

Uji Bioaktivitas Antibakteri Senyawa murni dari Jamur Endofit *Sporothrix sp* Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Dewi Yudiana Shinta¹, Yusmarini², Herix Sonata MS³, Hilwan Yuda Teruna⁴ and Saryono⁴

¹STIKES Perintis Padang, Indonesia

²Fakultas Pertanian Universitas Riau Kampus Bina widya Panam KM 12.5 Pekanbaru

³ITP Padang Indonesia

⁴Fakultas FMIPA Universitas Riau Kampus Bina widya Panam KM 12.5 Pekanbaru

Abstract: Modern medicines that are developing now come from active ingredients isolated from plants that require large amounts of plants. The development of new drugs from endophytic fungi found obstacles in the amount of pure compounds produced. Therefore further research is needed by using endophytic fungi as a new antimicrobial producer. This study aims to see the ability or activity of pure compounds produced by *Sporothrix sp* endophytic fungi from *Dahlia tuber* (*Dahlia variabilis*). Test the activity of pure compounds produced by *Sporothrix sp*. Endophytic fungi on *E. coli* and *Staphylococcus aureus* determined by disc diffusion method. With doses of 10, 30 and 50µg/disk. In *Escherichia coli* bacteria doses 10 and 50µg/disk gave significant inhibition of pure compounds from isolation compared to the positive control of ciprofloxacin, which was marked by a statistically significant test result ($p < 0.05$). In contrast to *Staphylococcus aureus* there was no significant difference in doses of both doses of 10.30 and 50µg/disk. Determination of pure compounds was carried out by HPLC and Infra Red Spectrophotometry.

Key Words: *Dahlia* bulbs (*Dahlia variabilis*), Endophytic fungi *Sporothrix sp*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*.

Pemakaian obat antibakteri sintesis secara terus-menerus tidak hanya membunuh bakteri itu sendiri namun juga mempercepat terjadinya resistensi patogen. Untuk itu diperlukan alternatif obat antibakteri yang aman yang berasal dari bahan alam.

Sumber bahan baru bioaktif yang banyak dieksplorasi sekarang ini adalah jamur endofit. Hal ini dikarenakan jamur endofit dapat menghasilkan metabolit sekunder yang dapat dikembangkan menjadi bahan baku obat. Senyawa yang dihasilkan jamur endofit seringkali memiliki aktifitas yang lebih besar dibandingkan aktivitas dari senyawa tumbuhan inangnya(1). Pemiakan atau kultur jamur endofit dapat dilakukan dalam jumlah yang sangat besar tanpa memerlukan lahan yang luas seperti tumbuhan. Pemanfaatan jamur endofit sebagai penghasil sumber bahan baku obat alami akan mereduksi kerusakan alam yang disebabkan oleh eksploitasi tumbuhan obat dalam jumlah yang besar.

Produksi senyawa antimikroba dari tanaman dalam jumlah massal membutuhkan tanaman dalam jumlah yang banyak, sehingga diperlukan lahan yang luas serta waktu yang relatif lebih

lama menunggu masa pertumbuhan tanaman. Kendala tersebut dapat diatasi dengan mengisolasi senyawa metabolit sekunder dari mikroba. Salah satunya adalah mikroba endofit yang hidup dalam jaringan tanaman(2).

Fitriyah.dkk,(2014) melaporkan Jamur endofit umbi tanaman dahlia yang telah diisolasi adalah *Monilia sp* (LBKURCC 40), *Fusarium sp* (LBKURCC 41), *Moniliella sp* (LBKURCC 42), dan *Sporothrix sp* (LBKURCC43). Dari keempat isolat diatas mempunyai bioaktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram positif, Gram negatif serta jamur. *Fusarium sp* (LBKURCC 41) dan *Sporothrix sp* (LBKURCC 43) adalah jamur endofit umbi dahlia yang menghasilkan metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *E.coli* dan *Staphylococcus aureus*, tapi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan belum dimurnikan dan belum ditentukan struktur kimianya serta bioaktifitasnya terhadap mikroba penyebab penyakit infeksi juga belum dilakukan(3).

