



PENENTUAN MEDIA PRODUKSI SENYAWA ANTIMIKROBIAL ENDOFIT DARI *Fusarium oxysporum* LBKURCC41 UMBI TANAMAN DAHLIA (*Dahlia variabilis*)

Nofianti, Saryono, Christine Jose, Amilia Linggawati

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau
Jln. Raya Bangkinang KM 12,5 Pekanbaru 28193
Nofianti@grad.unri.ac.id

Abstrak

Fusarium oxysporum LBKURCC41 termasuk dalam kelas Ascomycetes dan merupakan suatu genus tropis yang umum dari jamur endofit. Jamur ini dapat dimanfaatkan sebagai kultur untuk mendapatkan metabolit sekunder. Salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan *F. oxysporum* LBKURCC41 dalam menghasilkan senyawa antimikrobal adalah komposisi media. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan media terbaik (Malt Extract Broth /MEB dan media Huang) dalam menghasilkan senyawa antimikrobal *F. oxysporum* LBKURCC41 endofit tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*). Kemampuan *F. oxysporum* LBKURCC41 dalam menghasilkan senyawa antimikrobal dapat diukur dengan metode difusi agar Kirby-Bauer Test. Hasil penelitian menunjukkan media terbaik dalam menghasilkan senyawa antimikrobal oleh jamur *F. oxysporum* LBKURCC41 dengan $\alpha = 0,05$ pada patogen uji *E.coli* dan *S.aureus* adalah media MEB dengan nilai Sig. (2-tailed) $< \alpha$.

Kata kunci: Antimikrobal, *Fusarium oxysporum*, Media

PENDAHULUAN

Tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*) merupakan tumbuhan *Compositae/Asteraceae* yang ditemukan di daerah dataran tinggi. Dahlia merupakan tanaman perdu berumbi yang sifatnya tahunan (*perennial*) dan berbunga pada musim panas sampai musim gugur. Dahlia adalah bunga nasional negara Meksiko (Encyclopedia of Plants, 2010).

Produksi senyawa antimikrobal dalam jumlah besar membutuhkan tanaman dahlia dalam jumlah banyak sehingga diperlukan lahan yang luas dan waktu tunggu pertumbuhan tanaman yang relatif lama. Kendala tersebut dapat diatasi dengan mengisolasi senyawa antimikrobal dari mikroorganisme endofit yang hidup dalam jaringan tanaman dahlia.

Produksi senyawa antimikrobal dari mikroorganisme endofit dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah komposisi media. Perbedaan nutrisi pada media yang digunakan dalam fermentasi akan menghasilkan produk antimikrobal yang berbeda (Razak *et al.*, 2011). Untuk mengetahui pengaruh komposisi media

terhadap produksi senyawa antimikrobal, maka akan dilakukan variasi media fermentasi.

Berbagai media fermentasi telah dikembangkan untuk menghasilkan formulasi media fermentasi yang tepat untuk suatu proses fermentasi dengan mikroorganisme tertentu. Formulasi media fermentasi skala kecil relatif lebih mudah dilakukan dengan penggunaan senyawa-senyawa murni. Namun hal tersebut tidak cocok untuk media fermentasi skala besar (media produksi).

Media fermentasi harus mengandung komponen-komponen yang diperlukan untuk pertumbuhan sel, pembentukan metabolit dan menyediakan energi yang cukup untuk biosintesis dan pemeliharaan sel. Adapun beberapa media fermentasi yang digunakan yaitu *Malt Extract Broth* (MEB), dan media Huang.

BAHAN DAN METODA

Bahan-bahan yang digunakan adalah Media *Potato Dextrose Agar* (PDA) No. Cat. 1.10130.0500, *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) No.Cat. 1.08339.0500, *Sabouraud*

