

Produksi metabolit sekunder (antibiotik) oleh isolat jamur endofit Indonesia

Secondary metabolite (antibiotic) production by Indonesian endophytic fungi

Sebastian Margino

Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Abstrak

Mikrobia endofit merupakan "lahan baru" potensial penghasil metabolit sekunder yang menjajikan dan "belum banyak digarap". Penelitian ini berhasil mengisolasi sebanyak 86 fungi endofit dari beberapa jaringan tanaman yang tumbuh di sekitar Yogyakarta. Seleksi dilakukan atas dasar kemampuan tumbuh dalam media (PDB, Antibiotik-3 dan GY) dan menghambat mikroba indikator, *Fusarium oxysporum f.sp. licopersicae*, *Bacillus subtilis* dan *Candida albicans*, dan hasil seleksi memperoleh 9 isolat yang memiliki daya hambat lebih dari 4 (*nisbah diameter zone penghambatan dengan diameter koloni*). Empat isolat JA-2, MB-1 dan KMD-7 memiliki daya hambat tertinggi, yakni berturut-turut 5,5 terhadap *B. subtilis*, 5,6 terhadap *F. oxysporum* dan 3,5 terhadap *C. Albicans*, isolat NGK-1 memiliki daya hambat terhadap *B. subtilis* (5,2) dan *F. oxysporum* (2,3). Kemampuan menghasilkan antibiotik sangat dipengaruhi oleh kandungan substrat pada media pertumbuhan, misalnya JA-2 memberikan penghambatan tinggi terhadap *B. subtilis* bila ditumbuhkan pada medium PDB, sedangkan MB-1 menghambat *B. subtilis* dan KMD-7 menghambat *B. subtilis* dan *C. albicans* bila ditumbuhkan pada medium Antibiotik-3, sedangkan isolat NGK-1 mampu menghambat *B. subtilis* dan *F. oxysporum* oleh karena itu, luaran penelitian ini dapat diaplikasikan pada bidang pertanian (isolat MB-1, NGK-1 dan JA-2) dan kesehatan manusia (isolat KMD-7 dan JA-2).

Kata kunci: Metabolit sekunder, jamur endofit, Indonesia

Abstract

Endophytic microbes is a potentially new field for producing the promising secondary metabolite and a few people utilizing them. The purpose of this research is to find out the fungi which have an ability to produce new pathogenic eukaryote inhibiting antibiotic. The research steps were isolation, selection based on the ability of isolates to utilize carbon sources and their inhibitory effect by bioassay test with indicator microbes such as *Fusarium oxysporum f.sp. licopersicae*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. Selected isolates was determined by their inhibitory effect value was more than 4.0. Paper chromatography technique was applied to analysis the character of antibiotic using many kinds of eluents. Optimization was done to increase the production and inhibitory effect of produced antibiotic. Isolation research step found 86 endophytic fungi isolates from many kinds of plants tissue from Yogyakarta. Selection results showed that 9 isolates had inhibitory effect value more than 4.0 and four isolates that were JA-2, MB-1, NGK-1 and KMD-7 higher than 5.0. Antibiotic production was influenced by carbon sources or kinds of substrates, for examples JA-2 isolate grown at PDB medium produced higher inhibitory effect to *B. subtilis* than Antibiotic-3 and GY; NGK-1 grown at Antibiotic-3 medium produced higher inhibitory effect to *B. subtilis* and *C. albicans* than others; MB-1 grown at Antibiotic -3

medium produced higher inhibitory effect to *F. oxysporum* than others. Finally isolates JA-2 and NGK-1 was chosen as selected isolates for development of new antibiotic.

Key words : Secondary metabolite, endophytic fungi, Indonesia

Pendahuluan

Seleksi dan produksi senyawa antibiotik baru penghambat/pembunuh mikroba eukariot patogen. Selain sulitnya menemukan antibiotik baru juga sulit memproduksinya (Kauffman dan Carver, 1997; Kurtz, 1997). Beberapa medium dan kondisi optimal yang cocok perlu dicoba untuk penghasilan antibiotik. Beberapa faktor substrat (prekusor) berpengaruh terhadap mekanisme biosintesis antibiotik yang bersangkutan, misalnya sumber carbon (C), nitrogen (N) dan beberapa vitamin (Franklin & Snow, 1989; Petrini, et al., 1992; dan Cheeptham, 1999).

