

Karakterisasi dan Uji Aktivitas Antibakteri dari Fungi Endofit Ranting Tanaman Manggis (*Garcinia mangostana* L.) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Kevin Widjaja^{(a)*}, Lisa Soegianto^(a), Martha Ervina^(a)

^(a)Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Indonesia

Penyebab resistensi pada masyarakat antara lain adalah penggunaan obat antibakteri yang tidak tepat dosis dan lama penggunaan yang tidak sesuai aturan. Akibatnya pengobatan infeksi selalu membutuhkan senyawa baru yang lebih poten. Mikroba endofit merupakan mikroba yang seluruh atau sebagian hidupnya berada dalam jaringan tumbuhan yang di antara keduanya terjalin hubungan yang saling menguntungkan. Dalam penelitian ini dilakukan isolasi fungi endofit dengan cara menempelkan potongan ranting tanaman Manggis yang telah disterilisasi permukaannya pada media *Malt Extract Agar* dan didapat tiga koloni murni fungi endofit. Uji aktivitas antibakteri dengan metode inokulasi langsung pada media *Plate Count Agar* yang telah diinokulasi oleh bakteri uji dan menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 8739 sebanyak satu isolat (ER2) dengan rasio hambatan rata-rata 1,42 dan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 sebanyak tiga isolat (ER1, ER2, dan ER3) dengan rasio hambatan rata-rata 1,66; 1,37; dan 1,89. Ketiga fungi tersebut diamati ciri makroskopis, mikroskopis serta uji biokimia. ER1 dan ER3 diduga merupakan genus *Penicillium* dengan ciri spesifik seperti adanya konidiofor, metulae, fialid, dan konidiospora. ER2 diduga merupakan genus *Rhizoctonia* karena terdapat percabangan hifa hampir berbentuk siku dan sel yang menyerupai sel monilia.

Kata kunci : manggis (*Garcinia mangostana* L.), fungi endofit, aktivitas antibakteri, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

Characterization and Antibacterial Activity Assay of Endophytic Fungi of Mangosteen Twigs (*Garcinia mangostana* L.) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Resistance is commonly caused by improper usage of antibiotics, so the treatment of the infection always needs a new and more potent compounds. Endophytic microbes are microbes that all or part of its life stay in the tissues of plant, which established a mutually beneficial relationship between them. In this research, isolation of endophytic fungi was conducted by sticking the sterilized twigs of mangosteen to the media *Malt Extract Agar* obtained three pure endophytic fungi colonies. The antibacterial activity assay with direct inoculation method at media *Plate Count Agar* which was inoculated with bacteria and showed that the antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 8739 was one isolate (ER2) with inhibition average ratio 1.42 and against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 was three isolates (ER1, ER2, and ER3) with inhibition average ratio 1.66; 1.37; and 1.89. The fungus were observed characteristics of the macroscopic, microscopic and biochemical assay. ER1 and ER3 isolates are suspected as a *Penicillium* genus with specific characteristics such as the conidiophore, fialid, metulae, and conidiospore. ER2 isolate was suspected as a *Rhizoctonia* genus because there are nearly right-angled hyphae and monilioid cells.

Keywords : mangosteen (*Garcinia mangostana* L.), endophytic fungi, antibacterial activity, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

*Corresponding author: Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Jl. Raya Kalisari Selatan No. 1 Surabaya, e-mail: kevinwidjaja11@gmail.com

PENDAHULUAN

Antibiotik telah lama digunakan sebagai pencegahan dan pengobatan penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme. Penggunaan antibiotik semakin meningkat seiring dengan peningkatan kasus penyakit, terutama penyakit infeksi. Sebagian besar antibiotik yang secara komersil digunakan merupakan antibiotik sintetik yang rentan memicu resistensi terhadap patogen, terutama bakteri. Penyebab resistensi antara lain karena penggunaan obat antibakteri yang tidak tepat dosis dan lama penggunaan yang tidak sesuai aturan. Akibatnya pengobatan infeksi selalu membutuhkan senyawa baru yang lebih poten. Selain itu, pengobatan dengan bahan-bahan antibiotik kimiawi relatif mahal dan memiliki dampak negatif bagi kesehatan. Eksplorasi untuk menemukan sumber antibiotik baru yang alami perlu dilakukan, salah satunya dengan memanfaatkan mikroba endofit (Purwanto, Pasaribu, dan Bintang, 2014). Dunia kesehatan saat ini mulai mengembangkan mikroba endofit yang merupakan mikroba yang hidup pada jaringan tanaman sebagai agen penghasil senyawa metabolit sekunder (Retnowati, Uno, dan Rahman, 2012).

