

ISOLASI KAPANG ENDOFIT DARI TANAMAN GAHARU (*AQUILARIA MALACCENSIS* LAMK)

Eka Pebi Hartianty

Universitas Gunadarma, ekapebi@staff.gunadarma.ac.id

ABSTRAK

*Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya tersebut. Pemanfaatan mikroba endofit sebagai sumber molekul acuan baru perlu didasari pada pemilihan jenis tumbuhan inang yang tepat. Pilihan tersebut akan mempengaruhi keunikan dan aktivitas biologis produk yang dihasilkan dari mikroba endofit. Tumbuhan yang memiliki sejarah etnobotani yang menjanjikan untuk diteliti adalah *Aquilaria malaccensis* Lamk., yang sejak lama digunakan sebagai antimikroba. Hasil isolasi kapang dari cabang ke-4 ranting ke-2 tanaman *Aquilaria malaccensis* Lamk. yang diambil dari Kebun Raya Bogor, diperoleh 5 isolat kapang endofit. Masing-masing isolat kapang memiliki karakteristik morfologi yang berbeda, begitu pula dengan adanya perbedaan diameter isolat kapang yang diukur pada hari yang sama.*

*Kata kunci: *Aquilaria malaccensis* Lamk., kapang endofit, isolasi*

PENDAHULUAN

Pemanfaatan sumber daya hayati terutama tanaman obat sampai saat ini masih banyak dilakukan dengan mengeksplorasi senyawa kimia yang terkandung dalam tanaman. Hal ini tentunya membutuhkan simplisia tanaman yang dengan jumlah besar, sehingga dikhawatirkan bahwa sumber daya hayati akan musnah disebabkan karena adanya kendala dalam budidaya (Radji M, 2005). Untuk itu perlu dicari alternatif sumber senyawa kimia yang memiliki potensi yang berguna dalam bidang obat-obatan.

Saat ini suatu metode dalam menghasilkan senyawa aktif dalam waktu yang lebih singkat dengan memanfaatkan mikroba endofit (Simanjuntak P, Parwati T, Prana KT, 2002). Beberapa kajian terhadap mikroba endofit terbukti mempunyai potensi ekonomi yang cukup penting, baik sebagai penghasil antibiotika maupun metabolit sekunder lain yang berguna (Wahyudi P). Menurut Tan dan Zou, apabila mikroba endofit dapat menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang langka dan penting seperti tumbuhan inangnya, maka kebutuhan untuk menumbuhkan tumbuhan yang masa hidupnya panjang dan mungkin termasuk langka akan berkurang dan keanekaragaman hayati dunia juga terlindungi. Selain itu, penggunaan mikroba sebagai sumber suatu

produk akan memudahkan proses dan mengurangi biaya produksi, sehingga pada akhirnya menghasilkan produk dengan harga lebih murah (Prasetyoputri A, Atmosukarto I, 2006).

Dari berbagai hasil riset tentang fungi endofitik ini menunjukkan bahwa keanekaragaman dan manfaat fungi endofit ini sangat berlimpah. Namun riset ini belum banyak dilakukan di hutan tropis Indonesia. Dari sisi keanekaragaman hayati, tak diragukan lagi bahwa kekayaan fungi hutan tropis Indonesia sangat berlimpah dan bernilai sangat tinggi dalam konteks keanekaragaman global. Fungi endofit mempunyai peranan dalam rantai makanan di ekosistem hutan tropis karena keberadaannya bisa menentukan adanya keharmonisan pada sistem perakaran tanaman termasuk kemampuan pertumbuhan pohon di hutan, resistensi terhadap hama dan penyakit, serta toleransi terhadap cekaman lingkungan. Selain itu, fungi endofit juga harus ditangani dengan serius terkait kemampuan produksi metabolit sekundernya yang dimungkinkan suatu saat nanti dapat bermanfaat bagi dunia kesehatan. (Faizal A, et all, 2018)