Penggunaan antibiotik dunia lebih dari 40.000 ton/ tahun dalam industri pangan, pakan, pertanian, kesehatan, biokimia, genetika, dan biologi molekuler serta ada kecenderungan meningkat. Ragam antibiotik cukup banyak namun sifat intrisiknya dapat menimbulkan resistensi terhadap mikroba target sehingga senyawa ini tidak lagi dapat diaplikasikan (Neu, 1992). Oleh karena itu, langkah-langkah mendapatkan jenis antibiotik baru masih sangat diperlukan baik lewat sintesis kimia, biokimia baru atau penemuan isolat mikroba baru (Tscherter and Dreyfus, 1992). Dalam dua dekade ini, jasad endofit merupakan salah satu sumber utama mikroba penghasil antibiotik baru, salah satunya adalah jenis jamur (Kauffman dan Carver, 1997; Kurtz, 1997). Brunner dan Petrini (1992) melakukan sekrining terhadap lebih dari 80 spora jamur, didapatkan bahwa 79% jamur yang mampu menghasilkan antibiotik adalah kelompok endofit. Selain itu, Tscherter dan Dreyfuss (1992) meneliti beberapa jamur endofit dan mendapatkan *Cryptosporidiosis spp.* mampu menghasilkan metabolit sekunder dengan spektrum patogenisitas lebar, dan beberapa peneliti lain memulai memanfaatkan mikroba endofit sebagai sumber antibiotik baru (Carrol 1988; Huang and Kaneko, 1996; Hostettmann and Wolfender, 1997; Hostettmann et al., 1998).

Hasil penelitian pendahuluan diperoleh isolat mikroba dari kelompok jamur, bakteri, maupun khamir. Isolasi mikroba dari beberapa

jaringan tumbuhan yang hampir punah di pulau Jawa, memperoleh 61 isolat jamur (Margino, 1998). Pada penelitian ini isolat-isolat tersebut diseleksi kemampuannya menghasilkan antibiotik (metabolit sekunder) dengan indikator mikroba *Bacillus subtilis* (prokariot), *Candida albicans* dan *Fusarium sp.* (eukariot) (Chen et al., 1995; Coleman et al., 1998). *Fusarium sp.* Jamur patogen penyerang tanaman pisang panili, tebu, jagung, sorghum dan lain-lain (Jimenez, et al., 1997); *Candida albicans* merupakan patogen pada manusia (Garcia et al., 2001 Coleman et al., 1998); dan *Bacillus subtilis* mewakili bakteri Gram positif patogen. Tujuan penelitian ini untuk memperoleh mikroba baru penghasil antibiotik mikrobisidal atau mikrobiostatik baru, sebagai agensi pengendali patogen manusia dan tanaman.

Metodologi

Isolasi mikroba endofit

Ranting tanaman dipotong sepanjang 1 cm. Untuk mensterilkan permukaan, potongan ranting direndam di dalam larutan *Byclean* atau *Chlorox* 5 % selama 5 menit, diikuti dengan perendaman dalam air steril selama 2 menit, entanol 70% selama 1 menit, dan air steril selama 2 menit. Potongan yang telah disterilkan dihilangkan eksses airnya dan selanjutnya dibelah menburuk menjadi 2 bagian. Inokulasi dilakukan dengan cara meletakkan permukaan belahan pada permukaan medium CMM (*corn meal malt extract*) agar untuk isolasi fungi atau Nutrien agar untuk isolasi bakteri. Inkubasi dilakukan selama 4-7 hari. Koloni mikroba diisolasi dengan ose, selanjutnya isolat fungi dipelihara pada medium PDA miring dan isolat bakteri dipelihara pada Nutrien agar miring sebagai kultur stok murni (Bacon, 1988; Margino, 1997).

Uji produksi

Dilakukan memakai medium Antibiotik-3 dan PGY, Nutrien, dan PD cair selama 4 -5 hari, inkubasi pada temperatur kamar, digojog 125 ketukan atau 150 rpm. Sel dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dan disimpan pada temperatur dingin, dan selanjutnya dipakai untuk pengujian antimikroba. Komposisi medium Antibiotik-3 (g/l: *Beef extract* 1,5, *yeast extract* 1,5,

peptone 5,0, NaCl 3,5, dekstrosa 1,0, dipotassium phosphate 3,65, dan monopotassium phosphate 1,32 (Formula Difco Laboratory, USA) . Sedangkan medium **GY** (g/l : gliserol 5, glukosa 3, polipepton 2, yeast extract 3, NaCl, dan CaCO₃ ditambahkan sesudah pH diatur menjadi 6,0. Nutrien (Oxoid), dan **PD** (potato dextrose), (Cheeptam, 1999; dan Margino, 1997).

Seleksi jamur endofit penghasil antimikroba (antibiotik) (Margino, 1997)

Langkah pertama seleksi dilakukan dengan teknik “paper disc diffusion technique”, yakni dengan jalan mencelupkan *paper disc* ke dalam supernatan dan hindarkan ekses air. *Paper disc* yang sudah bebas ekses air diletakan pada medium yang mengandung mikrobia indikator *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, dan *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersicae* dan diinkubasi pada suhu kamar, selama 2 hari. Terbentuknya zone jernih di sekitar *paper disc* menggambarkan adanya aktivitas penghambatan oleh senyawa antimikroba (antibiotik) terhadap mikroba indikator. Seleksi isolat dilakukan dengan mengkompilasi hasil uji ini. Isolat yang memiliki nilai rasio lebih besar 4 menjadi kandidat isolat unggul.

