

Karakterisasi Fungi Endofit *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp. Berdasarkan Gen ITS Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri

Endophytic Fungi Characterization *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp. Based on ITS Genes as Producers of Antibacterial Compounds

Asti Vebriyanti Asjur

Universitas Megarezky, Makassar

*Email korespondensi: astivebriyantiasjur@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini diawali dengan menumbuhkan dari daun salam yang telah disterilkan menggunakan etanol 70% dan natrium hipoklorit. Skrining antibakteri dilakukan dengan menggunakan uji antagonis sebagai screening pertama melawan *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella thyposa*. Penelitian ini menghasilkan 2 isolat fungi. Fungi endofit aktif difermentasi dan ekstraksi dengan etil asetat (EtOAc) dan metanol. Aktivitas antibakteri dari ekstrak EtOAc dan metanol diuji aktivitasnya menggunakan metode difusi disk. Satu isolat fungi endofit (XP1) terhadap lima dari bakteri yang diuji adalah *S. aureus*, *P. Aeruginosa*, *E. Coli*, *S. thyposa*, dan *B.subtilis*, memiliki daya hambat terbesar pada bakteri uji *S. thyposa* dengan diameter daya hambat sebesar 14,00 mm. Sedangkan pada isolat fungi endofit (XP2) terhadap lima dari bakteri yang diuji adalah *S. aureus*, *P. Aeruginosa*, *E. Coli*, *S. thyposa*, dan *B.subtilis*, memiliki daya hambat terbesar pada bakteri uji *S. thyposa* dengan diameter daya hambat sebesar 22,00 mm. Berdasarkan analisis filogenetik isolat XP 1 memiliki kemiripan dengan *Penicillium sp.* (homology 87%) sedangkan isolat XP2 memiliki kemiripan dengan *Colletotrichium gloeosporioides* (homology 98%).

Kata Kunci: *Syzygium polyanthum*, fungi endofit, antimikroba, analisis filogenetik, *Penicillium sp.*, *Colletotrichium*

Abstract

This research was begun by growing from bay leaves that had been sterilized using 70% ethanol and sodium hypochlorite. Antibacterial screening was carried out using antagonistic tests as the first screening against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*,

Salmonella thyposa. This study produced 2 fungi isolates. Active endophytic fungi are fermented and extracted with ethyl acetate (EtOAc) and methanol. Activity. The antibacterial activity of EtOAc and methanol was tested for its activity using the disk diffusion method. One isolate of endophytic fungi XP1 against five of the bacteria tested was *S. aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S. thyposa*, and *B.subtilis*, which had the greatest inhibition on *S. thyposa* test bacteria with inhibitory diameter of 14.00 mm. Whereas the XP2 endophytic fungi isolates against five of the tested bacteria were *S. ureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.thyposa*, and *B.subtilis*, which had the greatest inhibition on *S. thyposa* test bacteria with inhibition diameter of 22.00 mm. Based on phylogenetic analysis isolate XP 1 has similarities with *Penicillium* sp. (homology 87%) while isolate XP2 *Colletotrichium gloeosporioides* (homology 98%).

Keywords: *Syzygium polyanthum*, endophytic fungus, antimicrobe, phylogenetic, *Penicillium* sp. *Colletotrichium*

Submitted: 24 November 2020

Accepted: 24 April 2021

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v3i3.367>

1 Pendahuluan

Mikroba endofit merupakan suatu mikroba, baik itu fungi ataupun bakteri selama siklus hidupnya menetap dalam jaringan tertentu pada tanaman yang sehat, apakah itu jaringan akar, batang, ranting, ataupun daun. Mikroba endofit tersebut menginfeksi tanaman inangnya secara asimtomatis dan hidup berkoloni di dalamnya tanpa menimbulkan kerusakan, bahaya, ataupun gejala penyakit pada tanaman inangnya [1].

Fungi endofit dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai tanaman inangnya, merupakan peluang untuk memproduksi metabolit sekunder dari tanaman inangnya tersebut. Apabila jamur endofit yang diisolasi dari suatu tanaman obat dapat menghasilkan alkaloid atau metabolit sekunder sama dengan tanaman aslinya atau bahkan dalam jumlah yang lebih tinggi, maka kita tidak perlu menebang tanaman aslinya untuk diambil sebagai simplisia yang kemungkinan besar memerlukan waktu puluhan tahun untuk dipanen [2].