Keadaan ini yang mendorong beberapa peneliti untuk mencari sumber senyawa antimikroba baru dari alam maupun yang sintesis. Sumber senyawa antimikroba dari alam dapat diperoleh dari tumbuhan dan juga endofit. Senyawa dari tumbuhan diperoleh dengan cara mengekstraksi bagian tanaman tertentu dengan pelarut yang dapat menarik senyawa aktif berupa metabolit sekunder, sedangkan mikroba endofit adalah mikroba yang tumbuh dalam jaringan tumbuhan dan menghasilkan senyawa bioaktif yang berperan antara lain sebagai antimikroba, anti malaria, anti kanker dan juga berperan dalam pertumbuhan tanaman itu sendiri (Strobel, Daisy, and Castillo, 2004). Mikroba endofit merupakan mikroba yang seluruh atau sebagian hidupnya berada dalam jaringan tumbuhan (batang, cabang atau ranting tumbuhan). Di antara kedua organisme tersebut terjalin hubungan yang saling menguntungkan (Kumala, Dwi, dan Priyo, 2008). Keuntungan lain dari pemanfaatan mikroba endofit karena lebih mudah dimanipulasi secara genetik dibandingkan tanaman atau inangnya. Biaya produksi bahan obat melalui proses fermentasi juga lebih efisien dan murah dibandingkan dengan teknik kultur jaringan tanaman untuk skala produksi bahan obat yang besar (Kumala, 2014).

Manggis (*Garcinia mangostana* L.) merupakan tanaman yang kulit buahnya banyak dimanfaatkan sebagai obat bahan alam. Pada beberapa penelitian sebelumnya ditemukan aktivitas antibakteri pada kulit buah dan fungi endofit kulit buah Manggis. Penelitian fungi endofit kulit buah Manggis yang dilakukan oleh Elfina, Martina, dan Roza (2014), fungi endofit diperoleh dari kulit buah Manggis dan diuji aktivitas antimikrobanya terhadap *Candida*

albicans, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli*.

Pemilihan ranting pada penelitian ini atas pertimbangan ketersediaan kulit buah sebagai bahan obat yang bergantung dari musim berbuahnya dan juga diharapkan dapat ditemukan fungi endofit selain pada kulit buah.

METODE PENELITIAN

Alat

Tabung reaksi, *beaker glass*, Erlenmeyer, *vortex* (Labinco BV, Belanda), jangka sorong, *Laminar Air Flow* (LAF) (All American, Amerika), oven (Binder, Jerman), otoklaf (All American, Amerika), inkubator (Binder, Jerman), lemari asam, timbangan analitis (Sartorius, Jerman), mikroskop (Olympus, Jerman), kamera mikroskop (*OptiLab, Indonesia*), *spiritus brander*.

Bahan

Natrium hipoklorit 5,3% (Brataco, Indonesia), NaCl, etanol 96% teknis (Brataco, Indonesia), etanol 70% teknis (Brataco, Indonesia), *spiritus*, 1/2 McFarland I, akuades, larutan Laktofenol, susu skim, *oleum cocos*, larutan iodium.

Bakteri Uji

Escherichia coli ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 yang diperoleh di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala, Surabaya.

Media

Media Malt Extract Agar (MEA), *media Potato Dextrose Yeast* (PDY), *media Nutrient Agar* (NA) (Merck KGaA, Jerman), *media Plate Count Agar* (PCA) (Merck KGaA, Jerman), *media Starch Agar* (SA), *media Milk Agar Base* (MAB), *media Neutral Red Agar* (NRA).

Tahapan Penelitian

Pengamatan Makroskopis, Mikros-kopis, dan Determinasi Ranting Tanaman Manggis (Garcinia mangostana L.)

Ranting tanaman Manggis dibersihkan dengan air mengalir kemudian diamati secara makroskopis, mikroskopis, dan dideterminasi.

Isolasi Fungi Endofit dari Ranting Tanaman Manggis (Garcinia mangostana L.)