Dextrose Agar (SDA), Media *Malt Extract Broth* (MEB) No.Cat.1.05397.0500, media *Nutrient Agar* (NA) No.Cat. 1.05450.0500, media *Nutrient Broth* (NB) No.Cat. 1.05443.0500. (Semua media diproduksi oleh Merck KGaA Germany), Natrium klorida (NaCl), sukrosa, natrium nitrat (NaNO₃), kalium klorida (KCl), *Yeast Extract*, Kalium dihidrogen fosfat (KH₂PO₄), Magnesium sulfat hepta hidrat (MgSO₄.7H₂O), dan Besi sulfat hepta hidrat (FeSO₄.7H₂O), *millipore syringe filter* 0,2 µm (Puradisc™ 13mm No.Cat. 6786-1302), kertas cakram 6 mm (Macherey–Nagel MN827ATD), dan bahan kimia lain sesuai dengan prosedur kerja.

a. Pembuatan media Huang (Huang et al., 2007)

Media ini digunakan sebagai media fermentasi produksi senyawa antimikrobal. Komposisi pembuatan media ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi media fermentasi Huang.

Komposisi	Berat atau Volume
Sukrosa	72 g
NaNO ₃	7,2 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g
Ekstrak ragi	2,4 g
KCl	1,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,2 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,024 g
Akuades	2,4 L

Sumber: Huang et al., 2007

b. Pembuatan media MEB (Malt Extract Broth)

Media ini digunakan sebagai variasi media fermentasi produksi antimikrobal. Komposisi media ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi media fermentasi MEB (g/L)

Komposisi	Berat
Ekstrak gandum	6 g
Ekstrak ragi	1,2 g
Maltosa	6 g
<i>Dextrose</i>	6 g

c. Fermentasi Jamur Endofit

Sebanyak 1mL inokulum jamur endofit (5%) diinokulasikan ke dalam 200 mL media produksi (media MEB dan media Huang et al., 2007), kemudian diinkubasi selama 20 hari pada suhu ruang dengan kecepatan agitasi 75,100, 125, 150, dan 175 rpm. Kultur jamur hasil fermentasi diambil dan disentrifus

dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Untuk memisahkan supernatan dan massa selnya, kultur hasil fermentasi ini disaring dengan menggunakan *millipore syringe filter* 0,2 µm sehingga didapatkan ekstrak kasar jamur endofit tanaman dahlia. Ekstrak kasar jamur endofit inilah yang akan digunakan untuk uji antimikrobal.

d. Peremajaan bakteri Patogen

Bakteri uji (*E. coli* dan *S. aureus*) dari agar miring dipindahkan ke media *Nutrient Agar* yang baru secara aseptik dan diinkubasi selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diinokulasikan ke media *Nutrient Broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, absorbansi bakteri diukur. Bakteri siap digunakan untuk uji antibakteri apabila OD telah mencapai 0,08–0,1 (setara 10⁷ CFU/mL). Jika OD lebih besar dari 0,1 maka dilakukan pengenceran dengan menggunakan larutan NaCl 0,85%.

e. Peremajaan khamir patogen

Isolat *Candida albicans* dari agar miring dipindahkan ke media PDA yang baru secara aseptik dan diinkubasi selama 4 x 24 jam. Selanjutnya diinokulasikan kembali ke media *Sabouroud Dextrose Broth* (SDB) dan diinkubasi selama 48 jam. Khamir siap digunakan untuk uji antikhamir apabila OD telah mencapai 0,08–0,1 (setara dengan 10⁷ CFU/mL). Jika OD lebih besar dari 0,1 maka dilakukan pengenceran dengan menggunakan larutan NaCl 0,85%.

f. Uji antibakteri

Inokulum patogen *E. coli*, dan *S. aureus* (OD_{600nm}~0,1) setara 10⁷ CFU/mL (Martins et al., 2011) diinokulasikan sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang mengandung media NA cair sebanyak 15 mL (suhu 50°C) dan divortex, kemudian agar cair ini dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat.

Masing-masing ekstrak kasar steril jamur endofit sebanyak 50 µL ditetaskan pada kertas cakram steril (diameter 6 mm) dan dibiarkan mengering. Kontrol positif yang digunakan adalah Amoxsan® 30 µg dan kontrol negatif yang digunakan adalah media fermentasi steril. Kemudian kertas cakram diletakkan di atas media NA yang mengandung bakteri uji (*E. coli* atau *S. aureus*). Selanjutnya cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C dengan kondisi cawan petri dibalikkan. Diameter zona bening di sekitar kertas cakram diukur setelah inkubasi selama 24 jam.

g. Uji antikhmir

Inokulum khamir patogen *Candida albicans*, ($OD_{600nm} \sim 0,1$) setara 10^7 CFU/mL (Martins *et al.*, 2011) diinokulasikan sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang mengandung media PDA cair sebanyak 15 mL (suhu 50°C) dan divortex, kemudian dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat.

