

Isolasi dan Karakterisasi Fungi Endofit dari Daun Tanaman Bintaro (*Cerbera odollam*) yang Berpotensi sebagai Antibakteri

Suwandi Wonowijaya*^(a) dan Lisa Soegianto^(a)

^aFakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

Kebutuhan antibiotik yang semakin meningkat memacu untuk menemukan senyawa yang mempunyai aktivitas antimikroba dari bahan alam. Salah satu cara untuk mendapatkan senyawa antimikroba adalah melalui fungi endofit. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi fungi endofit yang didapat dari daun tanaman Bintaro (*Cerbera odollam*) yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Permukaan daun disterilisasi dengan cara direndam dalam alkohol 70% selama 2 menit, natrium hipoklorit 5,3% selama 5 menit, alkohol 70% selama 1 menit, dibilas menggunakan akuades steril dan dikeringkan menggunakan tisu steril. Daun Bintaro yang sudah disterilisasi ditanam pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 7-14 hari. Fungi yang tumbuh diinokulasikan pada media *Potato Dextrose Yeast* (PDY) selama 7-14 hari pada suhu ruang berdasarkan perbedaan makroskopisnya. Fungi endofit yang sudah murni secara makroskopis diuji aktivitas antibakterinya pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dilanjutkan pengamatan makroskopis dan mikroskopisnya. Diperoleh tiga jenis fungi endofit yang diisolasi dari daun tanaman bintaro (*Cerbera odollam*) dengan kode EB 1, EB 2, dan EB 3 yang diduga genus *Fusarium*, *Geotrichum* dan *Aspergillus*. Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan ketiga fungi endofit yang diperoleh tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Kata Kunci: Fungi endofit, daun bintaro, *Cerbera odollam*.

Isolation and Characterization of Endophytic Fungi from Bintaro (*Cerbera odollam*) Leaves as a Potential Antibacterial Agent

The need of antibiotics is increasing, spurred to find compounds that have antimicrobial activity from natural ingredients. One way to obtain antimicrobial compounds is through endophytic fungi. This study aimed to isolate and characterize endophytic fungi obtained from the leaves of the plant Bintaro (*Cerbera odollam*) that potential as an antibacterial against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Leaf surface was sterilized by soaking in 70% alcohol for 2 minutes, 5.3% sodium hypochlorite for 5 minutes, 70% alcohol for 1 minute, rinsed with sterile distilled water and dried using sterile wipes. Bintaro leaf that have been sterilized was put on *Potato Dextrose Agar* (PDA) and then incubated at room temperature for 7-14 days. The growing fungi was inoculated in *Potato Dextrose Yeast* (PDY) for 7-14 days at room temperature based on the macroscopic difference. Endophytic fungi that have been pure in macroscopic way was tested antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and continued to macroscopic and microscopic observation. Obtained three types of endophytic fungi were isolated from bintaro leaves (*Cerbera odollam*) with the code EB 1, EB 2 and EB 3 that suspected from genus *Fusarium*, *Geotrichum* and *Aspergillus*. The antibacterial activity test show that results of three endophytic fungi obtained has no antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Keywords : Endophytic fungi, Bintaro leaves, *Cerbera odollam*.

*Corresponding author: Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Jl. Raya Kalisari Selatan No. 1 Surabaya, e-mail: suwandi097@gmail.com

PENDAHULUAN

Kebutuhan antibiotik yang semakin meningkat, memacu untuk menemukan senyawa yang mempunyai aktivitas antimikroba pada bahan alam. Salah satu caranya ialah dengan mengisolasi fungi endofit. Endofit adalah mikroorganisme yang tinggal dalam jaringan tanaman dan bersimbiosis dengan tanaman tersebut. Senyawa yang dihasilkan oleh mikroba endofit bisa berpotensi sebagai antidiabet, antimikroba, antifungi, antivirus, antioksidan, antiinflamasi, dan antimalaria (Kumala, 2014).

Salah satu tanaman yang berpotensi menghasilkan senyawa antimikroba ialah tanaman dari familia Apocynaceae yaitu tanaman Bintaro yang memiliki fungsi sebagai antibakteri (Cheenpracha *et al.*, 2004). Penelitian yang telah dilakukan pada tanaman Bintaro antara lain yaitu memiliki daya insektisida yang kuat terhadap larva *Spodoptera litura* (Utami, Syaufina dan Haneda, 2010). Pada penelitian yang lainnya dilakukan uji potensi antibakteri dari ekstrak etanol daun bintaro terhadap *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*. Hasil yang didapat, ekstrak etanol dari daun bintaro pada konsentrasi 4% mampu memberikan Kadar Hambat Minimum (KHM) pada kedua bakteri tersebut, tetapi pada konsentrasi tersebut belum dapat memberikan Kadar Bunuh Minimum (KBM) yang ditandai dengan masih adanya pertumbuhan (Wulandari, 2014).