Penelitian telah menunjukkan bahwa, hampir 300.000 spesies tanaman yang ada di bumi, masing-masing tanaman adalah inang bagi satu atau lebih lebih banyak endofit, populasi spesies endofit tertentu bervariasi dari beberapa hingga beberapa ratus jenis [1].

Berdasarkan hasil penelitian [3], juga membuktikan bahwa ekstrak daun salam mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* (MIC 0,31 mg/ml) dan *Bacillus subtilis* 0,63 mg/ml). Selanjutnya penelitian [4] menyatakan bahwa tanaman salam menghasilkan isolat fungi yang mampu menghambat bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acne*, dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan daya hambat terbesar pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan diameter hambatan sebesar 13,77 mm.

2 Metode Penelitian

2.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, inkubator, laminar air flow, lemari pendingin, autoklaf, oven, timbangan analitik, shaker, mikropipet, sentrifuge, tabung appendorf, botol pengencer, ose bulat, dan mikroskop.

Bahan-bahan yang digunakan adalah daun tanaman *Syzygium polyanthum*, air suling, alkohol, etil asetat, lempeng kromatografi lapis tipis (KLT), paper disk, mikroba uji (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyposa* dan *Escherichia coli*), medium Nutrient Agar (NA), NaOCl

2.2 Pengambilan Sampel

Sampel daun *Syzygium polyanthum* diambil dari lokasi Kecamatan Tamalanrea, Kota Makassar, Provinsi Sulawesi Selatan. Sampel daun dan ranting diambil dengan menggunakan pisau stainless still lalu dicuci dengan aquades steril. Sampel selanjutnya disimpan dalam wadah tertutup rapat yang telah diaseptiskan dengan alkohol 70%, selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk digunakan dalam penelitian.

2.3 Fermentasi dan Ekstraksi metabolit sekunder

Isolat selektif ditumbuhkan pada 500ml Erlenmeyer yang berisi 100 ml media PDB, dan diinkubasi pada suhu kamar selama 72 jam. Prekultur dipindahkan ke 500ml Erlenmeyer yang berisi 100 ml media PDB. medium diatur pada pH 7,6. Fermentasi dilakukan pada suhu kamar selama 20 hari dalam keadaan tershaker dengan kecepatan 150 rpm. maka fermentasi media yang disaring untuk memisahkan biomassa dan cairan fermentasi. Cairan fermentasi diekstraksi 2 kali dengan pelarut etil asetat (1: 1 v/v) dalam corong pisah selama 20 menit dan biomassa diekstraksi dengan metanol. Ekstrak yang diperoleh diuapkan dan kemudian disimpan dalam desikator untuk digunakan dalam tes berikutnya.

2.4 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol dan Etil Asetat isolat XP1 dan XP2

Ekstrak metanol dan etil asetat yang diperoleh dibuat konsentrasi 10% (10 mg/100 μ l) menggunakan pelarut metanol dan etil asetat. Kemudian diuji aktivitas antimikrobanya menggunakan metode difusi agar. Sebanyak 20 μ l ekstrak diteteskan pada paper disk. Setelah pelarut menguap, masing-masing paper disk diletakkan dipermukaan medium NA yang telah diinokulasi bakteri uji pada cawan petri terpisah untuk masing-masing bakteri uji. Zona hambat yang

terbentuk pada masing-masing konsentrasi diukur diameternya [5].

2.5 Analisis Filogenetik Isolat

2.5.1 Sekuens DNA

Produk PCR dari sampel yang menunjukkan hasil elektroforesis yang positif dilakukan sekuensing DNA dilakukan oleh 1st Base melalui PT Genetika Indonesia. Proses sekuensing DNA dilakukan menggunakan metode Sanger dideoksi.

2.5.2 Analisis Urutan DNA Pengkode gen ITS

Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan melakukan BLAST urutan nukleotida dari hasil sekuensing 18S rRNA dengan data base yang tersedia pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov yang digunakan untuk mencari similaritas suatu sekuens nukleotida atau protein (*query sequence*) dengan sekuens data base (*subject sequence*). Pensejajaran sekuens dilakukan dengan menggunakan Program Clustal W. Selanjutnya visualisasi kekerabatan menggunakan pohon filogenetik Program MEGA 6.