Penelitian ini bertujuan untuk melihat kemampuan atau aktivitas dari senyawa murni yang dihasilkan oleh jamur endofit *Sporothrix*

sp dari umbi Dahlia. (*Dahlia variabilis*). Dalam penelitian ini akan ditemukan dosis berapa dari senyawa murni yang ditemukan dari metabolit sekunder jamur *Sporothrix* sp yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *Staphylococcus aureus*.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Autoclaf 1925x (Wiconsin Aluminium Foundry Co.Inc.Monitowoc), High Speed Micro Centrifuge Model CT 15RE, vortex mixer H-VM-300, Water Bath Grant SUB28, incubator Memmert, rotary shaker (Daihan Labtech Co.LTD), spektrofotometer IR Shimadzu Prestige 2100, HPLC, oven, cawan petri, jarum ose, bunsen, kompor gas, pengaduk kaca, pinset, kertas saring, inkubator, aluminium foil, mikroskop, *cover glass*, gelas obyek, gelas ukur, tabung reaksi, pipet volume, erlenmeyer, jangka sorong, botol media, shaker incubator, sentrifugasi, timbangan analitik dan silet.

Bahan-bahan yang digunakan adalah media Potato Dextrose Agar (PDA) no Cat 1.10130.0500, Sabouraud Dextrose Broth (SDB) No cat 1.08339.0500, Sabouraud Dextrose Agar (SDA), media Nutrient Agar (NA) No cat 1.05450,0500, media Nutrient Broth (NB) no cat 1.05443.0500. (semua media diproduksi oleh Merck KGaA Germany), natrium klorida (NaCl), media Huang *et al* (2007), Kalium Dihidrogen Pospat (KH_2PO_4), Magnesium sulfat hepta hidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), dan besi sulfat hepta hidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Milipore syringe filter 0,2 μm (Puradisc TM 13mm cat no 6786-1302), kertas cakram 6mm (macherey-nagel MN827ATD). Isolat jamur endofit *Sporothrix* sp LBKURCC 43 yang telah diisolasi dari umbi tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*) pada penelitian sebelumnya (Lorenita, 2011). Mikroorganisme yang digunakan dalam uji antimikroba adalah bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* yang di dapat dari koleksi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.

Prosedur Penelitian.

Produksi Isolat

Fermentasi dilakukan pada kondisi optimum yaitu suhu 37°C, pH 4, aerasi 50vvm, agitasi 150 ppm dengan variasi media Huang *et al* dengan ammonium dan Na CMC+sukrosa

dengan volume 6 liter. Komposisi medianya dapat dilihat pada tabel 1 dibawah ini.

Tabel 1. Komposisi variasi media Huang *et al* (2007)

Komposisi	Berat atau volume
Na CMC + Sukrosa	42 + 126 g
NaNO ₃	18 g
KH ₂ PO ₄	9 g
Amonium sulfat	9 g
KCl	3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,06 g
Aquadest	6 L

Ekstraksi Isolat

Isolat diekstraksi dengan metoda kromatografi flash. Pemisahan lanjut dari suatu fraksi sehingga mendapatkan isolat murni dapat dilakukan dengan kromatografi flash. Besar kolom kromatografi flash yang digunakan berdiameter 2,5 cm. Fasa diam yang digunakan silica gel 230-400 nm dengan perbandingan banyak silica gel kolom dengan sampel adalah 1:50-60. Silika gel dalam kolom dibuat dengan cara kering dengan cara silica dimasukkan ke dalam kolom yang telah berisi sedikit pelarut yang akan digunakan untuk elusi kemudian dikocok sehingga pelarut dan silica bercampur. Selanjutnya kolom ditekan dengan *air pump* agar silica memadat. Kemudian sejumlah sampel yang telah dilarutkan dalam sedikit pelarut yang akan digunakan ditempatkan diatas silica kolom. Sampel sebanyak 2,7 gram yang telah diimpregnasi dengan 3 gram silica dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan menggunakan kromatografi flash.