Kapang adalah kelompok mikroorganisme yang tergolong dalam fungi. Fungi merupakan suatu organisme heterotrof, yang memerlukan senyawa organik untuk

mempertahankan pertumbuhannya. Kapang adalah suatu organisme eukariotik yang mempunyai dinding sel yang kaku dan tidak mempunyai klorofil. Tubuh atau *talus* suatu kapang pada dasarnya terdiri dari dua bagian, yaitu miselium dan spora. Miselium merupakan kumpulan beberapa filamen yang dinamakan hifa. Setiap hifa lebarnya 5 sampai 10 μm . Spora merupakan sel resisten dalam keadaan istirahat atau dorman. Fungi dapat lebih bertahan dalam keadaan alam sekitar yang tidak menguntungkan dibandingkan dengan mikroorganisme lainnya. Kapang merupakan mikroorganisme aerobik sejati, yaitu membutuhkan oksigen untuk pertumbuhannya. Kapang dapat tumbuh pada kisaran pH 3,0 – 8,5, dan memiliki pH optimum antara 5,0 – 7,0. Kebanyakan kapang bersifat mesofil, yaitu tumbuh baik pada suhu kamar. Suhu optimum pertumbuhan kapang adalah sekitar 22 – 30 °C, tetapi beberapa dapat tumbuh pada suhu 30 – 37 °C atau lebih tinggi. Beberapa kapang dapat tumbuh pada suhu 0°C dan juga pada suhu antara -5 sampai -10 °C (Pelczar JM, Chan ECS, 1986 dan Liesbetini H, 1990).

Aquilaria malaccensis Lamk. adalah salah satu dari sekian banyak tumbuhan penghasil Gaharu. Gaharu (sering disebut sebagai *aloewood*, *eaglewood*, *agarwood*) terkenal dengan aromanya yang khas (*aromatic resin*) sehingga banyak dimanfaatkan untuk membuat parfum, pengharum ruangan, hio, obat, dan sebagainya. Sebagai obat yang salah satunya sebagai antimikroba, gaharu di Timur Tengah, Tibet dan Asia Timur konon sudah dikenal sejak abad VIII. Penggunaan gaharu baik sebagai obat atau parfum sampai saat ini masih berlangsung. Gubal gaharu merupakan metabolit sekunder yang terbentuk sebagai respon pertahanan tanaman terhadap gangguan fisik atau infeksi mikroorganisme. Substansi yang terkandung dalam gubal gaharu ini termasuk dalam golongan seskuiterpen yang memiliki struktur kimia yang sangat spesifik sehingga hingga saat ini belum dapat dibuat sintetis. Gaharu diperoleh dari pohon-pohon yang terinfeksi mikroba endofit yang tumbuh di daerah tropik. Pohon

penghasil gaharu memiliki marga *Aquilaria*, *Gyrinops* dan *Gonystilus* yang termasuk dalam keluarga *Thymelaeaceae*. Dari sekian banyak pohon penghasil gaharu jenis yang menghasilkan gaharu dengan kualitas tinggi adalah *Aquilaria malaccensis* Lamk.

Aquilaria malaccensis Lamk. Merupakan salah satu dari suku *Thymelaeaceae*, Tinggi pohon jenis ini dapat mencapai 15 – 18 meter dengan diameter batang mencapai 50 cm. Tumbuh pada permukaan tanah yang tinggi. Permukaan batangnya licin, berwarna keputihan, kadang-kadang beralur, kayunya yang tidak berdamar berwarna putih dan ringan serta terasa lembut, sedangkan yang berdamar bersifat keras, gelap, dan berat. Bentuk daunnya lonjong agak memanjang, dengan ukuran panjang 6 – 8 cm, lebar 3 – 4 cm, bagian ujung daunnya meruncing. Daun yang kering biasanya berwarna abu-abu kehijauan, tepi daun agak bergelombang, melengkung, dan kedua permukaannya licin serta mengkilap. Tulang daun sekunder 12 – 16 pasang. Bunga terdapat pada ujung ranting, ketiak daun, atau kadang-kadang di bawah ketiak daun. Bunga berbentuk lancip, panjangnya sampai 5 mm, berwarna hijau kekuningan atau putih, dan berbau harum. Buahnya berbentuk bulat telur atau lonjong, panjangnya sampai 4 cm, lebar 2,5 cm. Bentuk biji bulat telur, tutupnya rapat oleh rambut yang berwarna merah (Susilo KA, 2003).

Kandungan kimia yang terdapat di dalam tanaman *Aquilaria malaccensis* Lamk. adalah termasuk golongan seskuiterpen yaitu, agarospirol, jinkohol, jinkohol II, α -agarofuran, 10-*epi*-gamma-eudesmol, jinkoh-eremol, okso-agarospirol, dan kusunol, dengan khasiat sebagai antiasmatik, antimikroba, afrodisiaka, sakit kuning, penenang, analgetik, reumatik, kanker, diare, ginjal, tumor paru-paru, tumor usus, daun serta buah gaharu diyakini masyarakat sebagai obat malaria (Heyne K).