Fungi endofit akan diisolasi dari daun tanaman Bintaro dengan proses sterilisasi permukaan. Tujuan dari penelitian ini untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi fungi endofit yang didapat dari daun tanaman Bintaro (*Cerbera odollam*) yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan yaitu gunting, pisau bedah, kamera mikroskop, vortex, jangka sorong, timbangan analitis, oven, autoclave, Laminar Air Flow, penangas air, cawan petri, gelas ukur dan alat gelas lainnya.

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Daun tanaman Bintaro yang didapatkan dari Surabaya Timur, akuades, natrium hipoklorit (NaOCl) 5,3%, NaCl, etanol 96% teknis, etanol 70% teknis, $\frac{1}{2}$ Mc Farland I, spiritus, larutan iodium, larutan laktofenol, susu skim, *oleum coccus*, tisu steril, *Eschericia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Potato Dextrose Agar* dan media-media pertumbuhan lainnya.

Proses Determinasi, Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis pada Daun Tanaman Bintaro (*Cerbera odollam*)

Daun tanaman Bintaro dideterminasi oleh UPT Materia Media, Batu, Jawa Timur untuk penentuan kunci determinasi. Pengamatan makroskopis meliputi bentuk daun, tulang daun, warna daun, ukuran daun dan filotaksis daun. Pengamatan mikroskopis meliputi bagian epidermis atas, stomata, jaringan palisade, jaringan bunga karang, berkas pembuluh dan saluran getah.

Isolasi Fungi Endofit Daun Tanaman Bintaro (*Cerbera odollam*)

Metode yang digunakan ialah sterilisasi permukaan daun dimana daun Bintaro dipotong menjadi 5 bagian kemudian direndam dalam alkohol 70% selama ± 2 menit, natrium hipoklorit 5,3% selama 5 menit, alkohol 70% selama 1 menit, dibilas menggunakan akuades steril kemudian dikeringkan. Potongan tersebut ditanam dalam media *Potato Dextrose Agar*, diinkubasi pada suhu 27°C-30°C selama 2-14 hari.

Pemurnian Fungi Endofit Daun Tanaman Bintaro (*Cerbera odollam*)

Fungi yang tumbuh dan teramati berbeda secara makroskopis dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media *Potato Dextrose Yeast* sebanyak 5 ml lalu diinkubasi selama 2-14 hari. Fungi endofit yang tumbuh dalam *Potato Dextrose Yeast* diinokulasikan ke dalam media *Potato Dextrose Agar*. Proses ini dilakukan berulang kali sampai fungi yang didapatkan benar-benar murni.

Persiapan Bakteri Uji

Suspensi bakteri dibuat dengan mensuspensikan *Eschericia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dalam larutan NaCl 0,9% yang setara dengan larutan $\frac{1}{2}$ Mc Farland I ($\pm 1,5 \cdot 10^8$ m.o/ml) yang sudah dipastikan kemurniannya dengan pengamatan makroskopis dan mikroskopis dengan pengecatan Gram pada larutan NaCl 0,9% yang kekeruhannya disetarakan dengan larutan $\frac{1}{2}$ Mc Farland I ($\pm 1,5 \cdot 10^8$ m.o/ml).

Uji Aktivitas Antibakteri Fungi Endofit Daun Tanaman Bintaro (*Cerbera odollam*)

Eschericia coli ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 yang setara dengan larutan $\frac{1}{2}$ Mc Farland I dipipet 0,1 ml kemudian dimasukkan ke dalam 10 ml *Plate Count Agar*, dihomogenkan dengan divortex lalu dituang ke dalam cawan petri dan dilakukan pra inkubasi selama 1,5-2 jam pada suhu 37°C. Fungi endofit yang sudah tumbuh pada media *Potato Dextrose Yeast* diinokulasikan pada media *Plate Count Agar* tersebut. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang (27°C-30°C) selama 24 jam, dilakukan pengamatan Daerah Hambatan Pertumbuhan (DHP) di sekitar fungi yang ditandai dengan daerah jernih dan ukur diameter Daerah Hambatan Pertumbuhan (DHP) yang terbentuk.

Karakterisasi Fungi Endofit

Karakterisasi fungi meliputi pengamatan makroskopis, mikroskopis, uji biokimia (uji hidrolisa amilum, uji hidrolisa gelatin, uji hidrolisa kasein, dan uji hidrolisa lemak) dan skrining fitokimia.