Permukaan ranting segar tanaman Manggis disterilisasi dengan cara dibersihkan dengan air mengalir, kemudian ranting direndam dalam etanol 70% selama ± 2 menit, selanjutnya direndam pada larutan NaOCl (Natrium Hipoklorit) 5,3% selama ± 5 menit. Selanjutnya ranting direndam dengan etanol 70% selama ± 1 menit, selanjutnya direndam dalam air suling steril 1 menit, kemudian dikeringkan dengan kertas saring steril selama beberapa menit. Ranting dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil, diletakkan pada media padat MEA dengan sedikit

penekanan, posisi permukaan potongan ranting menempel pada media agar, selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 2-14 hari.

Pemurnian Kultur Fungi Endofit dari Ranting Tanaman Manggis (Garcinia mangostana L.)

Koloni fungi endofit yang tumbuh diamati secara makroskopis (tipe koloni, sifat permukaan koloni, dan warna koloni), masing-masing koloni fungi (yang secara makroskopis berbeda) diambil dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml media cair PDY. Media cair yang telah terisi masing-masing koloni diinkubasi pada suhu ruang 2-14 hari. Koloni masing-masing fungi yang tumbuh diambil dan dipindahkan ke media padat MEA dalam cawan petri, diinkubasi selama 2-5 hari pada suhu ruang hingga didapat kultur fungi murni.

Pengujian Aktivitas Antibakteri Fungi Endofit terhadap Escherichia coli dan Staphylococcus aureus

Sebanyak 0,1 mL suspensi bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* 24 jam yang setara dengan 1/2 McFarland I diinokulasikan ke dalam 10 ml media padat PCA, dihomogenkan menggunakan vorteks dan dituang ke dalam cawan petri kemudian dilakukan prainkubasi selama 1,5-2 jam. Fungi endofit yang telah ditumbuhkan pada media PDY diambil dan inokulasikan langsung pada media padat PCA yang telah diprainskubasi selama 1,5-2 jam, kemudian diinkubasi lagi pada suhu ruang selama 24 jam. Diamati dan diukur diameter fungi dan Daerah Hambatan Pertumbuhan (DHP) yang terbentuk, kemudian dihitung rasio hambatannya.

Karakterisasi Fungi Endofit

Pengamatan Makroskopis Fungi Endofit

Fungi endofit yang telah murni pada media padat MEA diamati secara makroskopis meliputi tipe koloni, sifat permukaan koloni, ukuran koloni, usia koloni, dan warna koloni.

Pengamatan Mikroskopis Fungi Endofit

Dilakukan pula pengamatan morfologi fungi secara mikroskopis, yaitu dengan membuat preparat hidup fungi dengan larutan Laktofenol yang kemudian diamati bagian-bagian spesifiknya dengan menggunakan mikroskop.

Uji Biokimia Fungi Endofit

Uji Hidrolisis Amilum

Fungi endofit dari lempengan MEA diinokulasikan setebal mungkin pada media *Starch Agar* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Proses pengamatan dilakukan dengan menuang 6 mL larutan iodium ke atas media padat *Starch Agar* dan diamati perubahan warna yang terjadi di sekitar koloni. Hidrolisis negatif jika terbentuk warna biru tua di sekitar koloni. Hidrolisis positif jika terbentuk warna merah kecoklatan (hidrolisis parsial) atau jernih

(hidrolisis total) di sekitar koloni (modifikasi dari Hadjoetomo, 1993).

Uji Hidrolisis Kasein

Fungi endofit dari lempengan MEA diinokulasikan setebal mungkin pada media padat *Milk Agar Base* yang telah diberi 1 mL susu skim steril kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Hidrolisis positif jika terdapat daerah transparan di sekitar koloni (modifikasi Hadjoetomo, 1993).

Uji Hidrolisis Lemak

Fungi endofit dari lempengan MEA diinokulasikan setebal mungkin pada media padat *Neutral Red Agar* yang telah diberi 0,5 mL *oleum cocos* steril kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Proses pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan warna di sekitar koloni. Hidrolisis positif jika terbentuk warna merah di sekitar koloni (modifikasi dari Murray *et al.*, 2014)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ranting tanaman Manggis didapatkan dari daerah Malang pada bulan Februari 2015. Pengamatan makroskopis dan mikroskopis dilakukan dengan cara membuat penampang melintang ranting tanaman Manggis dan diamati bagian-bagiannya. Pada pengamatan makroskopis, jenis tanaman yang diamati berbentuk pohon dengan batang ramping, lurus, bercabang, bekas percabangan tertinggal berupa benjolan pada batang, bergetah bila dilukai, getah berwarna kuning, lengket, dan kental. Ranting berbentuk persegi empat, berair, berwarna hijau serta berbuku-buku. Pengamatan makroskopis tersebut telah sesuai dengan pustaka Morton (1987).