Isolasi dilakukan untuk mendapatkan isolat mikroba endofit dan selanjutnya dilakukan teknik penapisan yang merupakan langkah sistematis untuk mengetahui potensi dan pemanfaatannya, baik mencakup cara

kultivasi maupun proses fermentasinya. Teknik penapisan ini merupakan prosedur yang amat selektif yang digunakan untuk mendeteksi dan mengisolasi jenis mikroba tertentu yang diinginkan dari populasi mikroba di alam yang amat banyak (Wahyudi P, 1998).

Pembiakan isolat mikroba endofit membutuhkan waktu lama, kurang lebih antara 5 - 7 hari inkubasi pada suhu kamar (27 - 29 °C). Waktu inkubasi yang cukup lama ini disebabkan karena kebanyakan mikroba endofit merupakan mikroba yang lambat tumbuh. Namun pertumbuhan mikroba endofit yang cukup lama ini masih lebih cepat dibandingkan dengan mikroba endofit di daerah beriklim subtropis dan dingin, yang membutuhkan waktu pertumbuhan antara 1 - 3 minggu (Bacon KW, 1998).

Waktu dan suhu inkubasi yang optimal akan menghasilkan produk metabolit bioaktif yang maksimal. Senyawa metabolit bioaktif yang dihasilkan oleh isolat pada fermentasi dipanen pada suhu rendah agar tidak terjadi kerusakan pada senyawa bioaktifnya (Tomita F, 1985).

METODE PENELITIAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari cabang ke-4 ranting ke-2 tanaman *Aquilaria malaccensis* Lamk. pada ketinggian \pm 10 meter dari permukaan tanah, yang diambil dari Kebun Raya Bogor pada pukul 10.00 WIB dalam keadaan hujan intensitas sedang.

Alat yang digunakan antara lain *Laminar Air Flow*, timbangan analitik, autoklaf, inkubator, oven, tabung reaksi, rak tabung, lemari pendingin, cawan petri, Erlenmeyer, lampu spiritus, beaker glass, corong glass, mikropipet, sengkeli, dan pinset.

Isolasi kapang endofit dengan memotong ranting muda yang diambil dari cabang tanaman *Aquilaria malaccensis* Lamk. dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Masing-masing ranting dipotong menjadi potongan-potongan kecil berukuran \pm 1 cm, selanjutnya disterilisasi bertingkat dengan mencelupkannya ke dalam etanol 75% selama 1 menit, kemudian dicelupkan

pada larutan sodium hipoklorit 5,3% selama 5 menit, dan terakhir dibilas dengan etanol 75% selama 0,5 menit. Potongan ranting yang sudah disterilisasi, diletakkan di atas tissue steril dan dibiarkan kering di udara terbuka dalam LAF. Setelah kering, potongan ranting steril tersebut diletakkan di atas gelas obyektif steril dan dibelah dengan menggunakan *hand cutter* steril menjadi dua bagian yang sama. Masing-masing bagian selanjutnya diletakkan di atas media CMM dengan penambahan kloramfenikol 50 mg/L, dengan posisi permukaan belahan menempel pada medium agar. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar (25 - 30 °C) selama 7 hari. Kapang endofit yang akan tumbuh pada media CMM kemudian dipindahkan ke media PDA untuk peremajaannya (Wahyudi P, 1998).

Pengamatan morfologi isolat murni kapang endofit secara makroskopik dilakukan berdasarkan kriteria warna permukaan koloni, warna sebalik koloni, bentuk koloni, warna sebalik koloni, tepi koloni dan ukuran diameter koloni.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengambilan sampel tanaman dilakukan pada minggu kedua bulan februari di Kebun Raya Bogor dan pada saat musim hujan. Bagian tanaman yang diambil sebagai sampel adalah bagian ranting kedua dari cabang keempat tanaman *Aquilaria malaccensis* Lamk., yang sehat dalam arti tidak terluka dan terinfeksi jenis mikroba patogen, dan serangga.