Analisis Data

Rasio diameter Daerah Hambatan Pertumbuhan (DHP) ditandai dengan terbentuknya daerah jernih di sekitar fungi endofit, diamati dan diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong. Nilai rasio didapatkan dengan cara membagi diameter DHP dengan diameter kapang. Karakterisasi disesuaikan dengan data dari hasil pengamatan yang didapat dengan pustaka dari Watanabe (2002).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daun tanaman Bintaro dideterminasi oleh UPT Materia Medika, Batu, Jawa Timur. Pengamatan makroskopis daun tanaman Bintaro bisa dilihat pada Tabel 1. Pada pengamatan mikroskopis, daun memiliki tipe berkas pembuluh bikolateral, stomata dengan tipe parasitik dan memiliki kristal yang berbentuk prisma. Dari hasil isolasi diperoleh 3 jenis fungi endofit yang berasal dari daun tanaman Bintaro (*Cerbera odollam*) yang bisa dilihat pada Gambar 1. Menurut Kumala (2014), fungi endofit yang diperoleh dari daun lebih banyak dari bunga karena daun memiliki permukaan yang luas dan lapisan kutikula yang tipis.

Pengamatan makroskopis dan mikroskopis dilakukan pada fungi endofit yang diperoleh dari proses isolasi. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan cara membuat preparat hidup dengan larutan laktofenol yang isotonis terhadap fungi dan bersifat antiseptik kemudian diamati di mikroskop. Isolat fungi dengan kode EB 1 memiliki makroskopis seperti tipe koloni filamen, sifat permukaan seperti kapas, warna putih abu-abu, usia 5 hari dan ukuran koloni 7,85 cm. Isolat fungi dengan kode EB 2 memiliki makroskopis seperti tipe koloni filamen, sifat permukaan seperti kapas, warna putih jingga, usia 5 hari dan ukuran koloni 8,35 cm. Isolat fungi dengan kode EB 3 memiliki makroskopis seperti tipe koloni filamen, sifat permukaan seperti beludru, warna hijau lumut, usia 5 hari dan ukuran koloni 5,35 cm. Pada pengamatan mikroskopis fungi endofit dengan kode EB 1 memiliki mikrokonidia, EB 2 memiliki konidia dan spora, dan EB 3 memiliki fialid dan konidia.

Ketiga fungi yang diperoleh dilakukan uji biokimianya meliputi uji hidrolisa amilum, uji hidrolisa gelatin, uji hidrolisa kasein dan uji hidrolisa lemak. Dari hasil pengujian hidrolisa amilum diperoleh bahwa fungi endofit dengan kode EB 1, EB 2 dan EB 3 menunjukkan hasil hidrolisa positif yang bisa dilihat pada Tabel 2. Ketiga fungi tersebut mampu menghasilkan enzim amilase. Pada pengujian

hidrolisa gelatin, fungi endofit dengan kode EB 1 dan 3 menghasilkan hasil hidrolisa positif yang ditandai dengan adanya daerah jernih di sekitar fungi setelah dituangi larutan HgCl₂ 12,6%. Ketiga fungi pada uji hidrolisa kasein mampu menghasilkan enzim kasease dimana terbentuk daerah jernih di sekitar fungi pada media *Skim Milk Agar*. Pada uji hidrolisa lemak, EB 1 dan EB 2 mampu menghasilkan enzim lipase dimana enzim ini mampu mengubah trigliserida menjadi gliserol dan 3 molekul asam lemak. Hasil skrining fitokimia menunjukkan fungi endofit dengan kode EB 2 menghasilkan alkaloid sedangkan EB 3 menghasilkan saponin yang bisa dilihat pada Tabel 3.

Tabel 1. Hasil pengamatan makroskopis daun tanaman Bintaro (*Cerbera odollam*).

Parameter	Hasil Pengamatan	*Pustaka
Warna permukaan atas	Hijau tua	Hijau
Warna permukaan bawah	Hijau muda	Hijau
Ukuran panjang	26-32 cm	15-20 cm
Ukuran lebar	5-7 cm	3-5 cm
Tulang daun	Menyirip	Menyirip
Tepi daun	Rata	Rata

*Pranowo, 2010

Tabel 2. Hasil pengamatan uji biokimia fungi endofit dari daun tanaman Bintaro (*Cerbera odollam*).

Fungi Endofit	Hidrolisa			
	Amilum	Gelatin	Kasein	Lemak
EB 1	+	+	+	+
EB 2	+	-	+	+
EB 3	+	+	+	-

Keterangan :

+: Hidrolisa positif

- : Hidrolisa negatif

Tabel 3. Hasil pengamatan skrining fitokimia fungi endofit dari daun tanaman Bintaro (*Cerbera odollam*).