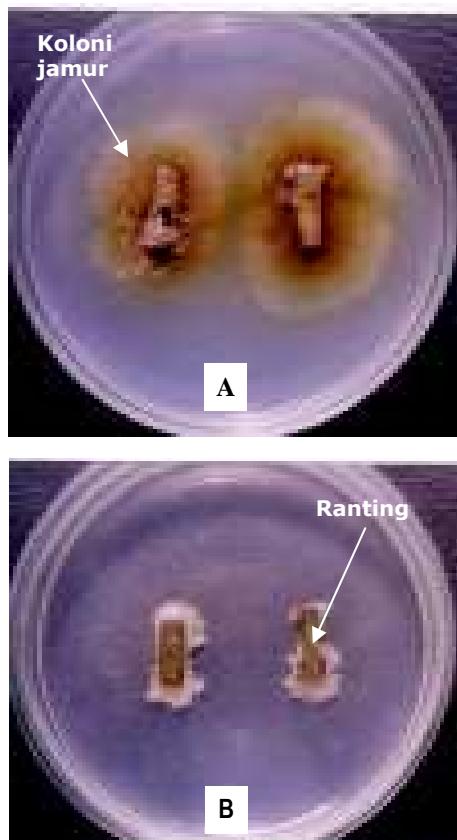
Identifikasi pendahuluan senyawa antimikroba

Penetapan senyawa antimikroba pada supernatan dilakukan teknik kromatografi kertas. *Spotting* supernatan pada kertas kromatografi (Advantec company, Jepang) sebanyak 20 µL dengan menggunakan *micro syringe*. Spot dikembangkan dengan berbagai eluen yaitu eluen A (Ammonium chloride 20 % dalam akuades), B (akuades yang dijenuhi butanol), C (butanol : asam asetat: air = 3:1:1), D (aseton : butanol : air (5 : 4 : 1) dan E (akuades yang dijenuhi asam asetat) (Margino, 1998). Bercak kromatogram yang dihasilkan selanjutnya diidentifikasi dengan teknik “bioassay” dan menggunakan mikroba indikator.

Hasil Dan Pembahasan

Isolasi jamur endofit dari beberapa spesies tanaman

Sampel tanaman diambil dari sekitar Kab. Sleman dan berbagai macam tanaman (25 spesies tanaman) yakni mahkota dewa, talok, sawobludru, pelem, kepel, kakao, jambu air, belimbing, ketepeng, preh, kenari, kayu putih, nangka, mimba, kelengkeng, kemulwo, benalu (*kemladean*), salam, melati, alpokat, suruh, kenanga, jambu kluthuk, dan sawo kecik (Tabel I).



Gambar 1. Isolasi mikroba endofit medium CMM umur 5 hari
A (jamur) dan B (bakteri)

Isolasi dilakukan menggunakan CMM (*corn meal malt medium*), yang dimodifikasi dengan penambahan pepton dan ekstrak khamir, Gambar 1. Isolat yang tumbuh di sekitar ranting diisolasi dan dikultivasi pada medium PDA, serta disimpan dalam lemari pendingin. Hasil isolasi jamur endofit (Tabel I).

Isolasi dari tanaman Kepel, Arumdalu dan Jambu Kluthuk tidak diperoleh isolat, diduga karena sampel diambil dari bagian pucuk tanam/ ranting dan populasinya sangat sedikit. Sampel dari tanaman atau organ tanaman tua misalnya Benalu, Nangka, Belimbing, Kayu putih, Srikoyo, Pelem dan Kemuning dapat diisolasi banyak isolat, sumsinya pada belahan ranting sepanjang 1 cm dipenuhi oleh populasi mikroba sedangkan organ atau tanaman muda memiliki kondisi yang sebaliknya. Delapan puluh enam (86) isolat berhasil diisolasi dan selanjutnya diuji kemampuannya memproduksi

Tabel I. Tanaman sumber dan jumlah isolat jamur endofit dari daerah Yogyakarta

No	Nama Tanaman	Nama Ilmiah/ latin	Kode Isolat	Jumlah Fungi
1.	Srikoyo/Kemulwo	<i>Annona squamosa</i>	KMW	4
2.	Mimba	<i>Azadirachta indica</i>	MB	5
3.	Kemuning	<i>Aglaia odorata</i>	KMN	8
4.	Mahkota dewa	<i>Phaleria macrocarpa</i>	MD	4
5.	Kemiri	<i>Aleurites moluccana</i>	KMR	3
6.	Sawobladru	<i>Diospiros rabola</i>	SB	5
7.	Pelem	<i>Mangifera indica</i>	PLM	3
8.	Kepel	<i>Stelechocarpus bulahol</i>	KPL	-
9.	Kakao	<i>Theobroma cacao</i>	KKO	5
10.	Jambu air	<i>Syzygium aqueum/ S. javanica</i>	JA	2
11.	Belimbing	<i>Averhoa carambola</i>	BLB	3
12.	Kelengkeng	<i>Euphoria longana</i>	KLK	3
13.	Preh/ Beringin	<i>Ficus benyamina</i>	PREH	1
14.	Kayu putih	<i>Eucalyptus alba/ smithii</i>	KYP	4
15.	Nangka	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	NGK	6
16.	Kitiran	<i>Corypha utan</i>	KTR	4
17.	Kelengkeng	<i>Caesalpinea crista</i>	KLK	3
18.	Sirih	<i>Piper betle</i>	SRH	3
19.	Alpokat	<i>Persea gratissima/ americana</i>	APK	3
20.	Salam	<i>Syzygium polyanthum</i>	SLM	3
21.	Melati	<i>Jasminum sambas</i>	MLT	4
22.	Sawo kecil	<i>Manikara kauki</i>	SK	3
23.	Kenanga	<i>Cananga odorata</i>	KNG	-
24.	Jambu kluthuk	<i>Psidium guajava</i>	JKL	-
25.	Benalu(Kemladean)	<i>Loranthus parasiticus</i>	KMD	7
Total isolat fungi				86