Prosedur sterilisasi permukaan dalam hal ini perendaman dalam etanol dan NaOCl, memang lazim digunakan dalam isolasi mikroba endofit dan sudah cukup baik untuk menghambat pertumbuhan mikroba permukaan batang. Etanol berlaku sebagai surfaktan dan NaOCl adalah bahan untuk sterilisasi sebenarnya. Kombinasi etanol - NaOCl sudah terbukti efektif mematikan spora ber dinding tebal yang umumnya dimiliki oleh jamur kontaminan. Faktor kritis yang lain dalam isolasi mikroba endofit ini adalah kesegaran bahan sampel tanaman, karena hal ini penting untuk mencegah pengeringan sampel tanaman. Sementara itu juga dibutuhkan aerasi yang cukup untuk

meminimalkan pertumbuhan jamur dan bakteri kontaminan. Sampel tanaman dianjurkan disimpan pada wadah yang berpori daripada dalam plastik yang tertutup rapat (Bills GF).

Setelah mengalami sterilisasi permukaan sampel selanjutnya diletakkan di atas media CMM yang ditambah dengan antibiotik kloramfenikol 50 mg/L. Penambahan kloramfenikol tersebut dimaksudkan untuk menekan pertumbuhan mikroba yang tidak diinginkan pada media. Isolat yang tumbuh pada media CMM dipindahkan ke media PDA untuk peremajaannya. Pertumbuhan isolat kapang endofit membutuhkan waktu yang relatif lama antara 5 – 7 hari. Masing-masing isolat kapang memiliki karakteristik morfologi yang berbeda, begitu pula dengan adanya perbedaan diameter isolat kapang yang diukur pada hari yang sama. Isolat kapang AM-EK5 memiliki diameter yang paling besar yaitu 8,9 cm, sedangkan yang paling kecil diameternya dimiliki oleh isolat kapang AM-EK3 sebesar 5,3 cm. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada bagian tanaman yang sama memiliki lebih dari satu jenis mikroba endofit yang

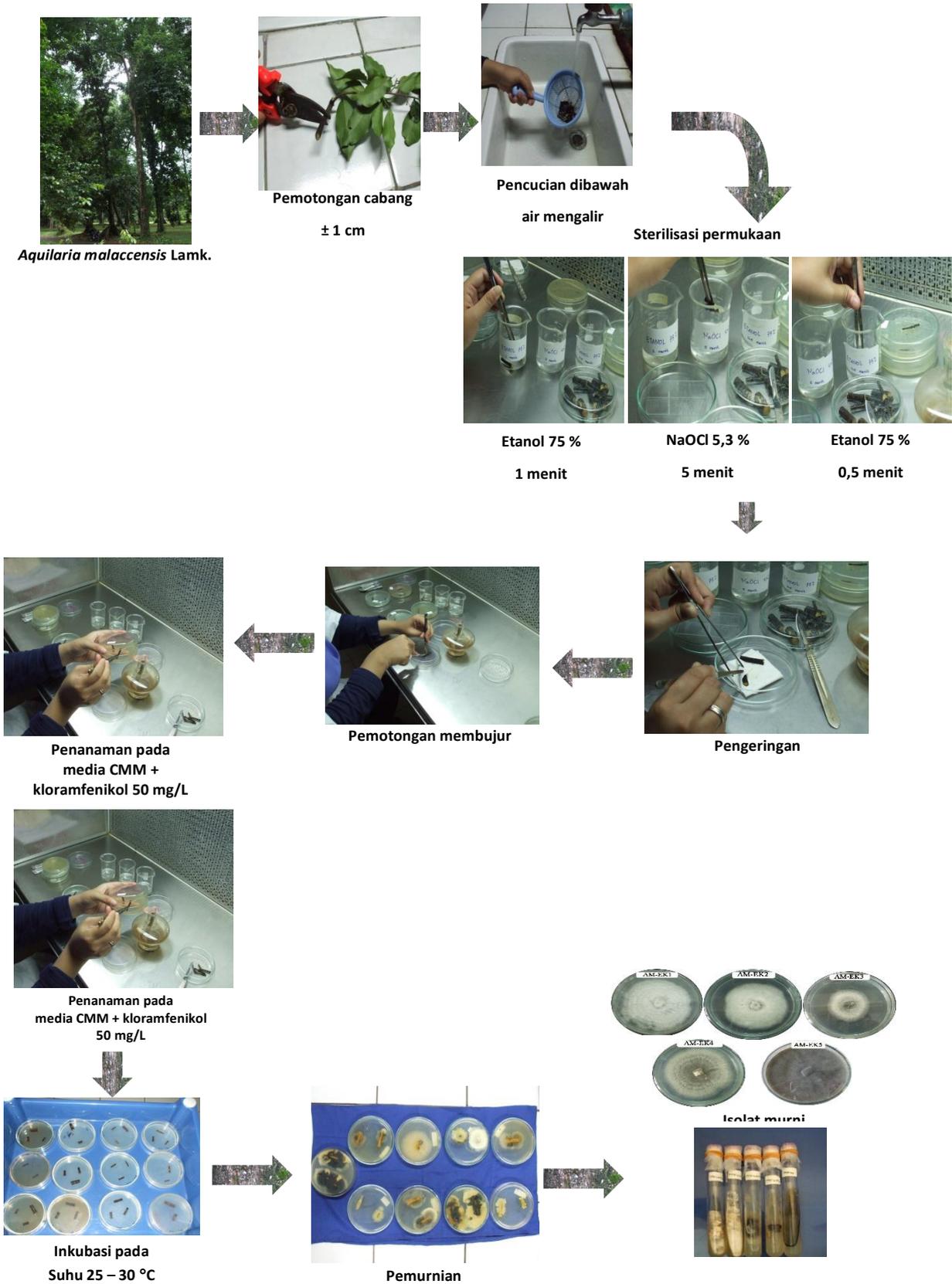
dalam hal ini adalah kapang endofit. Hal tersebut menguatkan pendapat dari Petrini *et al*, yang menyatakan bahwa dalam satu jaringan tanaman kemungkinan ditemukan beberapa jenis mikroba endofit.