Pemisahan Ekstrak etil asetat *Sporothrix* sp dengan VLC (Kromatografi Vakum Cair)

Kromatografi vakum cair (yang berdiameter 10 cm dan tinggi 20 cm) diisi dengan silika gel 60 GF₂₅₄ hingga mencapai ketinggian lebih kurang 10 cm. Pengisian kolom dilakukan dalam keadaan vakum, agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Sebanyak 2,7 g sampel preadsorpsi dan kemudian dimasukkan kedalam kolom. Selanjutnya difraksinasi secara bergradien menggunakan pelarut n-heksana-etilasetat perbandingan 70:30 kenaikan kepolaran 10% sampai perbandingan metanol-etil asetat (50:50) kenaikan kepolaran 10%. Hasil pemisahan ditampung dalam erlemeyer yang telah diberi nomor dan dipekatkan dengan

rotary evaporator, selanjutnya dilakukan uji KLT untuk mengetahui jumlah komponen dari masing – masing fraksi. Fraksi yang memiliki pola noda yang sama digabungkan. Fraksi F3 – F5 diperoleh berupa kristal kemudian dicuci dengan etil asetat dan selanjutnya dikristalisasi dengan diklorometan, dapat dilihat pada tabel 2 dibawah ini.

Pemisahan Ekstrak etil asetat *Sporothrix sp* dengan VLC (Kromatografi Vakum Cair)

Tabel 2. Fraksi-fraksi yang memiliki pola noda pada KLT

No Fraksi	Eluen	Berat (g)
F1	H:E = 7 :3	0,3174
F2	H:E = 6 :4	0,1311
F3	H:E = 5 :5	0,3024
F4	E = 100 %	0,6880
F5	E:M = 9 :1	0,071
F6	E:M = 8 :2	0,1319
F7	E:M = 7 :3	0,511
F8	E:M = 6 :4	0,0637
F9	E:M = 5 :5	0,049

Pemisahan Ekstrak etil asetat *Sporothrix sp* dengan Kromatografi Flash

Kolom dapat dibuat dengan membuat bubuk silika gel (230– 400) dengan cara melarutkannya dengan pelarut *n*-heksana dan diaduk rata. Kemudian dituangkan ke dalam kolom secara perlahan-lahan. Silika gel dalam kolom dibuat padat dan permukaannya jangan sampai kering. Pengelusan kolom dilakukan dengan berbagai eluen yang memiliki kepolaran meningkat, mulai dari *n*-heksana 100%, perbandingan *n*-heksana dengan etil asetat sampai etil asetat 100%. Sebanyak 1,5 gram sampel dipreadsorpsi terlebih dahulu sebelum dimasukan ke dalam kolom, kemudian dielus dengan pelarut hingga terbentuk pita-pita. Hasil fraksinasi yang keluar ditampung dalam vial yang telah diberi nomor.

Fraksi-fraksi hasil pemisahan dengan kromatografi kolom yang menunjukkan adanya kristal dilakukan uji KLT untuk mengetahui harga *R_f* (*Retardation factor*) yang sama sehingga dapat digabung. Kristal yang terbentuk direkristalisasi kemudian kristal hasil rekristalisasi dilakukan uji KLT dan uji HPLC.

Analisis HPLC ini dilakukan menggunakan metode gradien elusi. Sampel dilarutkan dengan metanol (HPLC grade) (1 mg dalam 1 mL metanol). Larutan kemudian disaring dengan penyaring *whatman* 0,45 µL.

Filtrat sebanyak 20 µL diinjeksikan ke dalam kolom, kemudian sampel dianalisis selama 20 menit menggunakan metode yang sesuai. Kolom yang digunakan pada HPLC adalah *Shim-pack* VP-ODS dengan panjang dan diameternya yaitu 150 x 4,6 mm. Kristal senyawa murni dikarakterisasi menggunakan spektroskopi IR.

Uji aktivitas antimikroba senyawa murni (metoda Kirby Bauer)

Pembuatan media agar

Media yang digunakan untuk uji antibakteri yaitu NA (Nutrient agar) dan media uji anti jamur yaitu PDA (potato dextrose agar). NA sebanyak 20 gram dilarutkan dalam 1000 ml aquadest dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 15 ml. Media ditutup dan disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit (4). PDA sebanyak 39 gram dilarutkan dalam 1000 ml aquadest kemudian media dimasukkan ke dalam tabung reaksi, masing-masing sebanyak 15 ml. Media ditutup dan disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit (4).