metabolit sekunder/antibiotik yang mampu menghambat/membunuh mikroba, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* dan *Fusarium oxysporum* f. sp. *licopersicae*. Produksi antibiotik dilakukan pada berbagai medium yang memberikan gambaran sumber karbon atau substrat spesifik sebagai pemicu/pemacu dalam metabolisme substrat menjadi agensi antibiotik, diantaranya adalah PDB (*potato dextrose broth*), Antibiotik-3 dan GY (*Glyserol and Yeast extract*).

Petrini *et al.*, (1992) melakukan skrining terhadap lebih dari 80 spora endofit dan menghasilkan 79 % spora fungi yang mampu menghasilkan antibiotik, selain itu Dreyffus (1992) dalam Petrini *et al.*, (1992) berhasil mendapatkan fungi *Cryptosporiopsis* yang mampu menghasilkan antibiotik berspektrum lebar. Huang dan Kaneko (1996) melaporkan bahwa lebih dari 400 metabolit sekunder dihasilkan oleh kelompok fungi *Pyrenomycetes* dan *Loculoascomycetes*, dimana fungi endofit merupakan anggota kelompok fungi ini yang juga mampu menghasilkan antibiotik penghambat fungi dan bakteri. Martani, *et al.*, (2002)

berhasil mengisolasi 48 isolat jamur dari 19 tanaman dan 19 isolat diantaranya mampu memproduksi antibiotik, 39,5 %. Margino, *et al.*, (2001) berhasil mengisolasi sebanyak 34 isolat penghasil antibiotik dari 44 isolat jamur endofit, 77,3 %.

Seleksi berdasarkan cara bioassay produksi metabolit sekunder

Potato Dextrose Broth (PDB) kurang dapat memicu produksi antibiotik baik yang mampu menghambat mikroba prokariot gram positif (*B. subtilis*) maupun eukariot (*C. albicans* dan *Fusarium oxyaporum* f.sp. *licopersicae*). Walaupun belum maksimal ketiga macam medium tersebut dapat dipakai untuk menjaring produksi antibiotik oleh isolat-isolat jamur endofit, dari 86 isolat khususnya medium Antibiotik-3 merupakan substrat terbaik untuk memproduksi antibiotik penghambat *B. subtilis* demikian halnya dengan daya hambat yang dihasilkan di atas rata-rata daya hambatnya bila dibandingkan dengan PDB dan GY Tabel II. Namun demikian medium GY memberikan hasil terbanyak walau bukan terbaik untuk

Tabel II. Jumlah isolat penghasil antibiotik dalam medium PDB, Antibiotik-3 dan GY dan indikator *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, dan *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersicae*

Medium	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>F. oxysporum</i>
PDB	11	1	1
Antibiotik-3	24	4	14
GY	12	16	17

Tabel III. Produksi metabolit sekunder fungi endofit pada medium cair PDB, ANTIBIOTIK-3, dan GY, dan uji bioassainya dengan mikroba indikator *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* dan *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersicae*

No	Medium	Kode Isolat	Produksi metabolit sekunder pada berbagai Medium dan daya hambatnya > 2,0		
			<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>F. oxysporum</i>
1.	PDB	JA-2	5,5	-	-
2.		APK-1	5,2	-	-
		KMD-7			3,5
3.	ANTIBIOTIK-3	MB- 1	-	-	5,6
4.		SB-3	5,2	-	-
5.		KMN-3	4,2	-	-
6.		JA-1	2,5	-	4,2
7.		NGK-1	5,2	-	2,3
8.		MLT-2	4,5	-	-
9.		KMD- 7	4,1	3,5	-
10.	GY	SB- 4	3,5	-	-
11.		KYP-2	4,1	-	-
12.		SRH-3	3,4	-	2,7
13		APK-2	-	-	2,5

Keterangan: Daya hambat : Θ Zone penghambatan/Θ paper disc

memproduksi antibiotik penghambat *C. albicans* dengan jumlah 16 isolat dan *F. oxysporum* sebanyak 17 isolat, hitungan prosentase penjaringan isolat jamur endofit menggunakan medium GY sebanyak $45/86 \times 100\% = 52,33\%$, medium Antibiotik-3 sebanyak $42/86 \times 100\% = 48,84\%$, dan medium PDB sebanyak $13/86 \times 100\% = 15,16\%$, (Tabel II).