Bagian-bagian dari ranting tanaman Manggis yang teramati antara lain epidermis berwarna hijau, kelenjar getah, jaringan parenkim, xilem, serabut sklerenkim, dan empulur. Dari hasil determinasi dengan menggunakan pustaka van Stennis (2008) ranting yang didapatkan merupakan ranting dari tanaman Manggis (*Garcinia mangostana* L.).

Setelah itu dilanjutkan dengan mensterilisasi permukaan ranting tanaman Manggis dan diletakkan di atas media padat MEA. Kontrol sterilisasi dilakukan dengan menginokulasikan sebanyak 1 mL air bilasan terakhir pada media padat MEA dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Fungi endofit yang tumbuh diamati secara makroskopis (tipe koloni, sifat permukaan koloni, warna koloni) dan didapatkan sebanyak 3 macam fungi endofit dari hasil isolasi pada media padat MEA. Pemurnian dilakukan sebanyak 4 kali hingga didapatkan tiga kultur murni fungi endofit ranting tanaman Manggis. Ketiga kultur murni (isolat) fungi endofit tersebut diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri uji yaitu *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 yang

masing-masing mewakili Gram negatif dan positif serta merupakan bakteri patogen yang sering menyebabkan infeksi dan resistensi. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode inokulasi langsung.

Hasil pengujian terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 8739, ER2 memiliki aktivitas antibakteri dengan rasio hambatan rata-rata sebesar 1,42. Untuk ER1, ER2, dan ER3 masing-masing memiliki aktivitas terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dengan rasio hambatan rata-rata sebesar 1,66; 1,37; dan 1,89. Digunakan rasio hambatan pada uji aktivitas antibakteri dikarenakan fungi yang ditumbuhkan pada tabung reaksi memiliki ukuran yang belum tentu sama. Penggunaan rasio hambatan juga dilakukan oleh Elfina, Martina, dan Roza (2014).

Proses karakterisasi dilakukan pada isolat fungi endofit yang memiliki aktivitas antibakteri (ER1, ER2, dan ER3). Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati sifat permukaan koloni, tipe koloni, ukuran koloni, warna koloni, dan usia koloni. ER1 memiliki tipe koloni berfilamen, sifat permukaannya seperti beludru, berwarna hijau keabuan dan putih, serta berukuran 1-4 cm pada usia 5 hari. ER2 memiliki tipe koloni berfilamen, sifat permukaannya seperti kapas, berwarna putih kehitaman, serta berukuran ± 9 cm pada usia 5 hari. ER3 memiliki tipe koloni berfilamen, sifat permukaannya seperti beludru, berwarna abu-abu kehijauan dan putih, serta berukuran 1-4 cm pada usia 5 hari.

Kemudian dilanjutkan pengamatan mikroskopis dengan membuat preparat hidup fungi menggunakan larutan Laktofenol yang bersifat isotonis sehingga tidak merusak bentuk fungi, tidak mudah menguap, dan juga berguna sebagai antiseptik. ER1 dan ER3 memiliki kesamaan pada bagian-bagian spesifiknya seperti konidiofor, metulae, fialid, dan konidiospora. Keduanya memiliki 2 titik cabang. Pada ER2 dapat ditemukan percabangan hifa hampir membentuk siku dan sel yang menyerupai sel monilia.