Peremajaan Mikroba

Peremajaan Mikroba bertujuan untuk meremajakan kembali bakteri (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*) dari agar miring ke dalam larutan NB. Media NB yang telah dibuat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan di sterilisasi. Bakteri dari agar miring diambil dengan menggunakan jarum ose steril, kemudian diinokulasikan ke dalam media NB. Tabung ditutup dengan kapas kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

Uji Antibakteri

Media dipanaskan sampai mencair dan didinginkan pada suhu 50°C dalam waterbath, kemudian ditambahkan 1 ml biakan bakteri *E.coli* dan *S.Aureus* (OD_{600nm}-0,1)(5) ke dalam tabung, kemudian dihomogenkan dan dituang ke dalam cawan petri. Setelah media memadat, kertas cakram yang telah dtetesi dengan sampel uji (konsentrasi 500µg/ml, 300 µg/ml dan 100 µg/ml) diletakkan diatas media agar. Kontrol positif yang digunakan yaitu ciprofloxacine dengan konsentrasi 300µg/ml dan kontrol negatif yaitu DMSO yang digunakan untuk melarutkan sampel. Cawan petri diinkubasi

dalam inkubator pada suhu 37°C. Diameter daerah hambat pertumbuhan bakteri diukur setelah diinkubasi 24 jam. Semua perlakuan secara aseptik dan diulang sebanyak dua kali.(4).

HASIL

Ekstrak kental yang dihasilkan dari proses evaporasi adalah 2,7 gram dari 6 liter fermentasi, dengan warna coklat tua dan bau khas amonia. Ekstrak kering yang diperoleh setelah proses penguapan adalah 0,3024 gram.

Hasil pemurnian 6 liter sampel hasil isolasi ekstrak jamur endofit *Sporothrix sp* (LBKURCC 43) dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dengan berbagai variasi komposisi eluen memperlihatkan noda tunggal dan dilakukan berulang pada setiap komposisi.

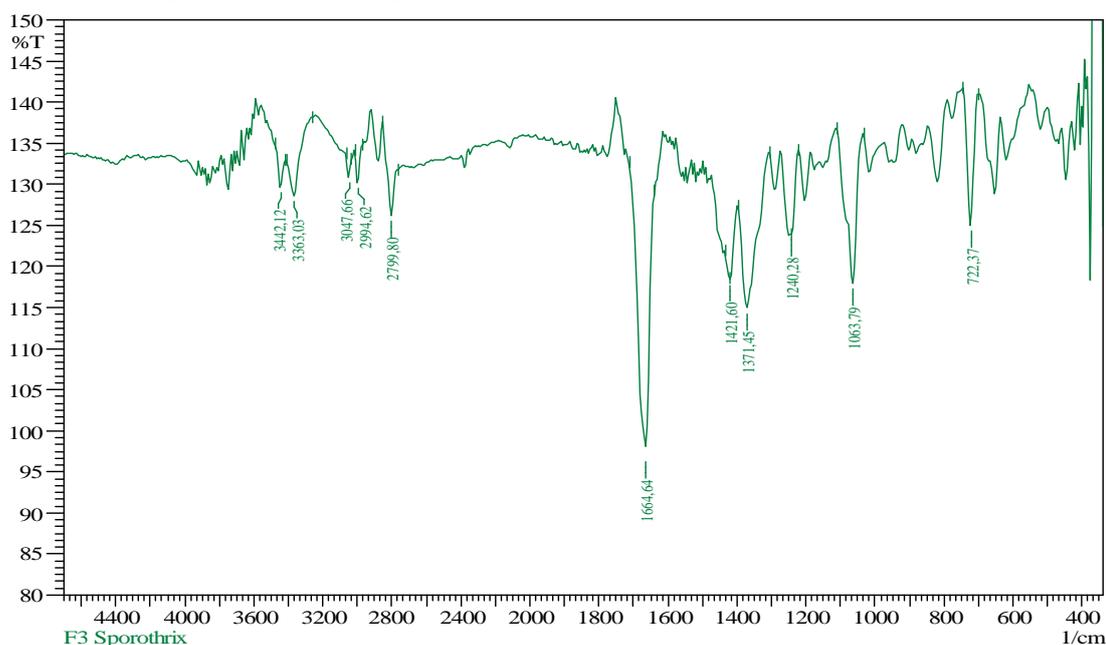
Sebanyak 0,3024g sampel preadsorpsi dan kemudian dimasukkan kedalam kolom. Selanjutnya difraksinasi secara bergradien menggunakan pelarutnya heksana - etil asetat perbandingan 70:30 kenaikan kepolaran 10% sampai perbandingan metanol-etil asetat (50:50) kenaikan kepolaran 10%. Hasil pemisahan ditampung dalam erlemeyer yang telah diberi nomor dan dipisahkan dengan *rotary evaporator*, selanjutnya dilakukan uji KLT untuk mengetahui jumlah komponen dari masing – masing fraksi. Fraksi yang memiliki pola noda yang sama digabungkan. Fraksi F3 – F5 diperoleh berupa kristal yang murni

