ISOLASI DAN SELEKSI CENDAWAN ENDOFIT DARI TANAMAN BETADIN (*Jatropha multifida* L.) DAN POTENSINYA SEBAGAI ANTIMIKROBA

Israwati Harahap, Elsie, Indri Nurjanah

Universitas Muhammadiyah Riau
israwatiharahap@umri.ac.id

Abstract

*This research aimed to isolate and select endophytic fungi that potentially as antimicrobial from betadin plants (*Jatropha multifida* L.). Isolation of endophytic fungi was carried out using surface sterilization and selection of endophytic fungi using well diffusion method. A total of 13 isolates of endophytic fungi were obtained from *J. Multifida* L. From a total of 13 isolates, 11 isolates were able to inhibit the growth of *Candida albicans*, 11 isolate was able to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and 10 isolates were able to inhibit the growth of *Escherichia coli*.*

Keywords: Endophytic fungi, *Jatropha multifida* L., Antimicrobial

1. PENDAHULUAN

Cendawan endofit ialah mikroorganisme yang menghabiskan seluruh atau sebagian siklus hidupnya dengan mengkolonisasi jaringan sehat tumbuhan secara interseluler dan atau intraseluler tanpa membahayakan inangnya. Cendawan endofit mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan inangnya. Cendawan endofit pada tumbuhan merupakan sumber komponen bioaktif alami yang penting dan baru, salah satunya berupa zat antimikroba. Tumbuhan yang sering dieksplorasi cendawan endofitnya sebagai sumber zat antimikroba tersebut ialah tanaman obat.

Tanaman obat telah diketahui sebagai inang yang baik bagi berbagai cendawan endofit (Hongsheng *et al.* 2010). Betadin (*Jatropha multifida* L.) merupakan salah satu tanaman obat yang belum banyak dikenal dan dimanfaatkan secara optimal oleh masyarakat Indonesia. Tanaman betadin diketahui mengandung alkaloid dan flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman dan merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol dan metanol. Senyawa ini dapat digunakan sebagai antimikroba, obat infeksi pada luka dan antifungi. Selain itu flavonoid juga dapat digunakan sebagai antibakteri, antialergi, sitotoksik, dan anti hipertensi (Rijke, 2005).

Sejauh ini penelusuran dan pemanfaatan senyawa aktif dari tanaman betadin masih terbatas dalam isolasi senyawa yang dihasilkan oleh tanaman betadin tersebut sehingga akan membutuhkan banyak biomassa. Cara yang efisien untuk memperoleh senyawa bioaktif tersebut adalah dengan menggunakan cendawan endofit. Kemampuan mikroorganisme endofit dalam memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat baik (Petrini *et al.*, 1992; Ren & Wen 2001).

Manfaat cendawan endofit yang potensial tersebut dapat dimanfaatkan untuk mengobati penyakit infeksi, terutama yang disebabkan oleh bakteri patogen. Sejumlah bakteri patogen telah mengalami resistensi terhadap antibiotik, contohnya adalah resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap oxacillin, tetrasiklin, dan trimetoprim (Shittu *et al.* 2011). Oleh karena itu, perlu dilakukan isolasi dan seleksi cendawan endofit dari tanaman betadin dan mengetahui potensinya dalam menghasilkan senyawa antimikroba.

2. METODOLGI PENELITIAN

Isolasi Cendawan Endofit

Isolasi cendawan endofit dilakukan dengan mengacu pada Okane *et al.* (2008). Bagian tanaman betadin yang digunakan adalah batang, daun dan bunga dalam kondisi segar. Sampel

tanaman dalam keadaan segar dibersihkan dengan air mengalir kemudian dipotong-potong sepanjang 1-3 cm dan dipisahkan menurut bagian tanamannya. Potongan sampel direndam dalam etanol 70% selama 1 menit, larutan natrium hipoklorit 1% selama 2 menit, dan dicuci dengan etanol 70% selama 30 detik. Seluruh sampel direndam kembali dengan aquades steril sebanyak 3 kali pengulangan selama 1 menit. Selanjutnya, bilasan terakhir dari aquades diambil sebanyak 5 ml dan diinokulasi ke cawan Petri yang telah berisi media *Malt Extract Agar* (MEA) untuk dijadikan blanko. Kemudian sampel batang, daun dan bunga betadin dikeringkan menggunakan tisu steril selama ± 3 jam. Sampel dipotong-potong dengan ukuran 1-3 cm. Sebanyak 6 potong sampel (6 potong/cawan) dari setiap bagian tanaman diletakkan pada media *Malt Extract Agar* (MEA) dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 1 bulan. Ujung hifa dari setiap koloni yang tumbuh diisolasi dan dimurnikan dengan menumbuhkan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA).

