

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FUNGI ENDOFIT GAHARU DARI *Aquilaria* sp.

Surdiah^{1*}, Risa Nofiani¹, Puji Ardiningsih¹

¹Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura,
Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi, Pontianak

*e-mail: surdiah28@gmail.com

ABSTRAK

Gaharu merupakan jenis resin yang diproduksi oleh pohon tertentu, misalnya dari genus *Aquilaria* sp. dan *Gyrinops* sp. Pada penelitian sebelumnya gaharu dari pohon *Aquilaria malaccensis* Lamk. telah digunakan sebagai sumber isolat fungi endofit yang memiliki aktivitas antibakteri. Oleh karena itu pada penelitian ini, dilakukan isolasi fungi endofit gaharu dari *Aquilaria* sp. Tujuan dari penelitian ini adalah memperoleh fungi endofit gaharu dari *Aquilaria* sp., memperoleh genus fungi yang dihasilkan dari isolasi gaharu dan mengetahui aktivitas antibakteri fungi endofit gaharu dari *Aquilaria* sp. Hasil isolasi diperoleh satu isolat fungi yang diberi kode GA4. Isolat fungi GA4 kemudian diidentifikasi secara mikroskopis dan makroskopis. Isolat fungi endofit GA4 secara mikroskopis teridentifikasi sebagai divisi Basidiomycetes. Isolat fungi tersebut diperbanyak dan dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat kemudian pelarutnya diuapkan untuk mendapatkan ekstrak kasar fungi endofit. Berat ekstrak fungi setelah dikeringkan sebanyak 0,016 gram. Ekstrak fungi yang diperoleh digunakan untuk uji aktivitas antibakteri. Bakteri yang digunakan adalah: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella thypi* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil uji aktivitas ekstrak fungi GA4 tidak menunjukkan adanya aktivitas.

Kata kunci : basidiomycetes, *Aquilaria* sp., fungi endofit, gaharu

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki keanekaragaman tanaman dan tumbuhan. Ada sekitar puluhan ribu jenis tumbuhan yang hidup diwilayah Indonesia. Berbagai macam tanaman dan tumbuhan menghasilkan komoditi yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Salah satunya adalah gaharu. Gaharu merupakan sejenis resin yang dihasilkan sebagai akibat aktivitas infeksi mikroba pada pohon tertentu. Ada beberapa jenis tanaman yang diketahui dapat menghasilkan gaharu, salah satunya adalah keluarga Thymelaeaceae (Sumarna, 2007) yaitu dari genus seperti *Aquilaria* sp. (*Aquilaria malaccensis*, *Aquilaria microcarpa*) dan *Gyrinops* sp. (*Gyrinops verategii*) (Setyaningrum dan Saprianto, 2014). Tanaman ini juga dikenal sebagai tanaman aloes (gaharu) karena kemampuannya untuk merangsang pembentukan resin. *Aquilaria* memiliki beberapa spesies, akan tetapi spesies yang banyak tumbuh di Sumatra, Kalimantan, dan Malaysia adalah: *Aquilaria microcarpa*, *Aquilaria ardesiacus*, *Aquilaria hirta*, *Aquilaria beccariana* dan *Aquilaria ardesiacus* (Wayne, 2013).

Gaharu dari pohon *Aquilaria* sp. banyak dibudidayakan di Asia Tenggara. Sumber metabolit sekunder pada gaharu dari pohon *Aquilaria* sp. termasuk senyawa yang mudah menguap (Bitas *et al.*, 2013; Wibowo *et al.*, 2014). Senyawa-senyawa inilah yang merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman dengan menghambat patogen tanaman (Gao *et al.*, 2010) Beberapa senyawa menguap ini memiliki antimikroba dan aktivitas antioksidan (Strobel *et al.*, 2004; Mends *et al.*, 2012). Karena beberapa metabolit sekunder dari gaharu menunjukkan aktivitas antimikroba maka kemungkinan fungi endofit gaharu dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antimikroba dan ini dapat menjadi sumber daya baru dalam industri obat-obatan (Strobel *et al.*, 2004). Apabila fungi endofit yang diisolasi dari suatu tanaman yang dapat menghasilkan metabolit sekunder yang 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 (Radji, 2005). Oleh karena itu, pada penelitian ini telah dilakukan isolasi fungi endofit