3 Hasil dan Pembahasan

Dari hasil diperoleh dua fungi endofit yang tumbuh pada daun *Syzygium polyanthum*, dua fungi endofit yang tumbuh daun *Syzygium polyanthum* (Gambar 1 dan 2). Selain itu, kedua fungi endofit tersebut tumbuh disekitar jaringan yang telah diiris atau dibelah yang berarti bahwa mikroba yang tumbuh berasal dari jaringan tanaman *Syzygium polyanthum* atau dengan kata lain merupakan fungi endofit *Syzygium polyanthum*.

Dari hasil pemurnian isolat terdapat 2 isolat fungi endofit yang masing-masing diberi kode isolat 1 (XP 1) pada Gambar 1 dan isolat 2 (XP 2) pada Gambar 2 yang masing-masing tumbuh pada hari ke-3 inkubasi.



(A)



(B)

Gambar 1. Isolat Murni Fungi Endofit XP1 dari daun *Syzygium polyanthum*, (A) Isolat XP1 tampak depan, dan (B) Isolat XP1 tampak belakang

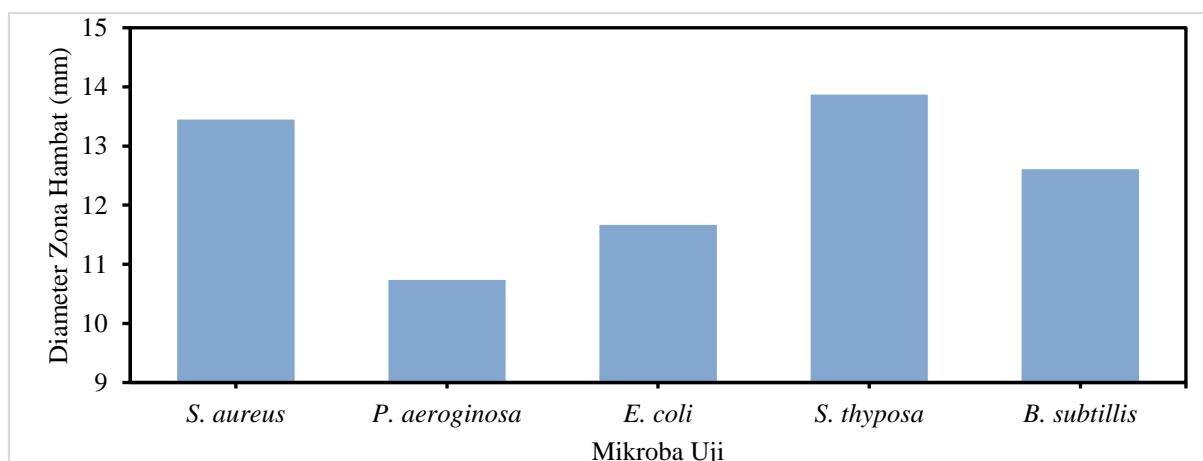


(A)