kemudian dicuci dengan etil asetat dan selanjutnya dikristalisasi dengan diklorometan. Senyawa F3 dilakukan uji kemurnian dengan KLT dan HPLC yang dapat dilihat pada tabel 3 dibawah ini.

Tabel 3. Hasil uji KLT dari masing-masing fraksi.

No Fraksi	Eluen	Berat (g)	Jumlah spot
F1	H:E = 7 :3	0,3174	6
F2	H:E = 6 :4	0,1311	5
F3	H:E = 5 :5	0,3024	4
F4	E = 100 %	0,6880	4
F5	E:M = 9 :1	0,071	5
F6	E:M = 8 :2	0,1319	4
F7	E:M = 7 :3	0,511	5
F8	E:M = 6 :4	0,0637	5
F9	E:M = 5 :5	0,049	6

Pengukuran dengan menggunakan spektrum IR (infra red) menunjukkan adanya serapan yang khas dan tajam pada beberapa panjang gelombang. Hasil analisis spektrum infra merah senyawa F3 hasil isolasi ekstrak jamur endofit *Sporothrix sp* terlihat pada Gambar 1.



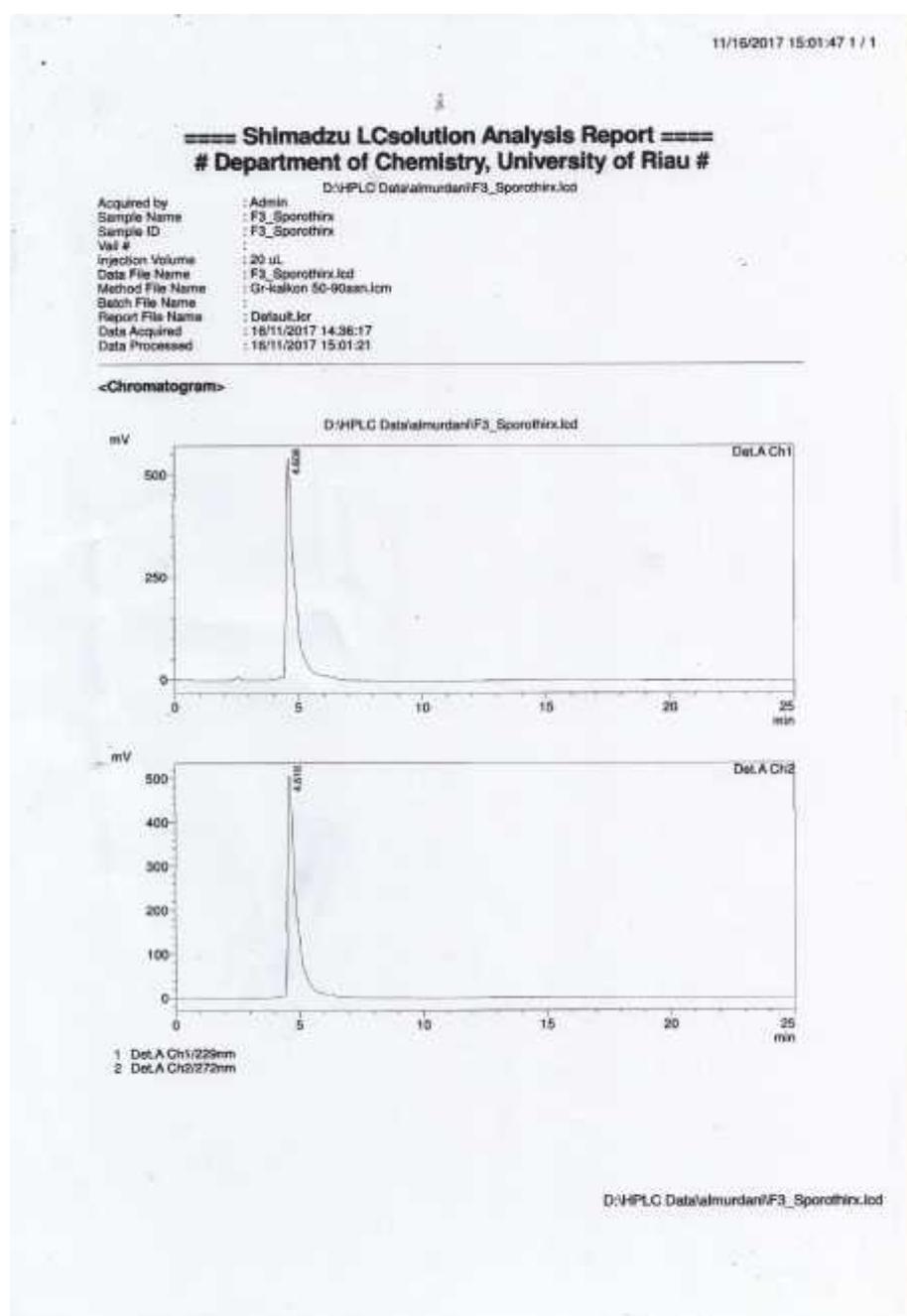
Gambar 1. Spektrum infra red senyawa F3

Spektrum infra merah menunjukkan adanya pita-pita untuk serapan untuk gugus amina N-H pada panjang gelombang 3300-3000 cm^{-1} , Getara lentur N-H terbentang pada area 1650-1580 cm^{-1} , untuk amina juga dapat terlihat pada area 910-665 cm^{-1} . Getaran peregangan C-N dari amina alifatik diamati sebagai pita sedang atau lemah di wilayah 1250-1020 cm^{-1} . Dalam amina aromatik, band ini biasanya kuat dan di wilayah 1335-1250 cm^{-1} . N-H peregangan 3400-3250 cm^{-1} , 1° amina: dua pita dari 3400-3300 dan 3330-3250 cm^{-1} , 2° amina: satu pita dari 3350-3310 cm^{-1} , 3° amina: tidak ada band di wilayah ini N-H bengkokan (hanya amina primer) dari 1650-1580 cm^{-1} ,