Masing-masing ekstrak kasar steril isolat endofit sebanyak 50 µL diteteskan pada kertas cakram steril (diameter 6 mm) dan dibiarkan mengering. Kontrol positif yang digunakan adalah *Ketoconazole*[®] konsentrasi 30µg dan kontrol negatif yang digunakan adalah media fermentasi steril. Kemudian kertas cakram diletakkan di atas media PDA yang mengandung *Candida albicans*. Selanjutnya cawan petri diinkubasi pada suhu ruang dengan membalikkan cawan petri. Diameter zona bening disekitar kertas cakram diukur setelah inkubasi selama 2 x 24 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Media yang digunakan dalam menghasilkan senyawa antimikrobal pada jamur endofit *F.oxysporum* LBKURCC41 yaitu media MEB dan media Huang. Pada media MEB senyawa antimikrobal dari jamur endofit *F.oxysporum* dalam menghambat bakteri *E.coli* memiliki diameter hambat optimum sebesar 5,48 mm (Tabel 3). Adapun sig. (*2-tailed*) yang diperoleh dari uji-t dengan $\alpha = 0,05$ yaitu 0,012 sehingga dapat dilihat bahwa Sig. (*2-tailed*) < α . Hal ini dapat diartikan bahwa Ha diterima atau terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua media.

Pada bakteri *S. aureus* rata-rata diameter hambat optimum pada media MEB sebesar 10,90 mm (Tabel 4). Adapun sig. (*2-tailed*) yang diperoleh dari uji-t dengan $\alpha = 0,05$ yaitu 0,014 sehingga dapat dilihat bahwa Sig. (*2-tailed*) < α . Hal ini dapat diartikan bahwa Ha diterima atau terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua media.

Senyawa antimikrobal dari jamur endofit *F. oxysporum* mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* terhadap kedua media yaitu MEB dan Huang. Kemampuan optimum dari senyawa antimikrobal *F. oxysporum* dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* terjadi pada kecepatan agitasi 150 pada media MEB yaitu sebesar 9,44 mm. Nilai diameter hambat pada kondisi ini memiliki

perbedaan yang sangat signifikan terhadap nilai diameter hambat lainnya.

Tabel 3. ANOVA aktivitas optimum senyawa antimikrobal jamur endofit *F.oxysporum* LBKURCC41 terhadap media fermentasi pada *E.coli*

Media	Rata-rata	Standar Deviasi
MEB	5.4844	2.56084
HUANG	3.2889	1.84678

Tabel 4. ANOVA aktivitas optimum senyawa antimikrobal jamur endofit *F.oxysporum* LBKURCC41 terhadap media fermentasi pada *S.aureus*

Media	Rata-rata	Standar Deviasi
MEB	10,90	4,61
HUANG	7,16	3,06

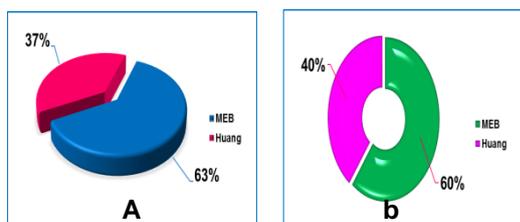
Kemampuan optimum dari senyawa antimikrobal *F. oxysporum* dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* terjadi pada agitasi 150 rpm pada media MEB. Nilai diameter hambat pada kondisi ini tidak berbeda secara signifikan pada kecepatan agitasi 175 pada media MEB, tetapi memiliki perbedaan yang sangat signifikan dengan nilai hambat yang lainnya dari kedua media. Senyawa antimikrobal merupakan salah satu produk metabolit sekunder. Pembentukan senyawa metabolit sekunder dikode oleh sejumlah gen yang terdapat pada DNA. Ada beberapa kondisi yang mempengaruhi terbentuknya metabolit sekunder yaitu keterbatasan nutrisi yang tersedia pada media, penambahan senyawa penginduksi, dan penurunan kecepatan pertumbuhan (Nofiani *et al.*, 2009).