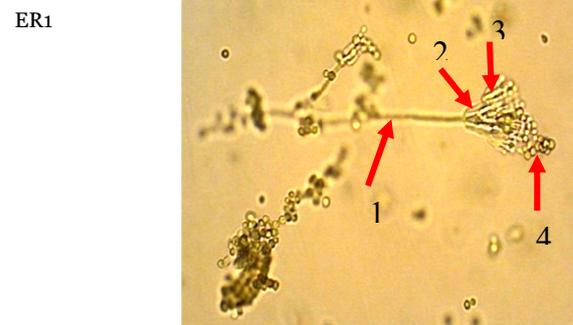
ER1 tidak menghidrolisis amilum, namun menghidrolisis kasein dan lemak yang menunjukkan bahwa isolat ini menghasilkan enzim kasease dan lipase. ER2 tidak menghidrolisis kasein, namun menghidrolisis amilum dan lemak yang menunjukkan bahwa isolat ini menghasilkan enzim amilase dan lipase. ER3 menghidrolisis amilum, kasein, dan lemak yang menunjukkan bahwa isolat ini menghasilkan enzim amilase, kasease, dan lipase.

Pengamatan mikroskopis dari fungi endofit murni ranting tanaman Manggis (ER1, ER2, dan ER3) tersebut disesuaikan dengan pustaka Watanabe (2010) serta Barnett, Hunter, and Sarry (1972) tentang determinasi fungi.

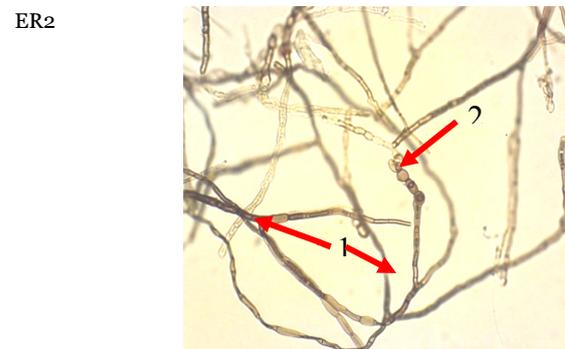
Pengamatan mikroskopis bertujuan untuk melihat adanya ciri spesifik dari masing-masing isolat fungi endofit. Berdasarkan hasil determinasi, diduga ketiga isolat fungi endofit termasuk dalam kelas Deuteromycetes. ER1 dan ER3 diduga

termasuk dalam genus yang sama bila dilihat secara mikroskopis, diduga kedua isolat ini merupakan genus *Penicillium* dengan 2 titik cabang, yang memiliki ciri spesifik seperti adanya konidiofor, metulae, fialid, dan konidiospora. Walaupun ER1 dan ER3 secara mikroskopis memiliki kemiripan, namun keduanya bukanlah dari spesies yang sama dikarenakan pada uji biokimia, ER3 menghasilkan enzim amilase, sedangkan ER1 tidak. Pada uji hidrolisis kasein, ER3 menghidrolisis kasein lebih kuat dibandingkan ER1.

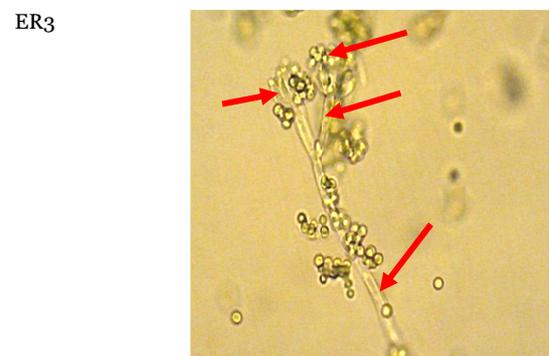
TABEL 1. Hasil Pengamatan Mikroskopis Isolat Fungi Endofit



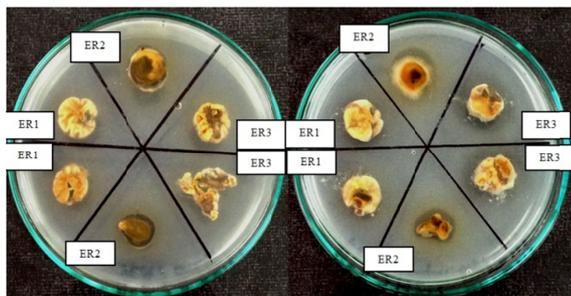
- 1: Konidiofor
- 2: Metulae
- 3: Fialid
- 4: Konidiospora