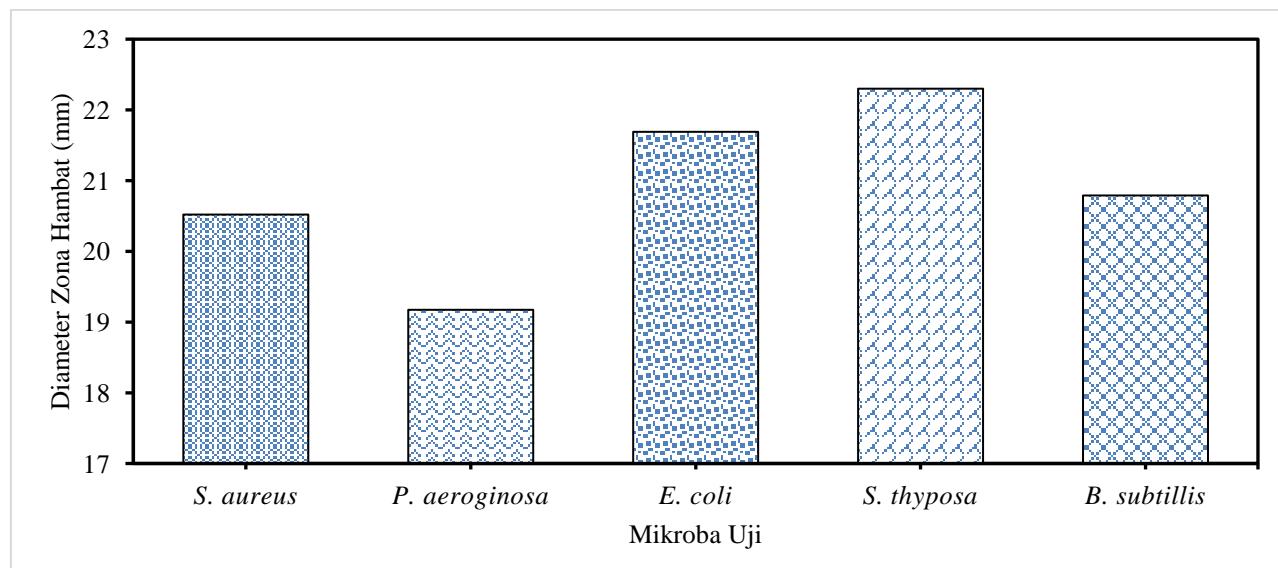


(B)

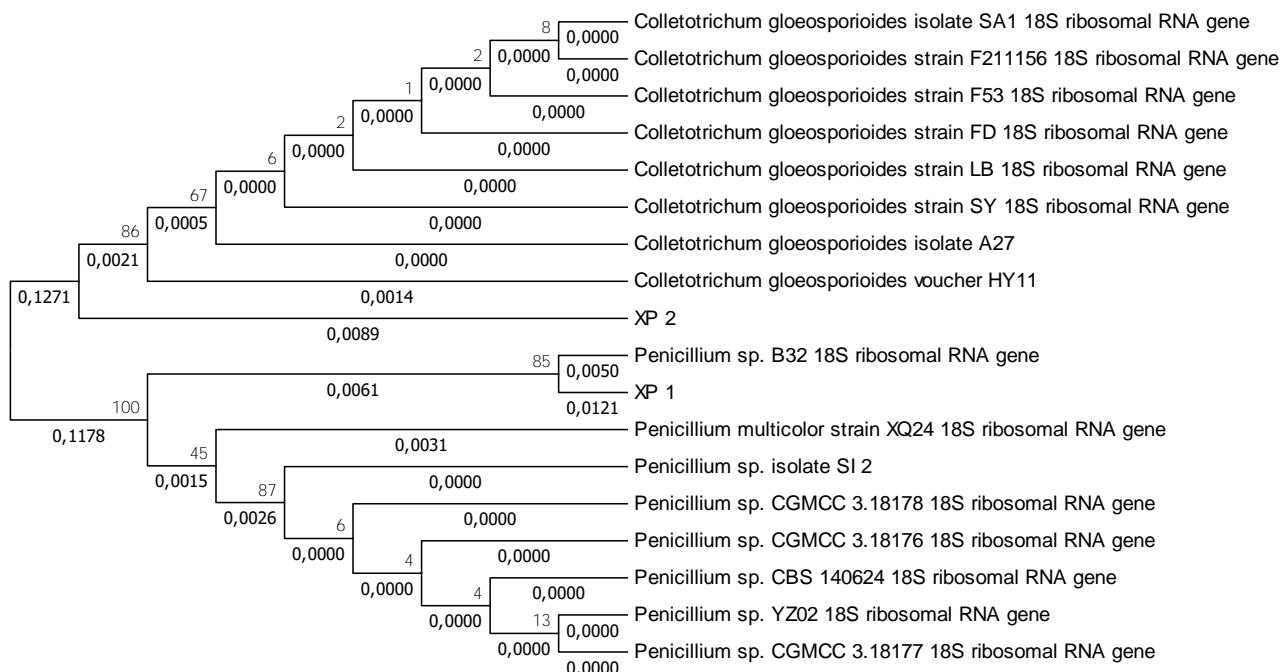
Gambar 2. Isolat Murni Fungi Endofit XP2 dari daun *Syzygium polyanthum*, (A) Isolat XP2 tampak depan, dan (B) Isolat XP2 tampak belakang.