gaharu dari pohon *Aquilaria* sp.. Kemudian isolat fungi akan dilakukan identifikasi dan uji aktivitas antibakteri.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, batang pengaduk, cawan petri, corong pisah, erlenmeyer, gelas beker, gelas ukur, inkubator, *laminar flow* (AIRTECH), mikropipet (*Proline Pipette*), *Microscope cover Glass*, *Microscope Slide*, neraca analitik (*US Solid*), pipet ukur, pipet tetes, *shaker* (DIAB), dan spatula.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah akuades (H_2O), etanol (C_2H_5OH), etil asetat ($CH_3COOCH_2CH_3$), metanol (CH_3OH), natrium hipoklorit ($NaOCl$), nutrisi agar (NA), nutrisi broth (NB), potato dextrose agar (PDA), potato dextrose broth (PDB), dan tetrasiklin.

Prosedur Kerja

Preparasi dan isolasi fungi endofit

Preparasi dan isolasi gaharu dilakukan mengikuti prosedur Katoch *et al.*, 2014. Gaharu dicuci dengan air keran mengalir selama 10 menit. Gaharu yang sudah bersih, selanjutnya direndam dalam etanol 70% selama 1 menit, kemudian direndam kembali kedalam larutan natrium hipoklorit ($NaOCl$) 1% selama 1 menit. Akhirnya, gaharu dibilas kembali dengan air steril dan dikeringkan pada *laminar flow* dan akan digunakan untuk isolasi fungi pada tahap berikutnya. Satu potongan gaharu steril berukuran 1 cm^2 diletakkan pada media PDA yang mengandung tetrasiklin $100\text{ }\mu\text{g/mL}$. Kemudian, cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu ruang sampai miselia fungi tumbuh. Miselia yang tumbuh dipindahkan ke media PDA yang baru dan diinkubasi pada suhu ruang. Hal ini dilakukan sampai mendapatkan isolat murni. Penanaman sampel dilakukan 3 kali pengulangan.

Identifikasi fungi

Isolat fungi yang diperoleh kemudian dilakukan identifikasi dengan cara mengamati struktur fungi secara jelas menggunakan metode *slide culture*. Media padat dipotong kotak dengan ukuran $1\times 1\text{ cm}$ dan diletakkan ke slide, kemudian diinokulasikan pada empat sisi media tersebut, kemudian ditutup dan diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu ruang (Pratiwi, 2019). Setelah itu, *slide* diamati dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x.

Fermentasi dan ekstraksi

Isolat fungi yang diperoleh diinokulai pada 50 mL media PDB dan dikocok pada kecepatan 180 rpm pada suhu ruang selama 7 hari. Setelah itu, kultur dihaluskan menggunakan blender, dan diekstraksi menggunakan etil asetat dengan ratio 1:1 sebanyak 2 kali pengulangan. Kemudian, ekstrak etil asetat dikeringkan untuk menghasilkan ekstrak kasar fungi (Katoch *et al.*, 2014).

Pembuatan kultur bakteri uji

Ada 5 bakteri uji yang digunakan dalam melakukan uji aktivitas anti bakteri, yaitu: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella thypi* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Setiap bakteri uji diinokulas kedalam media NB dan dikocok menggunakan *shaker* dengan kecepatan 140 rpm selama 14-16 jam pada suhu ruang.

Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengikuti metode sumur (Bonang, 1992). Sebanyak $400\text{ }\mu\text{L}$ bakteri uji dicampurkan kedalam media nutrient agar sebanyak 15 mL yang agak hangat. Kemudian dituang kedalam cawan petri. Setelah padat, lubangi media dengan alat pelubang steril, kemudian masukan sebanyak $20\text{ }\mu\text{L}$ ekstrak fungi ($25\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Setelah itu, cawan petri ditutup dan diinkubasi selama 14-16 jam. Zona bening yang terbentuk kemudian diukur diameter dengan menggunakan jangka sorong. Sebagai kontrol positif dan kontrol negatif digunakan tetrasiklin (1 mg/ml) dan pelarut etil asetat secara berturut-turut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