Peregangan C-N (amina aromatik) dari 1335-1250 cm^{-1} , C-N stretch (aliphatic amines) dari 1250-1020 cm^{-1} , N-H wag (primer dan sekunder hanya) dari 910-665 cm^{-1} .

Spektroskopi HPLC

Pengukuran dengan menggunakan alat HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 2. Untuk uji kemurnian senyawa terlihat pada kromatogram bahwa satu puncak yang muncul, ini menandakan senyawa tersebut murni.



Gambar 2. Hasil pengujian dengan HPLC

Pengujian senyawa hasil isolasi terhadap uji bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Uji bioaktivitas senyawa F3 Hasil isolasi terhadap bakteri tersebut dinyatakan pada Tabel 4.

Tabel 4. Uji Bioaktivitas senyawa F3 hasil isolasi terhadap *E.coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan berbagai dosis.

Senyawa murni	Rata-rata diameter hambat (mm)			
	Dosis yang digunakan			
F3 hasil isolasi.	10 µg/disk	30 µg/disk	50 µg/disk	K+
<i>Escherichia coli</i>	29,10	32,60	38,40	47,60
<i>Staphylococcus aureus</i>	29,40	29,80	31,40	45,10

Zona hambat yang terbentuk terlihat pada Gambar 3 dibawah ini.

1. Terhadap Bakteri *Escherichia coli*



2. Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*



Gambar 3. Zona hambat yang terbentuk pada variasi media Huang *et al*(2007) dengan dosis 10, 30 dan 50 µg/disk.

PEMBAHASAN

Hasil uji daya hambat senyawa murni F3 diatas terlihat senyawa murni tersebut memberikan daya hambat yang besar pada dosis 50µg/disk yang terlihat pada daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* 38,40mm. Pada bakteri *Staphylococcus aureus* juga memberikan daya hambat sebesar

31,40mm, sedangkan pada kontrol positif ciprofloxacin sebesar 47,60mm.