Hasil isolasi diperoleh 5 isolat kapang endofit. Hasil pengamatan morfologi isolat kapang endofit dari tanaman *Aquilaria malaccensis* Lamk. dapat dilihat pada Tabel 1

Jumlah dan karakteristik isolat kapang endofit pada tanaman *Aquilaria malaccensis* Lamk. yang diambil dari cabang ke-4 ranting ke-2 mungkin akan berbeda, dengan bagian lain dari tanaman inang yang sama. Berdasarkan pernyataan Petrini *et al*. dari beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa bagian tanaman yang berbeda dari satu tanaman inang dapat memperlihatkan isolat mikroba endofit yang berbeda pula. Kelima isolat kapang endofit dengan masing-masing karakteristiknya yang diambil dari Kebun Raya Bogor pada saat musim hujan ini, kemungkinan juga akan berbeda dengan yang akan diperoleh pada lokasi tumbuh, lingkungan dan keadaan cuaca atau musim yang berbeda.



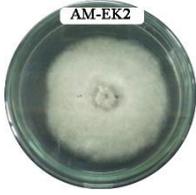
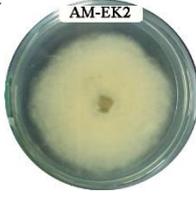
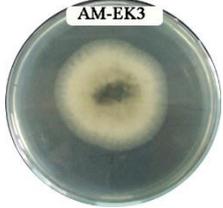
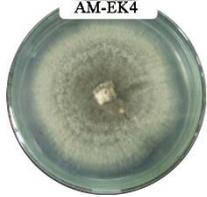
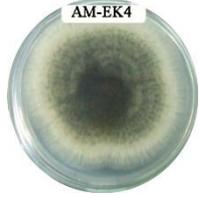
Gambar 1 *Aquilaria malaccensis* L



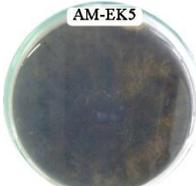
Gambar 1 Skema Isolasi Kapang Endofit dari Tanaman *Aquilaria malaccensis* Lamk.

Tabel 1.