- 1: Percabangan hifa hampir siku
- 2: Monilioid cell



- 1: Konidiofor
- 2: Metulae
- 3: Fialid
- 4: Konidiospora



GAMBAR 1. Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Daya antibakteri yang dihasilkan oleh genus *Penicillium* kemungkinan dikarenakan adanya kemampuan dalam menghasilkan antibiotik penisilin yang dapat menghambat sintesis peptidoglikan dinding sel bakteri (Cole and Schweikert, 2003). Penisilin menghambat sintesis dinding sel bakteri dengan cara menghambat sintesis enzim atau inaktivasi enzim untuk mensintesis peptidoglikan yang merupakan komponen penting dinding sel bakteri. Terhambatnya sintesis peptidoglikan menyebabkan hilangnya viabilitas dan sering menyebabkan sel bakteri lisis (Suwandi, 1992). ER2 diduga merupakan genus *Rhizoctonia* dikarenakan terdapat percabangan hifa yang hampir membentuk siku dan sel yang menyerupai sel monilia.

DAFTAR PUSTAKA

Barnett HL, Hunter, and Sarry, B, 1972, *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 3rd ed., Burgess Publishing Company, Minnesota.

Cole RJ and Schweikert MA, 2003, *Handbook of Secondary Fungal Metabolites*, Academic Press Elsevier Science, California.

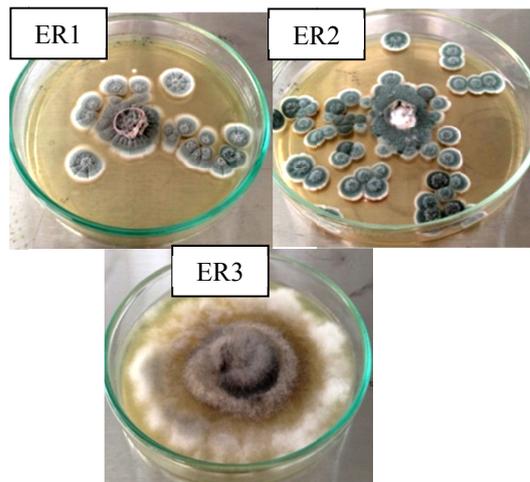
Elfina D, Martina A dan Roza RM, 2014, Isolasi dan Karakterisasi Fungi Endofit dari Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) sebagai Antimikroba terhadap *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, *Skripsi*, Kampus Binawidya Pekanbaru, Pekanbaru.

Hadioetomo RS, 1993, *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek*, PT. Gramedia, Jakarta.

Kumala S, Dwi HJ, dan Priyo W, 2008, Isolasi Mikroba Endofit Ranting Tumbuhan Trengguli (*Cassia fistula* L.) dan Aktivitas Enzim Xilanase, *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 6(4):1412-2855.

Kumala S, 2014, *Mikroba Endofit*, PT. ISFI Penerbitan, Jakarta.

Morton JF, 1987, *Fruits of Warm Climates*, diakses pada tanggal 18 November 2015,



GAMBAR 2. Hasil pengamatan makroskopis koloni fungi endofit yang memiliki aktivitas antibakteri berusia 5 hari.

KESIMPULAN

Fungi endofit hasil isolasi dari ranting tanaman Manggis (*Garcinia mangostana* L.) sebanyak tiga isolat dengan kode isolat ER1, ER2, dan ER3. dan mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* sebanyak 1 isolat (ER2) dengan rasio hambatan rata-rata sebesar 1,42 dan terhadap *Staphylococcus aureus* sebanyak 3 isolat (ER1, ER2, dan ER3) dengan masing-masing rasio hambatan rata-rata sebesar 1,66; 1,37; dan 1,89.

<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/mangosteen.html>

Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, dan Rodwell VW, 2014, *Biokimia Harper*, edisi 29, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.

Purwanto UMS, Pasaribu FH, dan Bintang M, 2014, Isolasi Bakteri Endofit dari Tanaman Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Potensinya sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri, *Current Biochemistry Journal*. 1(1): 51-57.

Strobel G, Daisy B, and Castillo U, 2004, Natural Products from Endophytic Microorganisms, *Journal of Natural Products*, 67(2):257-268.

Suwandi U, 1992, *Mekanisme Kerja Antibiotik*, PT. Kalbe Farma, Jakarta.

Van Steenis CGGJ, 2008, *Flora*, Diterjemahkan dari Bahasa Belanda oleh Moeso Surjowinoto, PT Pradnya Paramita, Jakarta.

Watanabe T, 2010, *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi, Morphologies and Cultured Fungi and Key to Species*, 3rd ed., CRC Press, USA.