Isolat-isolat unggul hasil seleksi atas dasar daya hambat antibiotik terhadap berbagai mikroba indikator disajikan pada Tabel III, tabel ini memberikan gambaran yang lebih mantap kaitannya rencana aplikasi produksi antibiotik di kemudian hari sesuai dengan pengembangan jenis jamur dan kualitas dan kuantitas produksi antibiotiknya. Oleh karena itu, karakterisasi atau identifikasi pendahuluan senyawa antibiotik dilakukan terhadap beberapa isolat yang memiliki potensi pengembangan di kemudian hari.

Bioassay sampai tahap penetapan seleksi menggunakan indikator *B. subtilis*, *C. albicans*, dan *F. oxysporum*. Hasil penelitian menunjukkan

bahwa sangat sedikit isolat yang mampu menghambat *C. albicans*, dengan diameter 7-10 mm sedangkan paper disc yang dipakai berdiameter 6 mm. Hasil penghambatan terhadap *B. subtilis* yang memiliki diameter penghambatan lebih dari 2 sebanyak 15 isolat dan 9 isolat memiliki diameter penghambatan sama dengan atau lebih dari 40 mm, Tabel III. Tiga isolat unggul dalam aplikasinya di bidang pertanian maupun kesehatan manusia, JA-2 memiliki nisbah daya hambat sebesar 5,5 terhadap *Bacillus subtilis*, MB-1 memiliki daya hambat sebesar 5,6 terhadap *Fusarium oxysporum*, dan KMD-7 memiliki daya hambat 4,1 terhadap *B. subtilis* dan daya hambat 3,5 terhadap *C. albicans*.

Yulianah, dkk. (1987) melaporkan bahwa medium yang mengandung glukosa 1,0% dan yeast extract 0,25 % dapat dipakai oleh *Streptomyces indonesiensis* ATCC 35859 untuk meningkatkan produksi antibiotik (antifungi) berspektrum luas. Cheeptam (1999) melaporkan bahwa medium yang mengandung glicerol dapat meningkatkan produksi antibiotik (anti-

Tabel IV. Nilai Rf antibiotik yang dielusi dengan eluen B,C,D, dan E, Mikroba indikator *B. subtilis*, *C. albicans*, dan *F. oxysporum f.sp. lycopersicae*

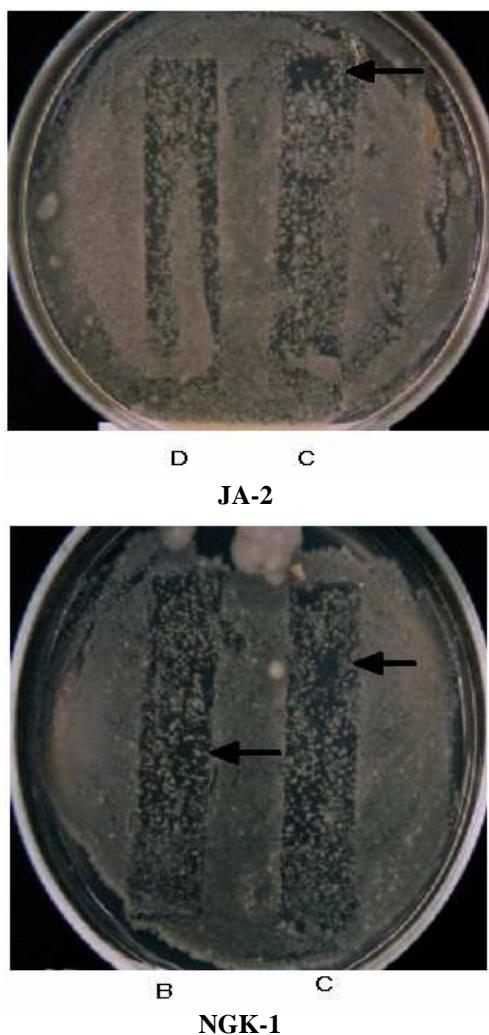
No	Isolat	Mikrob Indikator	Nilai Rf, dari Eluen			
			A	B	C	D
1	NGK-1	<i>B. subtilis</i>	-	-	0,75	-
2	SB-3	<i>B. subtilis</i>	-	-	0,30	-
3	JA-2	<i>B. subtilis</i>	-	-	0,91	-
4	KMN-3	<i>B. subtilis</i>	-	0,21 ; 0,94	-	-
5	MLT-2	<i>B. subtilis</i>	-	0,85	-	-
6	APK-1	<i>B. subtilis</i>	-	0,34 ; 0,93	-	-
7	KYP-2	<i>B. subtilis</i>	-	0,74	-	0,30
8	KMD-7	<i>C. albicans</i>	-	-	-	-
	KMD-7	<i>B. subtilis</i>	-	0,48	0,78	-
9	MB-1	<i>F. oxysporum</i>	-	-	-	-