Gambar 3. Grafik hasil uji aktivitas antibakteri dari ekstrak Etil Asetat Fermentasi isolat XP1 (10%) terhadap beberapa mikroba uji



Gambar 4. Grafik hasil uji aktivitas antibakteri dari ekstrak Etil Asetat Fermentasi isolat XP2 (10%) terhadap beberapa mikroba uji



Gambar 5. Konstruksi pohon filogenetik isolat XP1 dan XP2 menggunakan program MEGA 6.0 dengan metode neighbor joining

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar yang menggunakan *paperdisk* yang dibuat berbentuk bulat dengan diameter 6mm dan memiliki ketebalan 0,5mm. Metode difusi agar memiliki beberapa kelebihan yaitu sederhana untuk dilakukan dan

dapat digunakan untuk melihat sensitivitas berbagai jenis mikroba terhadap antimikroba pada konsentrasi tertentu. Mikroba uji yang digunakan untuk uji aktivitas antimikroba adalah bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*,

Salmonella thyposa dan *Bacillus subtilis* pada isolat XP1 (Gambar 3) dan isolat XP2 (Gambar 4)

Analisis pohon filogenetik secara dua tahap dengan menggunakan program Clustal W yang dikombinasikan dengan program MEGA 6. Tahap pertama menggunakan program Clustal W untuk mensejajarkan sekuen kedua isolat BAL dengan isolat dari Gen Bank yang memiliki sekuen mirip dengan isolate XP1 dan XP2. Kemudian program MEGA 6 akan membuat pohon filogenetiknya dengan metode pendekatan “Neighbour Joining”, bootstrap 1000x, dan metode p-distance. Pohon filogeni ini dibentuk dengan menggunakan metoda Neighbor-joining yang termasuk dalam metoda jarak dengan prinsip pengelompokan taksa berdasarkan nilai jarak evolusioner pasangan-pasangan operational taksonomy unit dimana setiap percabangan yang terdapat dalam pohon filogeni berevolusi pada kecepatan yang tidak sama [6].

Hasil analisis filogenetik (Gambar 5) menggunakan sekuen DNA pengkode 18S rRNA diketahui isolate XP1 paling dekat kekerabatannya dengan *Penicillium sp* B32 18S ribosomal RNA gene (jarak genetik 0,0061) dengan nilai bootstrap 100. Semakin besar nilai bootstrap, maka semakin tinggi pula tingkat kepercayaan topologi pohon hasil rekonstruksi tersebut [6-8]. Isolat XP2 memiliki kekerabatan paling dekat dengan *Colletotrichum gloesporioides* voucher HY11 dengan jarak genetik 0,0014 dengan nilai bootstrap 85.

4 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Berdasarkan analisis filogenetik isolat XP 1 memiliki kemiripan dengan *Penicillium sp.* (homology 87%) sedangkan isolat XP2 memiliki kemiripan dengan *Colletotrichum gloeosporioides* (homology 98%)
2. Diperoleh 2 isolat yakni XP1 dan XP2 yang mana XP1 memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Salmonella thyposa* dan isolat XP2 memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan *Salmonella thyposa*. Ekstrak isolat XP1 paling kuat dalam menghambat bakteri *S.thyposa* dengan diameter daya hambat 14 mm dan ekstrak isolat XP2 yang paling kuat dalam menghambat bakteri *S.thyposa* dengan diameter daya hambat 22 mm pada kadar ekstrak 2 mg/20 μ L.

5 Daftar Pustaka

- [1] Strobel, G.A.; & Daisy, B. 2003, *Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products*. Microbiol.and Mol. Biology Rev. Dec 2003. Vol.67. No. 4: 491- 502.
- [2] Radji, M. (2012). Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)*, 2(3), 113-126.
- [3] Lau, K.Y., Zainin, N.S., Abas, F., dan Rukayadi. Y. 2014. Antibacterial and Sporicidal Activity of *Eugenia polyantha* Wight. Against *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* Vol 3 Number 12 (2014) pp. 499-510.
- [4] Burhamzah, R., G. Alam, and H. Rante. "Characterization of Antibacterial-Producing Endophytic Fungi of *Syzygium polyanthum* Leaves." *Infectious disorders drug targets* (2018).
- [5] Bolouiri, M., Sadiki, M., dan Ibsouda, S.K. 2016. Method for in vitro evaluating antimicrobial activity : A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6 (2016) : 71-79
- [6] Hall, B.G., 2001. *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-to Manual for Molecular Biologists*. Sinauer Associates Inc. Sunderland
- [7] Hillis, D.M., B.K. Marble and C. Moritz. 1996. Applications of molecular systematics: The state of the field and a look to the future. *Molecular systematics*.2nd Ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland.
- [8] Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press Inc. New York.