Penentuan media terbaik dalam menghasilkan senyawa antimikrobal dari *F. oxysporum* LBKURCC41 menggunakan 2 macam media. Kedua variasi media yang digunakan dalam penelitian ini memiliki sumber karbon yang berbeda. Media MEB memiliki sumber karbon lebih dari satu yaitu maltosa, *dextrose*, dan ekstrak gandum (Suciati, 2010). Sedangkan media Huang (Huang *et al.*, 2007) terdiri dari sukrosa sebagai sumber karbon. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jamur endofit *F. oxysporum* pada media *Malt Extract Broth* (MEB) dan media Huang (Huang *et al.*,

2007) menghasilkan aktivitas senyawa anti-mikrobal yang berbeda jumlahnya.

Senyawa antimikrobal dari jamur endofit *F. oxysporum* diproduksi pada saat endofit mulai memasuki fase stasioner. Pada fase stasioner, nutrisi yang terdapat dalam media sudah mulai berkurang dan adanya akumulasi hasil akhir yang berupa asam atau basa beracun yang terdapat di dalam media menyebabkan mikroorganisme endofit berada dalam keadaan kritis. Untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya maka mikroorganisme akan mengeluarkan senyawa-senyawa metabolit sekunder. Metabolit sekunder inilah yang dapat berfungsi sebagai nutrisi darurat untuk bertahan hidup oleh mikroorganisme (Pratiwi, 2008).

Pada media MEB dan Huang, Jamur endofit *F. oxysporum* LBKURCC41 dari tanaman dahlia memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus*, hal ini dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2. Isolat *F. oxysporum* memiliki aktivitas antimikrobal terhadap bakteri Gram negatif (*E. coli*) pada media MEB dan Huang (Huang *et al.*, 2007) dengan perbandingan nilai rata-rata terbesar terdapat pada media MEB yaitu sebesar 63 % sedangkan media Huang hanya 37%. (Gambar 1.a). Pada *S. aureus* perbandingan nilai rata-rata terbesar juga terdapat pada media MEB yaitu sebesar 60% sedangkan media Huang 40% (Gambar 1.b).



Gambar 1. Persentase aktivitas antimikroba metabolit sekunder dari *F. oxysporum* terhadap *E. coli* (a) dan *S. Aureus* (b)

Terdapat perbedaan diameter hambat pada setiap media (MEB dan Huang). Hal ini disebabkan oleh perbedaan kandungan unsur karbon dari kedua media. Pada media MEB sumber karbon berasal dari glukosa dan maltosa. Glukosa/dextrose merupakan kelompok karbohidrat monosakarida yang terdiri dari enam atom C yang disebut heksosa, sedangkan dan maltosa merupakan kelompok disakarida yang tersusun dari 2 molekul glukosa. Media Huang (Huang *et al.*, 2007) mengandung sukrosa sebagai sumber karbon. Sukrosa

merupakan karbohidrat kelompok oligosakarida yang terdiri dari dua molekul yang disebut disakarida. Molekul penyusun sukrosa adalah molekul glukosa dan fruktosa. Jadi dilihat dari kandungan unsur karbonnya, media MEB memiliki unsur karbon lebih banyak dari media Huang.

Unsur karbon bagi jamur adalah hal yang paling penting karena jamur lebih membutuhkan sumber karbon dalam jumlah yang besar dari pada unsur-unsur esensial yang lain serta karbon merupakan nutrisi pokok dan terpenting pada jamur. Sumber karbon sebagai senyawa organik digunakan sebagai struktur utama dalam penyediaan energi untuk sel pada proses oksidasi. Beberapa senyawa organik yang digunakan oleh jamur sebagai sumber karbon adalah karbohidrat (monosakarida, gula alkohol, polisakarida dan oligosakarida), asam organik, dan karbondioksida (Moore, 1972).

Perbedaan aktivitas antimikrobal dari kedua media juga disebabkan oleh enzim maltase dan sukrase yang memiliki sifat transglukosilasi, yaitu enzim yang memiliki dua fungsi. Maltase dan sukrase berfungsi menghidrolisis maltosa dan sukrosa menjadi gula yang lebih sederhana, namun juga berfungsi sebagai inducer untuk produksi senyawa antimikrobal. Reaksi transglukosilasi merupakan reaksi pemindahan unit gula ke akseptor yang memiliki gugus -OH dan biasanya melibatkan enzim sebagai transferator. Menurut Soeka *et al.*, 2007 pada reaksi transglukosilasi enzim akan menghidrolisis donor glikosil menjadi gula yang lebih sederhana secara intramolekuler dan mentransfer gugus gula ke akseptor yang mengandung gugus -OH secara intermolekuler.

Penelitian yang dilakukan oleh Widiyasih (2002) menunjukkan bahwa enzim CGTase memiliki sifat transglukosilasi, selain menghidrolisis pati, enzim ini juga dapat memicu produksi senyawa antimikrobal yang memiliki aktivitas terhadap patogen *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, dan *Escherichia coli*. Donor yang digunakan dalam reaksi transglukosilasi adalah substrat yang mengandung gugus glukosil seperti oligosakarida atau polisakarida. Akseptor dari gugus glukosil adalah piranosa yang merupakan monosakarida yang memiliki cincin 6 atom karbon mempunyai konfigurasi yang sama dengan glukopiranosa yaitu mempunyai gugus hidroksil bebas pada posisi C2, C3, dan C4. Akseptor ini bersifat spesifik untuk masing-masing mikroorganisme yang menghasilkan enzim

CGTase. Salah satu enzim yang memiliki aktivitas transglukosilasi adalah siklodekstrin glukano transferase (CGTase) dengan nama sistematika [1,4- α -D-glukan-4- α -D-(1,4-gluka-no)-transferase.

KESIMPULAN

Media terbaik dalam memproduksi aktivitas antimikrobal dari jamur *F. oxysporum* LBKURCC41 dari tanaman dahlia (*Dahlia variabilis*) pada *E.coli* dan *S.aureous* adalah media MEB.

DAFTAR PUSTAKA

- Encyclopedia of plants , 2010. *Dahlia*. [http:// botanical. com / botanical / mgmh / d / dahlia02. html](http://botanical.com/botanical/mgmh/d/dahlia02.html). Tanggal akses 8 November 2014.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Hyde, K.D., Corke, H., and Sun, M., 2007. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae) main constituents and antioxidant activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **23(9)**:1253-1263
- Moore E, Landecker., 1972. The Fungi. Toronto: Prentice-Hall of Canada, Ltd.
- Nofiani, R., Nurbetty, S., & Sapar, A. 2009. Aktivitas Antimikrobal Ekstrak Methanol Bakteri Berasosiasi Spons dari Pulau Lemukutan, Kalimantan Barat. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis* **1(2)**:33-41
- Pratiwi, S. T., 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga, Jakarta
- Razak, R. A., Patong, A. R., Harlim, T., Djide, M. N., Haslia and Mahdalia., 2011. Produksi Senyawa Bakteriosin Secara Fermentasi Menggunakan Isolat BAL Enterococcus faecium DU55 dari dangke. FMIPA Kimia. Universitas Tadulako, Makasar
- Soeka, Y.S., Naiola, E., and Sulisty, J., 2007. Aktivitas antimikroba flavonoid glikosida hasil sintesis secara transglukosilasi enzimatik. *Berita Biologi*. **8(6)**: 455-464
- Suciatmih. 2010. Pengaruh Konsentrasi Antimikroorganisme, Media Fermentasi, dan Waktu Inkubasi Terhadap Pertumbuhan *Absidia corymbifera* (Cohn) Sacc. & Trotter dari jamur Endofit *Fusarium nivale* (Fr.) Ces. *Media Litbang Kesehatan Volume XX:1*
- Widiasih, LE., 2002. *Transglukosilasi Enzimatik dan Uji Aktivitas Polifenol α -glukosida sebagai senyawa antibakteri*. Jurusan Kimia. IPB-Bogor