Keterangan: A : Ammonium Klorida 20% ; B: Air dijenuhi Butanol ; C: Butanol: Asam asetat : Air (3:1:1)
D : Aseton:Butanol:Air (5:4:1) ; E: Air dijenuhi Asam asetat ; Sampel ditotolkan sebanyak 20 µL

fungi/bakteri), dan dalam penelitiannya produksi antibiotik mencapai maksimal menggunakan *Ellisiophyton inquinans* L1588-A8 dalam medium yang mengandung gliserol 5,0 % dan yeast extract 0,4 %. Antibiotik banyak dihasilkan oleh isolat yang ditumbuhkan pada medium yang mengandung F-4 dan GY, selain mengadung senyawa kompleks (tepung kedelai pada medium F-4), juga banyak mengandung gliserol. Dalam proses metabolisme mikroba pada umumnya gliserol dan glukosa diubah menjadi asam piruvat lewat *pathway* glikolisa dan acetil-KoA yang dibutuhkan dalam siklus asam trikarboksilat (*TCA cycle*) untuk proses respirasi. Glukosa dan gliserol merupakan substrat penting dalam pertumbuhan dan biosintesis penghasilan metabolit sekunder, termasuk antibiotik (Cheeptham, 1999). Peneliti lain, Margino, *et al.*, (2001) menunjukkan bahwa banyak antifungi diproduksi pada medium F-4 dan GY dibandingkan PDY, yakni hampir 40% medium F-4 dan GY mampu memacu produksi antifungi yang menghambat *Alternaria* sp.

Hasil karakterisasi senyawa antibiotik dengan teknik kromatografi dilakukan dengan berbagai eluen disajikan pada Tabel IV. Teknik kromatografi ini berbasis pada tingkat polaritas senyawa antibiotik dan berapa macam senyawa yang dikandung dalam larutan ekstraseluler jamur endofit sesudah ditumbuhkan di berbagai medium. Perbedaan nilai Rf sebagai kunci macam dan jumlah senyawa antibiotik yang bersangkutan.

Salah satu sifat fisik antibiotik terhadap pengaruh eluen adalah angka polaritasnya, sehingga polaritas pelarut atau eluen menentukan jarak pergerakan ‘bercak’ dari tempat totolan mencapai jarak tertentu, nilai ini selanjutnya dikenal sebagai *retardation force (Rf)* sesudah dibandingkan dengan jarak dimana titik elusi diakhiri (Margino, 1998). Antibiotik yang dihasilkan oleh NGK-1 memiliki nilai Rf : 0,75 setelah dielusi dengan Butanol:Asetat :Air (3 :1 :1) dan nilai Rf :0,80 pada eluen Air dijenuhi Asetat, dengan perkataan lain bahwa untuk pemanenan antibiotik tersebut dapat mempergunakan campuran pelarut tersebut setelah proses produksi secara fermentasi. Demikian halnya dengan isolat SB-3 dan JA-2 berturut memiliki nilai Rf : 0,30 dan 0,91 pada eluen Butanol:Asetat :Air (3 :1 :1). Isolat KMD-7 mampu memproduksi antibiotik penghambat *C. albicans* namun nilai Rf nya belum diketahui menggunakan kelima jenis eluen tersebut sehingga tidak muncul pada percobaan ini (Cheeptham, 1996 ; Margino, 1998). Isolat APK-1 memproduksi 2 macam antibiotik yang menghambat *B. subtilis* dan memiliki nilai Rf berturut-turut 0,34 dan 0,93 bila dielusi dengan eluen air yang dijenuhi butanol, demikian halnya isolat KMN-3 memiliki 2 macam antibiotik dengan nilai Rf 0,21 dan 0,94 apabila sampel dielusi dengan air yang dijenuhi butanol. Antibiotik yang diproduksi oleh isolat KMN-3, MLT-2, APK-1, KYP-2, dan KMD-7 dan menghambat *B. subtilis* memiliki polaritas sejenis walau secara rinci nilai Rf mereka



Gambar 2. Bioassai isolat jamur endofit JA-2 (eluen D dan C) dan NGK-1 (eluen D dan E) dan indikator *B. subtilis*

majoritas berbeda tetapi antibiotik KMN-3 dan APK-1 ada yang mirip karena nilai Rf mereka 0,93 dan 0,94, dimungkinkan antibiotik ini jenis dan bahan aktifnya sama. Beberapa antibiotik seperti penisilin, rosamisin, dan sefalosporin C, N dan P dapat diidentifikasi dengan menggunakan pelarut butanol:asam acetat:air (3:1:1). Sebagai pembanding diketahui bahwa rosamisin memiliki nilai Rf : 0,31; 0,37 dan 0,44 (Amini,