Fungi Endofit	A	S	F	Ta	St	T
EB 1	-	-	-	-	-	-
EB 2	+	-	-	-	-	-
EB 3	-	+	-	-	-	-

Ket: A:Alkaloid; S:Saponin; F:Flavonoid;Ta: Tanin; St:Sterol; T:terpen

Pengamatan mikroskopis pada fungi endofit yang diperoleh dengan kode EB 1, EB 2 dan EB 3 disesuaikan dengan pustaka Watanabe (2002). Diduga fungi endofit dengan kode EB 1 termasuk dalam genus *Fusarium*, EB 2 termasuk dalam genus *Geotrichum*, dan EB 3 termasuk dalam genus *Aspergillus*.

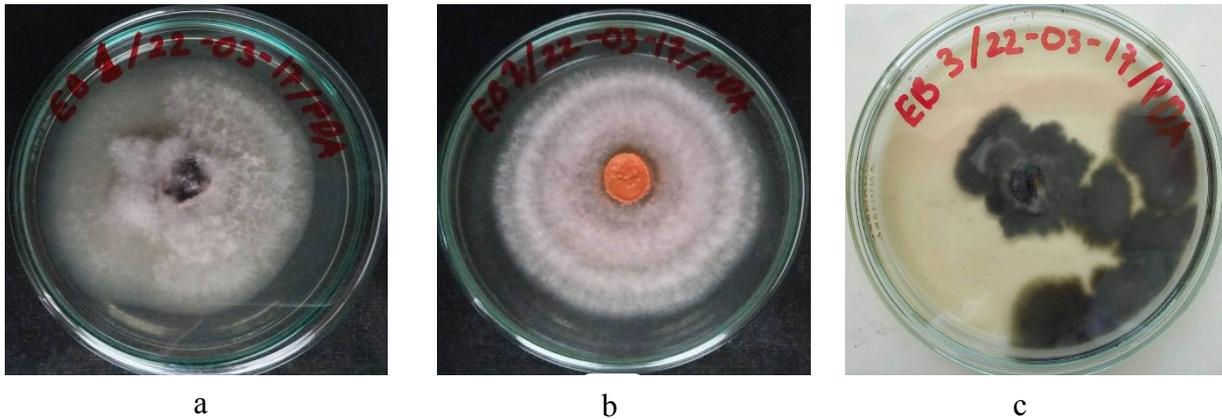
Fungi endofit yang diperoleh dari proses isolasi diuji aktivitasnya menggunakan bakteri *Eschericia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Pemilihan kedua bakteri tersebut karena sebagai perwakilan dari bakteri Gram negatif dan Gram positif. Hasil uji aktivitas antibakteri dari 3 fungi endofit hasil isolasi dari tanaman Bintaro (*Cerbera odollam*) tidak menunjukkan daya antibakteri terhadap *Eschericia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya daerah jernih di sekitar fungi endofit sehingga rasio DHP untuk ketiga fungi tersebut adalah 0. Hasil uji aktivitas antibakteri bisa dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil pengukuran uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Eschericia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Kode Fungi	Rasio Diameter DHP	
	<i>Eschericia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
EB 1	0	0
EB 2	0	0
EB 3	0	0

KESIMPULAN

Fungi endofit yang dapat diisolasi dari daun tanaman Bintaro adalah genus *Fusarium*, *Geotrichum* dan *Aspergillus*. Ketiga fungi endofit tersebut tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Eschericia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.



Gambar 1. Kultur fungi endofit murni dari daun tanaman Bintaro (*Cerbera odollam*) pada usia 5 hari pada media *Potato Dextrose Agar*. Keterangan : (a) EB 1, (b) EB 2, (c) EB 3.

Daftar Pustaka

Cheenpracha, S., Karalai, C., Ratapa, Y., Ponglimanont, C. and Chantrapromma, K. 2004, New Cytotoxic Cardenolide Glycoside from the Seeds of *Cerbera manghas*, *Chem. Pharm. Bull.* 52(8): 1023-1025.

Kumala, S. 2014, *Mikroba Endofit, Pemanfaatan Mikroba Endofit dalam Bidang Farmasi*, ISFI Penerbitan, Jakarta.

Pranowo, D. 2010, Bintaro Tanaman Penghasil Minyak Nabati, *Tree*, 1(23): 91.

Utami, S., Syaufina, L. dan Haneda, N.F. 2010, Daya Racun Ekstrak Kasar Daun Bintaro (*Cerbera odollam* Gaertn.)

Terhadap Larva *Spodoptera litura* Fabricius, *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 15(2), 96-100.

Watanabe, T. 2002, *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*, 2nded., CRC Press, USA.

Wulandari, M.A. 2014, Potensi Antibakteri dan Bioautografi Ekstrak Etanol Daun Bintaro (*Cerbera odollam* Gaertn.) terhadap *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*, *Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta*, Surakarta.