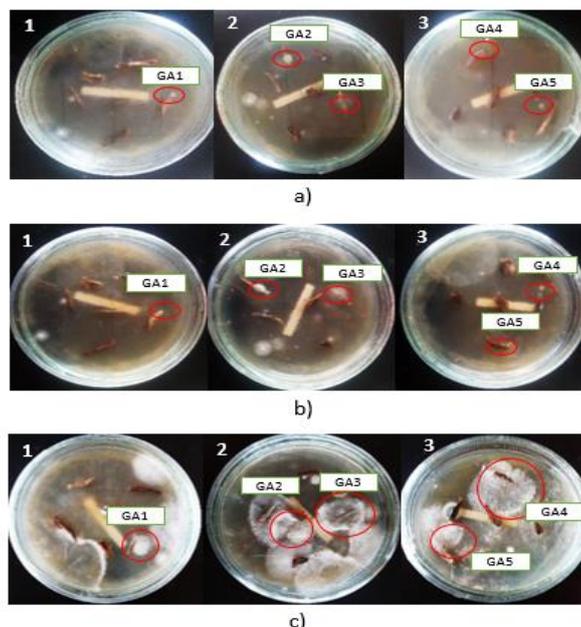
Preparasi dan isolasi fungi endofit

Gaharu dari pohon *Aquilaria* sp. memiliki permukaan yang tidak rata atau berlobang sehingga lebih sulit untuk dibersihkan (Gambar 1). Dibersihkannya permukaan bertujuan untuk menghilangkan mikroba yang terdapat dipermukaan sampel dengan menggunakan etanol 70%, natrium hipoklorit 1 %. Tujuan menggunakan etanol 70 % adalah untuk mendenaturasi protein mikroba yang ada pada membran sel (Tejesvi *et al.*, 2007)). Natrium hipoklorit mampu merusak membran dan protein mikroba, dan air steril berfungsi untuk menghilangkan sisa-sisa larutan yang terdapat pada permukaan sampel (Strobel and Daisy, 2003).



GAMBAR 1. Sampel gaharu *Aquilaria* sp.

Isolasi fungi gaharu dengan menggunakan media PDA yang mengandung tetrasiklin 100 µg/mL. Media PDA merupakan salah satu media yang umum digunakan untuk menanam fungi (Griffith *et al.*, 2019). Penambahan tetrasiklin pada media PDA bertujuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri Gram-positif dan Gram-negatif, baik yang bersifat aerob maupun anaerob (Kementerian Kesehatan, 2011). Fungi mulai tumbuh disekitar potongan gaharu pada hari ke 3. Fungi yang tumbuh, diduga sebagai isolat fungi endofit diberi kode GA1, GA2, GA3, GA4 dan GA5. Pada hari ke 5 diameter koloni fungi semakin besar. Selanjutnya Isolat fungi dimurnikan ke media yang baru.



GAMBAR 2. Pertumbuhan koloni hasil penanaman sampel gaharu dari pohon *Aquilaria* sp. dengan pengulangan 3 kali. 1a, 2a, 3a inkubasi selama 3 hari pengulangan pertama sampai pengulangan ketiga. 1b, 2b, 2b inkubasi selama 4 hari pada pengulangan pertama sampai pengulangan ketiga. 1c, 2c, 3c inkubasi selama 5 hari pengulangan pertama sampai pengulangan ketiga. Isolat fungi GA1, GA2, GA3, GA4, dan GA5 merupakan isolat yang diduga isolat fungi endofit

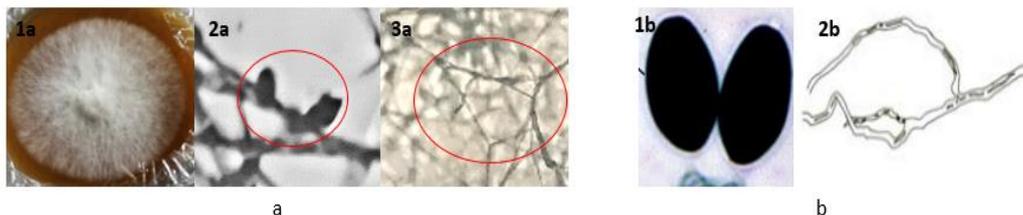
Berdasarkan hasil pemurnian diperoleh 5 isolat (GA1,GA2,GA3, GA4 dan GA5). Hampir semua isolat fungi yang telah dimurnikan memiliki warna miselia yang sama yaitu berwarna putih. Dari ke 5 isolat, hanya 1 isolat yaitu isolat GA4 yang digunakan untuk dilakukan uji aktivitas antimikroba dan identifikasi fungi (Gambar 3).