1995), sedangkan sefalosporin N dengan perbandingan pelarut (eluen) butanol:asam acetat:air (12:3:5) memiliki nilai Rf: 0,38 (Heftmann, 1967). Perbandingan hasil uji bioassai isolat MB-1 memiliki daya hambat terhadap *F. oxysporum* dan KMD-7 memiliki daya hambat terhadap *C. albicans* namun setelah dielusi menggunakan kelima eluen masih belum ditemukan ‘spot’ yang memberikan penghambatan terhadap mikroba indikator tersebut. Oleh karena itu, optimasi produksi hanya dapat dilakukan terhadap isolat JA-2 dan NGK-1, dimana JA-2 memiliki daya hambat 5,5 terhadap *B. subtilis* bila ditumbuhkan pada medium PDB dan NGK-1 memiliki daya hambat 5,2 terhadap *B. subtilis* dan 2,3 terhadap *F. oxysporum* bila ditumbuhkan pada medium Antibiotik-3, namun demikian daya hambat NGK-1 tidak sebesar MB-1 terhadap *F. oxysporum*, yakni 5,6.

Untuk mendapatkan hasil yang optimal, seleksi dilakukan berdasarkan nilai daya hambat antibiotik terhadap mikroba indikator dan rencana aplikasinya di sektor pertanian dan kesehatan. Sektor pertanian diwakili oleh *Fusarium oxysporum* dan sektor kesehatan diwakili oleh *Bacillus subtilis* dan *Candida albicans*, oleh karena itu dari Tabel III dapat dipilih berturut-turut JA-2 dan NGK-1 sebagai isolat unggul yang memiliki prospek bagus dalam aplikasi di lapangan atau skala fabrikasi setelah melewati serangkaian penelitian lanjutan dan sampai ke tahapan pemurnian dan aplikasi.

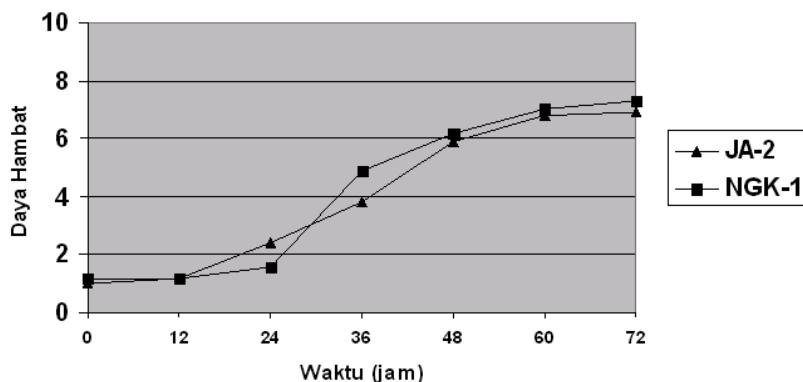
Hasil optimasi faktor lingkungan untuk pertumbuhan dan produksi antibiotik isolat JA-2 dan NGK-1 (Tabel V).

Kondisi optimasi yang disajikan pada Tabel V menghasilkan daya hambat terhadap mikroba indikator *B. subtilis*, (Gambar 2).

Hasil optimasi menunjukkan bahwa produksi antibiotik dicapai sesudah jam ke 60 baik oleh isolat JA-2 dan NGK-1 dengan nilai penghambatan berkisar 7,0 walau fase lag

Tabel V. Kondisi optimum pertumbuhan dan produksi antibiotik NGK-1 dan JA-2

Isolat	pH	Agitasi (rpm)	Aerasi (mL/mnt)	Substrat (%)	Temperatur °C	Karbon (Gliserol, g/L)
NGK-1	6,5	125 rpm	2500	5	30	5
JA-2	6,0	150 rpm	3000	5	30	7,5



Gambar 3. Daya hambat antibiotik produksi isolat JA-2 dan NGK-1 yang ditumbuhkan pada medium GY selama 72 jam

mereka sedikit berbeda dimana JA-2 sampai jam ke 24 sedangkan NGK-1 jam ke 12-an. Data pertumbuhan tidak disajikan karena analisa N total terkendala oleh alat namun demikian Gambar 3 dapat memberikan ilustrasi kemampuan isolat yang bersangkutan menghambat mikroba indikator atau aplikasi di kemudian hari. Optimalisasi ini mampu meningkatkan daya hambat/ bunuh antibiotik isolat JA-2 dari 5,5 menjadi 6,9 dan isolat NGK-1 daya hambat/bunuh meningkat dari 5,2 menjadi 7,3.

Kesimpulan

1. Isolat jamur endofit JA-2 dan NGK-1 mampu memproduksi antibiotik yang dapat menghambat *B. subtilis* dan *F. oxysporum* f.sp. *licopersicae* dan telah diketahui karakter awalnya.
2. Isolat MB-1 memiliki prospek aplikasi di bidang pertanian karena sangat menghambat *F. oxysporum* f.sp. *licopersicae* namun belum dapat dikarakterisasi produksi antibiotiknya, sedangkan isolat KMD-7 memiliki potensi tinggi untuk diaplikasikan di bidang kesehatan manusia karena mampu menghambat *Candida albicans* dan *B. Subtilis*.