Produksi Senyawa Antimikroba dari Cendawan Endofit

Setiap isolat cendawan endofit yang tumbuh pada media PDA diambil sebanyak 6 potongan dengan menggunakan sedotan steril dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi 10 ml media *Potato Dextrose Broth* (PDB). Kemudian diinkubasi di dalam *shaking incubator* selama 21-28 hari dengan kecepatan 120 rpm dan suhu 28°C.

Persiapan Mikroba Uji

Sebanyak satu ose koloni *Candida albicans* diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi 10 ml media *Potato Dextrose Yeast* (PDY) cair, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 18-24 jam. Sebanyak satu ose koloni *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diinokulasikan ke dalam masing-masing tabung reaksi yang sudah berisi 10 ml media *Nutrient Broth* (NB), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Seleksi Untuk Memperoleh Isolat Cendawan Endofit Potensial

Uji aktivitas antimikroba dari cendawan endofit menggunakan metode sumuran. *Candida albicans* yang sudah ditumbuhkan pada media PDY cair selama 18-24 jam diambil menggunakan *cotton bud*. Selanjutnya di *swab* secara horizontal ke media PDY Agar dan dibiarkan selama 5 menit. Kemudian, media PDY Agar dilubangi dengan menggunakan sedotan steril yang berdiameter 6 mm sebanyak 3 sumuran percawan. Setiap sumuran diisi dengan 0,1µl dari hasil fermentasi cendawan endofit yang telah ditumbuhkan pada media PDB. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu ruang dan diamati zona hambat yang terbentuk selama 24-48 jam.

Bakteri uji yang sudah ditumbuhkan pada media NB selama 24 jam diambil dengan menggunakan *cotton bud*. Selanjutnya di *swab* secara horizontal ke media NA. Cawan Petri yang sudah berisi media NA dilubangi dengan menggunakan sedotan steril yang berdiameter 6 mm sebanyak 3 sumuran percawan. Setiap sumuran diisi dengan 0,1µl dari hasil fermentasi isolat cendawan endofit. Kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C dan diamati zona hambat yang terbentuk selama 24-48 jam.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Cendawan Endofit dari Tanaman Betadin (*J. multifida* L.)

Sebanyak 13 isolat cendawan endofit berhasil diisolasi dari tanaman betadin (*J. multifida* L.) yaitu 8 isolat diperoleh dari daun, 3 isolat dari bunga dan 2 isolat dari batang (Tabel 3.1).

Tabel 3.1.

Hasil Isolasi Cendawan Endofit dari Tanaman Betadin (*J. multifida* L.)

Kode isolat	Organ tanaman betadin (<i>J. multifida</i> L.)		
	Daun	Batang	Bunga
IN 001	-	✓	-
IN 002	-	✓	-
IN 003	-	-	✓
IN 004	-	-	✓

Kode isolat	Organ tanaman betadin (<i>J. multifida</i> L.)		
	Daun	Batang	Bunga
IN 005	-	-	✓
IN 006		-	-
IN 007		-	-
IN 008		-	-
IN 009		-	-
IN 010		-	-
IN 011		-	-
IN 012		-	-
IN 013		-	-
Jumlah isolat	8 isolat	2 isolat	3 isolat
Keterangan: ✓: ditemukan -: tidak ditemukan			

Tabel 3.1 menunjukkan bahwa jumlah isolat cendawan endofit yang diperoleh dari bagian daun tanaman betadin lebih banyak dibandingkan dengan batang dan bunga. Hal ini diduga bahwa di daun merupakan tempat utama terjadinya proses fotosintesis pada tumbuhan sehingga pada bagian organ tersebut jumlah nutrisi lebih banyak dibandingkan organ lain dan akan mendukung pertumbuhan cendawan endofit. Noverita *et al.* (2009), menyatakan bahwa sumber nutrisi yang terdapat di bagian daun lebih banyak atau lebih mendukung untuk pertumbuhan cendawan endofit.

Petrini *et al.* (1992), menyatakan bahwa kehadiran jenis cendawan endofit dapat dihubungkan dengan kondisi mikrohabitat tanaman inang dan kecocokan genotip antara tanaman inang dan cendawan endofit, sehingga akan berpengaruh terhadap perbedaan dalam kondisi koloni endofit dan tingkat infeksi tanaman inang yang di tempati oleh cendawan endofit pada lokasi yang sama.

Seleksi Isolat Cendawan Endofit dalam Menghasilkan Senyawa Antimikroba

Hasil seleksi dari 13 isolat cendawan endofit yang berhasil diisolasi menunjukkan bahwa 11 isolat mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans* (Tabel 3.2).

Tabel 3.2.

Uji Aktivitas Antifungi Isolat Cendawan Endofit dari Tanaman Betadin (*J. multifida* L.) terhadap *C.albicans*

Kode Isolat	Zona Hambat (mm)	Kategori
IN 001	-	-
IN 002	7 mm	Lemah
IN 003	9 mm	Lemah
IN 004	-	-
IN 005	2 mm	Lemah
IN 006	9 mm	Lemah
IN 007	11 mm	Sedang
IN 008	14 mm	Sedang
IN 009	9 mm	Lemah
IN 010	8 mm	Lemah
IN 011	7 mm	Lemah
IN 012	9 mm	Lemah
IN 013	19 mm	Kuat

Keterangan: -: tidak memiliki zona hambat

Tabel 3.2 menunjukkan bahwa isolat IN 013 memperlihatkan aktivitas tertinggi dalam menghambat pertumbuhan *C.albicans* dengan zona hambat sebesar 19 mm yang termasuk ke dalam kategori kuat (Gambar 3.1) diikuti oleh isolat IN 008 dan IN 007 dengan zona hambat masing-masing sebesar 14 mm dan 11 mm. Selanjutnya diikuti oleh isolat IN 002, IN 003, IN 005, IN 006, IN 009, IN 010, IN 011 dan IN 012 yang termasuk ke dalam kategori lemah dan 2 isolat yaitu IN 001 dan IN 004 tidak mampu menghambat pertumbuhan *C.albicans*. Alfiah *et al.* (2015), menyatakan bahwa daerah hambat yang terbentuk < 10 mm termasuk ke dalam kategori lemah, 10-15 mm termasuk ke dalam kategori sedang, 16-20 mm masuk dalam kategori kuat, dan >20 mm termasuk ke dalam kategori sangat kuat.

Gambar 3.1. Uji aktivitas antifungi isolat IN 013 terhadap pertumbuhan *C.albicans*

Zona hambat yang terbentuk dari senyawa antifungi yang dihasilkan oleh masing-masing isolat memiliki diameter yang berbeda-beda. Terbentuknya diameter yang berbeda-beda pada hasil pengamatan uji aktivitas antifungi dikarenakan kemampuan isolat dalam menghambat pertumbuhan *C.albicans* juga berbeda-beda. Menurut Sugiyanto (2007), cendawan endofit mampu menghasilkan aktivitas antifungi, antibakteri, hormon pertumbuhan tanaman dan insektisida

Uji aktivitas antibakteri dari 13 isolat yang berhasil diisolasi menunjukkan bahwa 10 isolat mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan 11 isolat mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* (Tabel 3.3).

Tabel 3.3. Uji Aktivitas Antibakteri Isolat Cendawan Endofit dari Tanaman Betadin (*J. multifida* L.)

Kode Isolat	Bakteri Uji			
	E.coli		S.aureus	
	Zona Hambat (mm)	Kategori	Zona Hambat (mm)	Kategori
IN 001	7 mm	Kuat	10 mm	Kuat
IN 002	-	-	11 mm	Kuat
IN 003	4 mm	Sedang	7 mm	Kuat
IN 004	2 mm	Lemah	4 mm	Sedang
IN 005	4 mm	Sedang	6 mm	Sedang

Kode Isolat	Bakteri Uji			
	E.coli		S.aureus	
	Zona Hambat (mm)	Kategori	Zona Hambat (mm)	Kategori
IN 006	6 mm	Sedang	3 mm	Lemah
IN 007	2 mm	Lemah	7 mm	Kuat
IN 008	4 mm	Sedang	9 mm	Kuat
IN 009	8 mm	Kuat	6 mm	Sedang
IN 010	4 mm	Sedang	5 mm	Sedang
IN 011	-	-	-	-
IN 012	-	-	-	-
IN 013	6 mm	Sedang	3 mm	Lemah

Keterangan: -: tidak memiliki zona hambat

Tabel 3.3. menunjukkan hasil uji aktivitas antibakteri dari cendawan endofit yang mampu menghambat pertumbuhan *E.coli*, diperoleh 2 isolat yang termasuk ke dalam kategori kuat yaitu IN 001 dan IN 009 dengan diameter masing-masing sebesar 7 mm dan 8 mm, 6 isolat termasuk ke dalam kategori sedang (IN 003, IN 005, IN 006, IN 008, IN 010, IN 013), 2 isolat dikategorikan lemah (IN 004, IN 007), dan 3 isolat (IN 002, IN 011, IN 012) tidak menunjukkan adanya zona hambat. Isolat yang mampu menghambat pertumbuhan *S.aureus* yang masuk ke dalam kategori kuat yaitu 5 isolat (IN 001, IN 002, IN 003, IN 007, IN 008) dengan diameter masing-masing 10 mm, 11 mm, 7 mm dan 9. Empat isolat masuk ke dalam kategori sedang (IN 004, IN 005, IN 009, IN 010), 2 isolat dikategorikan lemah (IN 006, IN 013) dan 2 isolat (IN 011, IN 012) tidak memperlihatkan zona hambat. Pan *et al.* (2009) menyatakan bahwa diameter zona hambat 0-3 mm masuk ke dalam kategori lemah, 3-6 mm dikategorikan sedang dan > 6 mm masuk ke dalam kategori kuat. Kisaran zona hambat yang dihasilkan oleh 13 isolat cendawan endofit tersebut adalah 3 mm-11 mm.

Gambar 3.2. Uji aktivitas antibakteri terhadap *E.coli* dari isolat IN 9 (A) dan Uji aktivitas antibakteri terhadap *S.aureus* dari isolat IN 2 (B)

Zona hambat yang terbentuk menunjukkan aktivitas suatu senyawa antibakteri dalam menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri patogen. Menurut (Prihatiningtias & Wahyuningsih, 2006), metabolit sekunder yang dihasilkan cendawan bersifat bioaktif, salah satunya dapat berupa senyawa antimikroba yang mampu menghambat atau membunuh mikroorganisme patogen.

Hasil pengamatan diameter zona hambat yang dihasilkan oleh cendawan endofit terhadap bakteri gram positif secara umum lebih besar dari pada bakteri gram negatif. hal ini diduga dikarenakan oleh komponen penyusun dinding sel dari masing-masing bakteri tersebut berbeda. menurut (Jawetz *et al.*, 2004) bahwa bakteri gram positif memiliki struktur dinding sel berlapis tunggal dan mengandung lipid yang rendah yaitu 1 – 4%, sedangkan pada bakteri gram negatif

mempunyai dinding sel yang berlapis tiga yaitu lipoprotein, membran luar fosfolipid dan lipopolisakarida serta kandungan lipid yang tinggi yaitu 11 – 22% sehingga memudahkan senyawa antibakteri untuk masuk ke dalam sel bakteri gram positif.

Isolat yang tidak menunjukkan adanya zona hambat di sekitar sumuran pada uji aktivitas antibakteri yang telah dilakukan, diduga isolat cendawan endofit tersebut memiliki kandungan senyawa bioaktif yang berbeda-beda kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan *E.coli* dan *S.aureus*. Menurut Son & Cheah (2002), bahwa tidak terbentuknya zona hambat ketika uji aktivitas antimikroba yang telah dilakukan bukan karena cendawan tersebut tidak memiliki kandungan senyawa aktif, namun jumlahnya lebih kecil atau mengandung senyawa aktif potensial yang lain. Kemampuan dalam menghambat pertumbuhan mikroba dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya konsentrasi zat antimikroba, aktifitas metabolit bakteri, serta fisik dan kimia makanan termasuk pH, suhu, kadar air, jenis dan jumlah senyawa di dalamnya (Frazier & Westhoff, 1988).

4. SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan yaitu 13 isolat cendawan endofit berhasil diperoleh dari tanaman betadin (*Jatropha multifida* L.) yang terdiri dari 8 isolat ditemukan pada daun 3 isolat dari bunga dan 2 isolat ditemukan pada batang. Seleksi dari 13 isolat cendawan endofit yang berpotensi penghasil senyawa antimikroba menunjukkan bahwa 11 isolat mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans*, 11 isolat mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan 10 isolat mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

Sepuluh isolat yang berhasil diisolasi dari tanaman betadin memiliki potensi yang berbeda dalam menghasilkan senyawa antimikroba. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengidentifikasi semua isolat yang telah berhasil diisolasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas atas bantuan dana penelitian Internal yang diberikan sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alfiah, R. R., Khotimah, S. dan Turnip, M. 2015. Efektivitas Ekstrak Metanol Daun Sembung Rambat (*Mikania micrantha* Kunth) Terhadap Pertumbuhan Jamur *Candida albicans*. *Jurnal Protobiont*. Vol. 4. No. 1. Hal 53.
- Hongsheng Y, Lei Z, Lin L, Chengjian Z, Lei G, Wenchao L, Peixin S, Luping Q. 2010. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol Res* 165:437–449.doi:10.1016/j.micres.2009.11.009
- Jawetz, E., J.L. Melnick., E.A. Adelberg., G.F. Brooks., J.S . Butel., dan L.N. Ornston. 2004. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi ed. 20 (Alih bahasa: Nugroho & R.F.Maulany). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Noverita, D. Fitria, dan E. Sinaga. 2009. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit Dari Daun dan Rimpang *Zingiber ottensii* Val. *Jurnal Farmasi Indonesia* Vol. 4 No. 4: 171-176.
- Okane, I., Srikitikulchai, P., Toyama, K., Læssøe, T., Sivichai, S., Jones, H.H., Nakagiri, A., Potacharoen, W., Suzuki, K. 2008. Study of endophytic Xylariaceae in Thailand: diversity and taxonomy inferred from rDNA sequence analyses with saprobes forming fruit bodies in the field. *The Mycological Society of Japan and Springer* 49:359–372.
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., and Zhao, Z. 2009. The acid, Bile Tolerance and Antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *J. Food Control* 20: 598-602.
- Petrini O, Thomas NS, Toti L, Viret O. 1992. Ecology, metabolite production and substrat utilization in endophytic fungi. *Nat toxin*. 1:185-196.
- Prihatiningtias, W dan M. S. H. Wahyuningsih. 2006. Prospek Mikroba Endofit Sebagai Sumber Senyawa Bioaktif. *Artikel Kesehatan*. Universitas Gadjra Mada. Yogyakarta
- Rijke E. 2005. *Trace-level Determination of Flavonoids and Their Conjugates Application ti Plants of The Leguminosae Family*. Amst erdam: Universitas Amst erdam.
- Shittu AO, Okon K, Adesida S, Oyedara O, Witte W, Strommenger B, Layer F, Nubel U. 2011. Antibiotic resistance and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Nigeria. *BMC Microbiol* 11(92):1-8.doi:10.1186/1471-2180-11-92
- Son R. dan Cheah YK. 2002. Preliminary Screening of Endophytic Fungi from Medical Plants in Malaysia for Antimicrobial and Antitumor Activity. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 9(2): 23–33.
- Sugiyanto, N.E. 2007. *Isolasi dan Determinasi Berbagai Jamur Endofit Dari Tanaman Aglaia Elliptica, Aglaia Eusideroxylon, Aglaia Odorata dan Aglaia Odoratissima*. Faculty of Pharmacy Airlangga University. <http://www.library.unair.ac.id>. Akses tanggal 10 Juli 2016