GAMBAR 3. Isolat murni fungi GA4

Identifikasi isolat fungi GA

Isolasi fungi gaharu dengan menggunakan media PDA yang mengandung tetrasiklin 100 µg/mL. Media PDA merupakan salah satu media yang umum digunakan untuk menanam fungi (Griffith *et al.*, 2019). Penambahan tetrasiklin pada media PDA bertujuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri Gram-positif dan Gram-negatif, baik yang bersifat aerob maupun anaerob (Kementerian Kesehatan, 2011). Fungi mulai tumbuh disekitar potongan gaharu pada hari ke 3. Fungi yang tumbuh, diduga sebagai isolat fungi endofit diberi kode GA1,GA2,GA3, GA4 dan GA5. Pada hari ke 5 diameter koloni fungi semakin besar. Selanjutnya Isolat fungi dimurnikan ke media yang baru.



GAMBAR 4. Makroskopi isolat fungi GA4 (1a), Mikroskopi basidiospore isolat fungi GA4 dengan pembesaran 100x (2a), Mikroskopi Skeleto-binding hyphae atau miselia isolat fungi GA4 dengan pembesaran 100x (3a), Mikroskopi basidiospore dengan pembesaran 1000x (1b), Mikroskopi Skeleto-binding hyphae adalah hasil penelitian yang dilakukan oleh Huang 2017 (2b)

Hasil mikroskopik isolat fungi GA4 memiliki basidiospora dan skeleto-binding hyphae (Gambar 4a). Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Huang (2017) (Gambar 4b) bahwa, hasil yang diperoleh dari penelitian ini memiliki kemiripan struktur morfologi fungi, sehingga disimpulkan bahwa isolat fungi GA4 diyakini sebagai divisi *Basidiomycetes*.

Fermentasi dan Ekstraksi Isolat Fungi GA

Fermentasi fungi dilakukan dengan mengamati pertumbuhan isolat GA pada media PDB sambil dikocok menggunakan *shaker* selama 7 hari pada suhu ruang. Pada hari 5 dan 6 sudah mulai terbentuk pertumbuhan fungi, dan pada hari ke 7 massa fungi semakin bertambah. Kultur disaring dan filtrat kemudian dilakukan ekstraksi dengan menggunakan metode ekstraksi cair-cair (partisi). Metode ekstraksi cair-cair merupakan metode ekstraksi yang didasarkan pada sifat kelarutan komponen target dan distribusinya dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur, dimana sebagian komponen target larut pada fase pertama dan sebagian larut pada fase kedua (senyawa polar akan larut dalam pelarut polar, senyawa semipolar akan larut dalam pelarut yang semipolar, dan senyawa nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar) sehingga mudah dalam pengambilan komponen senyawa yang diinginkan (Khopkar, 2008). Pelarut yang digunakan

dalam ekstraksi ini yaitu etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut organik yang paling baik digunakan untuk menarik senyawa-senyawa yang bersifat semipolar (Arora, 2009).

Ekstrak fungi yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan alat evaporator yang bertujuan untuk menguapkan pelarut etil asetat. Setelah pelarut menguap, ekstrak fungi endofit kemudian ditimbang dan diperoleh sebanyak 0.016 g. Ekstrak fungi kemudian digunakan untuk melakukan uji antibakteri.

Uji aktivitas antibakteri ekstrak fungi GA

Uji aktivitas antibakteri ekstrak fungi gaharu dilakukan dengan menggunakan metode sumur. Masing-masing masukan ekstrak sebanyak 20 μ l (25 μ g/ μ L), kontrol positif (tetrasiklin 1 mg/ml) dan kontrol negatif (etil asetat) kedalam sumur yang dicampur bakteri *E. coli*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *S. thypi* dan *P. aeruginosa*.

TABEL 1. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

Bakteri Uji	Ekstrak Fungi (GA4)	Kontrol Positif (tetrasiklin 1 mg/ml)	Kontrol Negatif (etil asetat)
<i>E. coli</i>	-	+	-
<i>S. aureus</i>	-	+	-
<i>V. cholerae</i>	-	+	-
<i>S. thypi</i>	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	-

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa hasil dari ekstrak fungi, kontrol positif dan negatif terhadap pertumbuhan bakteri uji, dimana hanya kontrol positif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan ekstrak fungi dari gaharu tidak mampu dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji.