Daftar Pustaka

- Amini, 1995. *Petunjuk Laboratorium Isolasi dan Pemurnian Antibiotik*. PAU Bioteknologi UGM. Yogyakarta
- Bacon, F. W., 1988. Procedur of Isolating the Endophytes from Tall Fescue and Screening Isolates for Ergot Alkaloids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2615-2618
- Brunner, F. and Petrini, O., 1992. Taxonomy of Some *Xylaria* spp. and Xylariceous Endophytes by Isozyme Electrophoresis. *Mycol. Res.* 96: 723-733
- Carrol, G. C., 1988. Fungal Endophytes in Stems and Leaves from Latent Pathogens to Mutualistic Symbions. *Ecology*, 69:2-9
- Cheeptham, N., 1996. Studies of Antifungal Antibiotics from *Ellisiodbotis inquinans* L1588-A8. Master Thesis. Department of Agricultural Chemistry, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan
- Cheeptham, N., 1999. Studies of Antifungal Antibiotics from *Ellisiodbotis inquinans* L1588-A8. PhD Thesis. Department of Agricultural Chemistry, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan
- Chen, C., Bauske, E. M., Musson, G., Rodriguez-Kabana, R., and Kloepper, J. W., 1995 Biological Control of *Fusarium* Wilt on Cotton by Use of Endophytic Bacteria. *Biol. Control*, 5:83-91

- Coleman, D. C., Rinaldi, M. G., Heynes, K. A., Rex, J. H., Summerbell, R. C., Anassie, Li, E. J., and Sullivan, D.J., 1998. Importance of *Candida* sp. other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Medical Mycology*. 36 (Suppl 1): 156-165
- Franklin, T. J. & Snow, G. A., 1989. *Biochemistry of antimicrobial action*. Chapman & Hall. London.
- Garcia, F. N., Sanchez, M., Nombela, C., and Pla, J., 2001. Virulence Genes in The Pathogenic Yeast *Candida albicans*. *FEM Microbiology Reviews*. 25: 245-268
- Heftmann, E., 1967. *Chromatography*. 2nd ed. Reinhold Publishing Company. New York. Copenhagen.
- Hostettmann, K., and Wolfender, J.L., 1997. The search for biologically active secondary metabolites. *Pesticide Science*. 51:471-482
- Hostettmann, K., Potterat, O., and wolfender, J. L., 1998. The potential of hihger plants as a resources of new drugs. *Chimia*, 52:10-17
- Huang, L. H. and Kaneko, T., 1996. *Pyrenomyces* and *Loculomycetes* as Sources of Secondary Metabolites. *J. Industrial Microbiol*. 17:402-416
- Jimenez, M., Huerta, T. and Mateo, R., 1997. Mycotoxin Production by *Fusarium* Sp. Isolated from Bananas. *Eppl. Environ. Microbiol*. 63: 364 -369
- Kauffman, C. A. dan Carver, P. L., 1997. Antifungal agents in the 1990s. Current status and future developments (Review). *Drugs*. 53:539-549
- Kurtz, M. B., 1997. New antifungal drugs targets: A vision for the future. *ASM News*. 64:31-39
- Margino, S., 1997. "Tropical bioresources consevation for production useful materials". Training report. November 2-14 1997. Lab. Of Bioscience and Biochemistry, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Margino, S., 1998. "Tropical bioresources consevation for production useful materials". Training report. March 12-24, 1998. Lab. Of Bioscience and Biochemistry, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan.
- Margino, S. Fausul Mubin, Irfan D. P., dan Tomita, F., 2001. Kajian pendahuluan senyawa antifungi dari fungi endofit untuk bidang pertanian. Seminar Keanekaragaman Hayati dan aplikasi Bioteknologi Pertanian. BPPT, Jakarta tanggal 6 Maret 2001.
- Martani, E., Margino, S., dan Worang, R.. L., 2002. Antifungi Penghambat *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* yang disintesis oleh Fungi Endofit. *Gama Sains* Vol. 4 (2): 112-120
- Neu, C. H., 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257:1064-1073
- Petrini, O., Sieber, T. N., Toti, L. and Viret D., 1992. Ecology Metabilite Production and Substrate Utilization in Endophytic Fungi. *Natural Toxin*, 1:185-196
- Tscherter, H. and Dreyfuss., 1992. New Metabolites, Processes for Their Production and Uses. International Application Published Under The Patent Cooperation Treaty (PCT). *International Publication Number 38 : 28-45*.
- Yulinah, E. S., Satiadarma, K. dan Padmawinata, K., 1987. Antibiotik-antifungi Spektrum Luas Dihasilkan oleh *Streptomyces indonesiansis* ATCC 35859. Buku Risalah Seminar Nasional Metabolit Sekunder 1987. PAU Bioteknologi UGM Yogyakarta.

Korespondensi : Sebastian Margino
Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pertanian
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta