tetapi memiliki diameter penghambatan besar (Irianto, 2007).

Penelitian yang dilakukan oleh Suciatmih (2015), berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi fungi endofit dari 5 spesies tanaman mangrove (*Avicennia alba*, *Avicennia marina*, *Bruguiera* sp., *Ceriops* sp. dan *Sonneratia* sp.) yang tumbuh di pantai Sampiran dan pulau Bunaken, Sulawesi Utara. Isolasi fungi dilakukan dengan metode *Direct Planting* dan identifikasi fungi menggunakan karakter morfologi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enam puluh sembilan isolat fungi endofit berhasil diisolasi dari akar, daun dan ranting tanaman mangrove. Dari enam puluh sembilan isolat fungi yang didapatkan, 19 isolat berhasil diidentifikasi sampai spesies, 21 isolat sampai genus dan 29 isolat tidak memiliki spora sehingga tidak dapat diidentifikasi secara mikroskopis dan kemudian diklasifikasikan sebagai isolat yang belum teridentifikasi. Fungi endofit yang terisolasi termasuk dalam kelompok *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Talaromyces* dan *Trichoderma*. Hasil isolasi fungi endofit dari tanaman mangrove *Sonneratia* sp. di pulau Bunaken, Sulawesi utara menunjukkan bahwa jumlah isolat fungi yang berhasil diisolasi dari akar lebih banyak dibandingkan dari daun dan ranting, jumlah isolat fungi yang didapatkan yaitu dari akar sebanyak duabelas isolat fungi, daun sebanyak 5 isolat fungi dan dari ranting sebanyak 10 isolat fungi. hal ini sesuai dengan teori yang dikemukakan oleh Schulz and Boyle (2006).

Pada penelitian ini, akan dilakukan isolasi fungi endofit dari akar tunjang tanaman bakau *Rhizophora mucronata* Lam. Penggunaan bagian akar tanaman bakau didasarkan karena fungi

endofit pada bagian akar sangat melimpah dan memberikan berbagai pengaruh terhadap tanaman antara lain menghasilkan metabolit sekunder yang secara *in vitro* berfungsi sebagai antibakteri, biofungisida dan kandungan herbal yang bermanfaat bagi kesehatan, meningkatkan pertumbuhan tanaman, menekan penyakit pada tanaman dan meningkatkan toleransi tanaman inang terhadap kondisi stress lingkungan (Schulz and Boyle, 2006).

Teknik isolasi mikroba endofit pada akar tunjang tanaman bakau dilakukan dengan metode *Direct Planting* atau metode tanam langsung yang dikemukakan oleh Nakagiri *et al* (2005), yaitu dengan meletakkan bagian tumbuhan yang sudah kering di atas permukaan media agar yang telah ditambahkan kloramfenikol. Seluruh medium yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi pada suhu ruang. Morfologi koloni yang memiliki warna dan ukuran sama dianggap sebagai isolat yang sama dan setiap koloni representatif dipisahkan menjadi isolat-isolat tersendiri. Pemurnian fungi endofit dilakukan dengan cara isolasi spora tunggal (Gandjar *et al*, 1992), sedangkan untuk jamur yang tidak membentuk spora dilakukan dengan cara menumbuhkan jamur pada media PDA (Nakagiri *et al*, 2005).

Setelah didapatkan koloni yang murni, dilakukan uji aktivitas antimikroba dengan cara menginokulasikan langsung fungi endofit yang tumbuh pada media *Potato Dextrose Yeast* (PDY) ke media *Plate Count Agar* (PCA) yang telah diinokulasi bakteri. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini merupakan flora normal yang terdapat dalam tubuh manusia, akan tetapi pada keadaan tertentu, bakteri tersebut dapat berpotensi

membahayakan dan menjadi patogen. Bakteri uji yang digunakan yaitu *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Fungi yang memiliki aktivitas antimikroba akan menghasilkan daerah jernih pada sekitar fungi sebagai daerah hambatan pertumbuhan (DHP), kemudian diamati dan dihitung rasio hambatannya. Fungi yang memiliki aktivitas antimikroba diuji secara makroskopis, mikroskopis dan biokimia yakni dengan uji hidrolisa amilum, lemak dan kasein sehingga dapat diketahui karakteristiknya.

Alasan peneliti untuk mengisolasi fungi endofit yang memiliki aktivitas antimikroba dari akar *Rhizophora mucronata* Lam. adalah karena kondisi ekosistem mangrove yang kaya bahan organik merupakan habitat yang mendukung untuk pertumbuhan mikroorganisme. Keberadaan mikroorganisme pada ekosistem mangrove erat kaitannya dengan kestabilan ekosistem dimana mikroorganisme berperan dalam siklus biogeokimia. Beberapa literatur juga mendukung bahwa sedimen laut termasuk juga kawasan mangrove sangat potensial untuk isolasi mikroba. Berbagai macam jenis fungi juga mampu menghasilkan senyawa yang menarik, misalnya fungi tanah menghasilkan eksoenzim modifikasi dari lignoselulosa seperti laccase, sedangkan *Preussia aurantiaca* mampu mensintesis senyawa antimikroba (Sahoo and Dhal, 2008).

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan yang telah diuraikan di atas, maka permasalahan yang timbul pada penelitian dapat dirumuskan sebagai berikut :

1. Apakah fungi endofit dapat diisolasi dari akar tanaman bakau (*Rhizophora mucronata* Lam.) ?
2. Apakah fungi endofit yang diisolasi dari akar tanaman bakau (*Rhizophora mucronata* Lam.) mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ?
3. Bagaimana karakteristik isolat fungi endofit yang diisolasi dari akar tanaman bakau (*Rhizophora mucronata* Lam.) yang memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ?

1.3. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka dapat dirumuskan tujuan dari penelitian ini, yaitu :

1. Mengisolasi fungi endofit dari akar tanaman bakau (*Rhizophora mucronata* Lam.).
2. Menentukan aktivitas antimikroba fungi endofit yang diisolasi dari akar tanaman bakau (*Rhizophora mucronata* Lam.) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
3. Menentukan karakteristik/genus fungi endofit dari akar tanaman bakau (*Rhizophora mucronata* Lam.) yang memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

1.4. Hipotesis Penelitian

Adapun hipotesis penelitian ini adalah :

1. Fungi endofit dapat diisolasi dari akar tanaman bakau (*Rhizophora mucronata* Lam.).
2. Fungi endofit yang berasal dari akar tanaman bakau (*Rhizophora mucronata* Lam.) memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
3. Karakteristik fungi endofit yang berasal dari akar tanaman bakau (*Rhizophora mucronata* Lam.) yang memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dapat diketahui.

1.5. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini, antara lain:

1. Fungi endofit yang memiliki aktivitas antimikroba yang diisolasi dari akar tanaman bakau (*Rhizophora mucronata* Lam.) memiliki potensi sebagai penghasil senyawa yang digunakan pada pengobatan terhadap infeksi yang disebabkan oleh *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
2. Hasil penelitian ini dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan senyawa antimikroba di bidang farmasi.
3. Dari hasil penelitian ini, dapat dikembangkan penelitian lanjutan menuju ke arah identifikasi senyawa murni dan formulasi sediaan farmasi.