Pemanfaatan mikroba endofit sebagai sumber metabolit sekunder perlu didasari pada pemilihan tumbuhan inang yang tepat untuk diisolasi endofitnya. Pilihan tumbuhan inang akan mempengaruhi aktivitas biologis produk yang dihasilkan oleh mikroba endofit tersebut (Maksum, 2005). Endofit yang berasal dari daerah dengan biodiversitas tinggi memiliki potensi menghasilkan keanekaragaman kimiawi yang juga tinggi (Strobel *et al.*, 2004). Oleh karena itu pemilihan tanaman inang dan lingkungan sangat berpengaruh terhadap kandungan metabolit sekunder yang ada pada mikroba endofit.

SIMPULAN

Hasil isolat fungi gaharu dari pohon *Aquilaria* sp. yang diperoleh adalah isolat GA4 yang memiliki kemiripan dengan kelompok divisi *Basidiomycetes*. Ekstrak fungi endofit gaharu, dari pohon *Aquilaria* sp. tidak mampu menghambat pertumbuhan 5 bakteri uji, yaitu: *E. coli*, *S. aureus*, *V. cholerae*, *S. thypi*, dan *P. aeruginosa*.

DAFTAR PUSTAKA

- Arora, Daljit S., 2009, *Assay of Antioxidant Potential Of Two Aspergillus Isolates By Different Methods Under Various Physio-Chemical Conditions*, Brazilian Journal of Microbiology, 41: 765-777.
- Bitas, V., Kim, H. S, Bennett, J. W., Kang. S., 2013, *Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health*, MPMI 26:835–843.
- Erlyani., 2012, Identifikasi Kandungan Metabolit Sekunder dan Uji Antioksidan Ekstrak Metanol Tandan Bunga Jantan Enau (*Arenga pinnata* Merr.), Jurnal Skripsi Jurusan PMIPA FKIP Universitas Unhalu Kendari.
- Huang, R. Z., Lin, K. Y., and Fang, Y. J., 2009, *Review Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic*, Molecules, 14, 540-554.

- Katoch, M., Singh, G., Sharma, S, Gupta, N, Sangwan, P. L and Saxena, A.K., 2014, *Cytotoxic and antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from Bacopa monnieri (L.) Pennell (Scrophulariaceae)*, Microbial Biotechnology Department, Indian Institute of Integrative Medicine, Jammu, India. 14:52
- Kemenkes., 2011, Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik, 4-5, Kementrian Kesehatan RI, Jakarta.
- Khopkar, S.M., 2008, *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Maksum, R. 2005, Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit Dalam Perkembangan Obat Herbal. Maj. Ilmu Kefarmasian Indonesia. Vol.II, No.3, 113-126.
- Mends, M. T., Yu, E., Strobel, G. A., Riyaz, U. H. S, Booth, E., Geary, B., Sears, J., Taatjes, C. A., Hadi, M. Z., 2012, *An endophytic Nodulisporium sp. producing volatile organic compounds having bioactivity and fuel potential*, J Phylogenetics Evol Biol, 3:117–123.
- Pratiwi, D., 2019, Isolasi dan Identifikasi Fungi Endofit Tanaman Cabe Jawa (*Piper Retrofractum* VAHL.) serta Pemanfaatannya Sebagai Buku Ilmiah Populer, Skripsi. Universitas Jember.
- 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 Juli 2020. www.microrao.com/micronotes/sterilization.pdf.
- Setyaningrum, H. H. dan Saprianto C., 2014, Paduan Lengkap Gaharu, Penebar Swadaya Grup, Jakarta.
- Strobel, G., Daisy, B., and Castillo, U., Harper J., 2004, *Natural Products from Endophytic Microorganisms*, J Nat Prod. 67:257–268.
- Sumarna, Y., 2007, Budidaya Gaharu, Penebar Swadaya, Jakarta.
- Wibowo, M., Prachyawarakorn, V., Aree, T., Wiyakrutta, S., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Kittakoop, P., 2014, *Tricyclic and spirobicyclic norsesquiterpenes from the endophytic fungus Pseudolagarobasidium acaciicola*, Eur. J. Org. Chem, 19: 3976–3980.