Pemilihan ciprofloxacin sebagai kontrol positif karena ciprofloxacin merupakan golongan obat fluoroquinolon yang berfungsi untuk menghambat sintesis DNA bakteri sehingga menghambat resistensi mikroba dan merupakan antimikroba berspektrum luas dan resistensi mikroba tidak cepat berkembang. (6).

Pada bakteri *Escherichia coli* dosis 10 dan 50 µg/disk memberikan daya hambat yang bermakna pada senyawa F3 hasil isolasi. Berbeda dengan *Staphylococcus aureus* tidak ada perbedaan dosis yang bermakna baik dosis 10,30 dan 50 µg/disk. Dari bentuk kromatogram yang ditemukan dari hasil spektrofotometer IR dan HPLC, adanya gugus amina yang secara umum dapat berfungsi sebagai antibakteri dan anti jamur.

Dari hasil analisa HPLC dan Spektrofotometer IR, senyawa murni F3 mengandung senyawa terpenoid yang fungsinya membunuh bakteri dengan mendenaturasi protein sel dimana terjadinya ikatan protein sel dengan senyawa terpenoid yang mengakibatkan protein sel tersebut rusak. Ikatan hidrogen yang terbentuk akan mengganggu permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma yang keduanya tersusun dari protein. Permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma terganggu akan menyebabkan ketidakseimbangan makromolekul dan ion dalam sel sehingga terjadi lisis sel. Terpenoid juga mampu berikatan dengan lemak dan karbohidrat yang menyebabkan permeabilitas dinding sel bakteri terganggu (29).

SIMPULAN

Hasil uji anti bakteri senyawa murni terhadap *Escherichia coli* memberikan daya hambat bermakna pada dosis 10 dan 50µg/disk dan *Staphylococcus aureus* tidak ada yang berbeda nyata untuk ketiga dosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis ucapkan kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Strobel, G & Daisy, B. 2003. *Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 491-502.

Saryono, et al, 2015, *Antimicrobial activity and molecular characterization of endophytic fungi strain isolated from Dahlia (Dahlia variabilis)*, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, vol 7(S): 201-208, ISSN 0975-7384.

Elita, A., Saryono, S., dan Christine, J., 2013, *Penentuan Waktu Optimum Produksi Antimikroba dan Uji Fitokimia Senyawa uji fermentasi bakteri endofit pseudomonas Sp. dari umbi tanaman Dahlia (dahlia variabilis)*, Journal Ind. Che. Acta Vol 3 (2) 56 – 62.

Fitriyah, D., Saryono, S, dan C. Jose., 2013, *Skrining aktivitas antimikroba dan uji fitokimia dari kapang endofitik tanaman dahlia (dahlia variabilis)*, Journal Ind. Che. Acta Vol 3 (2) 50-55

Gan, V.H.S dan Setiabudy, R. 2000. *Farmakologi Dan Terapi*. Edisi 3. Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Guo B, Dai J, Ng S, Huang Y, Leong C, Ong W, Carte BK.. 2002. *Cytotoxic acid A dan B, novel tridepside inhibitor of hCMV protease from the endophytic fungus Cytonaena sp.* J Nat Prod 63:602-604.

Halim, Jasril, dan Saryono, 2014, *Optimalisasi Produksi Senyawa Metabolit Sekunder dari Pseudomonas sp Endofit Tanaman Dahlia (Dahlia variabilis)*, Ind.Che.Acta vol 5(1) 8-14.

Haniah, M., 2008, *Isolasi jamur Endofit dari Daun Sirih (Piper betle L) Sebagai Antimikroba Terhadap Escherichia coli, Staphylococcus aureus dan Candida albicans*, UIN Malang.

Haryani, Y., Siti Muthmainah dan Saryono Sikumbang, 2013, *Uji Parameter Non Spesifik dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol dari Umbi Tanaman Dahlia (Dahlia variabilis)*, Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia 1(2), Maret 2013: 43-46.

Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Hyde, K.D., Corke, H., & Sun, M. 2007. *Endophytic fungi from Nerium oleander L (Apocynaceae) main constituents and antioxidant activity*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23(9)1253-1263.

Lorenita, M., et al, 2013, *Screening of Endophytic Fungi from Tubers of Dahlia variabilis*, Journal of Agricultural Technology, vol 9(3): 565-570.