**Hasil pengamatan morfologi isolat kapang endofit dari tanaman
Aquilaria malaccensis Lamk. pada hari ke-7**

No.	Kode Isolat	Diameter Kapang (cm)	Ciri-ciri Morfologi Secara Makroskopik	
			Warna koloni	Warna sebalik koloni
1	AM-EK1	8,8	Koloni berwarna putih, membentuk lingkaran onsentris, tepi rata 	Koloni berwarna kuning muda dengan pusat berwarna kecoklatan, membentuk lingkaran konsentris, tepi rata 
2	AM-EK2	7,5	Koloni berwarna putih halus seperti kapas, membentuk lingkaran konsentris, tepi rata 	Koloni berwarna kuning muda dengan pusat berwarna kecoklatan, membentuk lingkaran konsentris, tepi rata 
3	AM-EK3	5,3	Koloni berwarna putih, ditengah agak berwarna kelabu, membentuk lingkaran konsentris, tepi rata 	Koloni berwarna krem muda, dengan pusat berwarna kehitaman, membentuk lingkaran konsentris, tepi rata 
4	AM-EK4	8,3	Koloni berwarna putih, ditengah berwarna kelabu, membentuk lingkaran konsentris, tepi rata 	Koloni putih dengan ditengah bintik-bintik hitam, pusat berwarna hitam, membentuk lingkaran konsentris, tepi rata 

Tabel 1 lanjutan

			Koloni berwarna coklat kelabu, membentuk lingkaran konsentris, tepi rata	Koloni berwarna coklat kehitaman, membentuk lingkaran konsentris, tepi rata
5	AM-EK5	8,9		

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil isolasi kapang endofit tanaman *Aquilaria malaccensis* Lamk. dari cabang ke-4 dan ranting ke-2, menghasilkan lima isolat kapang endofit berdasarkan ciri morfologinya secara makroskopik. Diameter terbesar dimiliki oleh Isolat kapang dengan kode AM-EK5 yaitu 8,9 cm dengan koloni berwarna coklat kelabu, membentuk lingkaran konsentris, tepi rata, serta sebalik koloni berwarna coklat kehitaman, membentuk lingkaran konsentris dan tepi rata. Diameter terkecil dimiliki oleh isolat kapang AM-EK3 sebesar 5,3 cm, dengan koloni berwarna putih, ditengah agak berwarna kelabu, membentuk lingkaran konsentris, tepi rata, serta sebalik koloni berwarna krem muda, dengan pusat berwarna kehitaman, membentuk lingkaran konsentris, tepi rata. Perlu dilakukan perbandingan isolate kapang endofit dari tanaman *Aquilaria malaccensis* Lamk. pada musim kemarau ataupun dari tempat tumbuh yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

Radji M. (2005). Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit Dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol. II. No.3. 113 – 8.

Simanjuntak P, Parwati T, Prana KT. (2002). Studi Mikroba Endofit *Cinchona spp.* (4): Produksi Senyawa Kuinin oleh Khamir Endofit Dengan Berbagai Konsentrasi Maltosa. *Jurnal Biosains dan Bioteknologi Indonesia*. Vol.2. No.1. 23-6.

Wahyudi P. Mikroba Endofitik Sebagai Penghasil Materi Yang Bermanfaat. Laporan Teknis BPPT. Jakarta. 1-3.

Prasetyoputri A, Atmosukarto I. (2006). Mikroba Endofit Sumber Molekul Acuan Baru yang Berpotensi. *Majalah Populer Bioteknologi Biotrends*. Vol.1.No.2.13-5.

Faizal A, et all. (2018). Bioprospek Mikroba Hutan Tropis Indonesia. IPB Press.

Pelczar JM, Chan ECS. (1986). Dasar-dasar Mikrobiologi. Diterjemahkan oleh Ratna *et al.* UI-Press. 48, 189-91.

Liesbetini H. (1990). Teknologi Fermentasi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. 2-4, 184-226.

Susilo KA. (2003). Sudah Gaharu Super Pula. Pustaka Sinar Harapan. 1 – 16.

Heyne K. Thymelaeaceae, Tumbuhan Berguna Indonesia. Jilid III. 1467 – 9.

Wahyudi P. (1998). Teknik Skiring Terhadap Mikroba Endofitik Penghasil Antibiotik Baru. Dalam: Prosiding Temu Ilmiah Jaringan Kerjasama Kimia Indonesia. Seminar Nasional II Kimia Dalam Pembangunan. Jaringan Kimia Indonesia. 5 – 6 Mei. Yogyakarta. 316-25.

Bacon KW. (1998). Procedure For Isolating The Endophytic From Tall Fescue and Screening Isolates For Ergot Alkaloid. *Appl.Env.Microbial*.54, 126, 265.

Tomita F. (1985). Screening of Useful Strains in International. Post Graduate University Courses in Microbiology Japanese National Commission for UNESCO. 221 – 32.

Bills GF. Isolation and Analysis Of Endophytic Fungal Communities From

Woody Plants. APS Press. St Paul MN.31
– 65.