Lu H, Zou WX, Meng JC, Hu J, Tan RX. 2000. *New bioactive metabolites*

- produced by *Colletotrium* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Sci*151:76-73.
- Purwantini, I, Ratna H, A. Dan Eka P. P, 2010, *Isolasi Fungi Endofit Penghasil Antifungi dari Eupatorium riparium Reg. Dan Identifikasi Senyawa Aktifnya Menggunakan Bioautografi*, Prosiding Seminar nasional, Eight performance Pharmacist, 27 Desember 2010, UGM Yogyakarta, hal 149.
- Prihatiningtias,W. 2007. *Prospek Mikrob Endofit Sebagai Sumber Senyawa Bioaktif*, *Majalah Obat Tradisional* 12 (42).
- Pratiwi,S.T, 2008. *Mikrobiologi Farmasi*,Jakarta, Erlangga.
- Qadri, M, et,al, 2013, Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas, Qadri et al. Springer Plus 2013,2:8, 2-14.
- Radji, M. 2005. *Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal*. Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi. Vol. II. Departemen Farmasi, FMIPA-UI, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, No.3,Desember.
- Rante, H, Burhanuddin Taebe dan Soendaria Intan, 2013, *Isolasi Fungi Endofit Penghasil Senyawa Antimikroba Dari Daun Cabai Katokkon (Capsicum annum L var. chinensis)* dan profil KLT BIOAUTOGRAFI, *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, Vol. 17, No.2 – Juli 2013, hlm. 39 – 46.
- Ryan.J.K, 2004, *Medical Microbiology, An Introduction to Infectious Diseases*, Prentice Hall International Inc.
- Ristiati, N. P. 2000. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Proyek Pengembangan sekolah menengah IBRD Loan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi: Departemen Pendidikan Nasional.
- Saryono S.dkk.2013, *Penentuan Waktu Optimum Produksi Antimikroba dan Uji Fitokimia Ekstrak Kasar Fermentasi Bakteri Endofit Pseudomonas sp dari Umbi Tanaman Dahlia (Dahlia variabilis)*,*Jurnal.Ind,Che.Acta* Vol.3 (2) 2013.
- Saryono, Hindersah,2009, *Tanaman Dahlia Potensi Bahan Alam Sumber Karbohidrat dan Senyawa Bioaktif*, Unri Press, Pekanbaru.
- Sadrati, N, et al, 2013, *Screening Of Antimicrobial And Antioxidant Secondary Metabolites From Endophytic Fungi Isolated From Wheat (Triticum Durum)*, *Journal Of Plant Protection Research* Vol. 53, No. 2: 128-136.
- Selim, KA, El-Beih AA, Abd El-Rahman TM and El-Diwany AI, 2012, *Biology of Endophytic Fungi*, *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 31-81.
- Simarmata, Rumilla. 2007. *Isolasi Mikroba Endofitik dari Tanaman Obat Sambung Nyawa Gynura Procumbens) dan Analisis Potensinya sebagai Antimikroba*. *Jurnal penelitian Hayati* 13 : 85-90.
- Sinaga,E. dkk,2009, *Daya antibakteri Jamur Endofit yang Diisolasi Dari Dan Dan Rimpang Lengkuas (Alpinia galangaw)*, *Jurnal Farmasi Indonesia* vol 4.no4 Juli 2009 :161-170.
- Sinaga,E,dkk, 2009, *Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit DariDaun Dan Rimpang Zingiber ottensii Val*, *Jurnal Farmasi Indonesia*,vol 4.(4) : 171-176.
- Simanjuntak P, Parwati T, Bustanussalam, Prana TK, Wibowo S, Shibuya H. 2002. *Isolasi dan kultivasi mikroba endofit penghasil senyawa alkaloid kinkona dari Chinchona spp.* *J Mikrobiol* 7:27-30.
- Shinta, D.Y, et al, 2015, *The Media Variance of Production for Anti Microbe Homogeny from the Endofite Mushroom of Dahlia Plant Seed (Dahlia variabilis)*, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(9S): 239-245.
- Bonjura,S.,dkk, 2015, *Uji anti bakteri ekstrak daun Leilem (Clerodendum minahassae.L) Terhadap Bakteri Streptococcus mutan*, *Jurnal Ilmiah Farmasi Unsrat* Vol4 no 4, ISSN 2302-2493.