

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SECARA MOLEKULER JAMUR ENDOFIT DARI UMBI BAWANG RAMBUT (*Allium chinense* G. Don)

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MOLECULAR OF ENDOPHYTIC FUNGI FROM Bulb BAWANG RAMBUT (*Allium chinense* G. Don)

Sylvia Rizky Prima^{1*}, Fetri Charya Munarsih¹, Hadi Nugroho¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta

*Email: sylviarizkyprima@gmail.com

ABSTRAK

Jamur endofit *Byssoschlamys spectabilis* telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi secara molekuler dari umbi bawang rambut (*Allium chinense* G. Don). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi dan mengetahui jenis spesies jamur endofit yang terdapat pada umbi bawang rambut (*Allium chinense* G. Don). Pemilihan tanaman bawang rambut dikarenakan penggunaan tanaman ini sebagai obat tradisional oleh masyarakat Bulungan, Kalimantan Utara. Masyarakat Bulungan menggunakan tanaman ini sebagai obat sakit kepala, radang tenggorokan, sinusitis dan jantung koroner. Hasil penelitian terdahulu diketahui bawang rambut memiliki aktivitas antibakteri, antioksidan, antiinflamasi, antikanker dan antikolesterol. Jamur endofit diyakini dapat memiliki aktivitas dan menghasilkan metabolit sekunder yang mirip dengan tanaman inangnya. Jamur endofit diperoleh dari jumlah sampel tanaman yang sangat sedikit tetapi dapat menghasilkan rendemen yang tinggi. Dalam penelitian ini, isolasi jamur endofit dilakukan dengan melakukan penanaman sampel tanaman didalam media *potato dextrose agar* dan diidentifikasi secara molekuler menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), sekuensing dan analisis pohon filogenetik.

Kata Kunci: *allium chinense*, *byssoschlamys spectabilis*, jamur endofit

ABSTRACT

Byssoschlamys spectabilis endophytic fungi have been successfully isolated from umbi bawang rambut (*Allium chinense* G. Don). The choice of umbi bawang rambut (*Allium chinense* G. Don) plants is due to the use of this plant as traditional medicine by the people of Bulungan, North Kalimantan. The Bulungan community uses this plant as a remedy for headaches, strep throat, sinusitis and coronary heart disease. The results of previous studies note that hair onions have antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and anticholesterol activities. Endophytic fungi are believed to have activity and produce secondary metabolites that are similar to their host plants. This is what underlies this research. Endophytic mushrooms are obtained from a very small number of plant samples but can produce high yields. In this research, isolation of endophytic fungi was carried out by planting plant samples in *potato dextrose agar* media. While identification is carried out molecularly.

Keywords: *allium chinense*, *byssoschlamys spectabilis*, endophytic fungi

PENDAHULUAN

Bawang rambut (*Allium chinense* G. Don) merupakan salah satu jenis tanaman yang

secara turun temurun digunakan sebagai bumbu masak oleh masyarakat Kalimantan Utara. Selain bermanfaat sebagai penyedap

dan pengharum masakan, umbi bawang rambut juga digunakan sebagai obat tradisional. Secara empiris, tanaman ini biasa digunakan sebagai obat sakit kepala, radang tenggorokan, sinusitis dan jantung koroner atau kejang jantung (*angina pectoris*). *Allium chinense* G. Don memiliki aktivitas antiplatelet, antiinflamasi, antituberkuler, antispasmodik, antikanker, antikolesterol dan sebagai insektisida Yu *et al* (2015); Zhi-hong *et al*, 2016. Berdasarkan hasil penelitian Naibaho *et al* (2015) diketahui bahwa tanaman *Allium chinense* G. Don mengandung senyawa formamid, alilin, alil alkohol, senyawa golongan triterpenoid dan senyawa golongan minyak atsiri.

Sepuluh dekade terakhir para peneliti tertarik untuk meneliti mikroba endofit yang terdapat pada tanaman dan mengkaji bioaktivitasnya serta metabolit sekundernya. Hampir seluruh tanaman memiliki jamur endofit. Jamur endofit merupakan mikroba yang tumbuh dalam sel tanaman yang tidak menimbulkan efek yang merugikan bagi tanaman inangnya. Jamur endofit diyakini memiliki bioaktivitas dan membantu menghasilkan metabolit sekunder bagi tanaman inangnya. Penelitian dengan objek mikroba endofit sedang banyak dikeluti oleh para peneliti. Hal ini dikarenakan dapat menghemat penggunaan sampel bahan

alam namun dapat menghasilkan senyawa aktif dalam jumlah relatif lebih besar.

Berdasarkan penelusuran literatur, diketahui bahwa jamur endofit dari tanaman bawang rambut (*Allium chinense* G. Don) belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu, peneliti ingin mengetahui jenis jamur endofit apakah yang terdapat dalam tanaman bawang rambut.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: alat-alat gelas, cawan petri, *laminar air flow*, pisau steril, kaca arloji, jarum ose, autoklaf (Hirayama), lampu spiritus, pinset, vortex, *hot plate*, pipet tetes, plastik pembungkus aluminium foil, *Polymerase Chain Reaction* (Agilent Surecycler 8800), dan elektroforesis (Weltech).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut: umbi bawang rambut, aquadest, air bersih, alkohol 70%, *potato dextrose agar*, kloramfenikol, ddH₂O, MyTaq Red Mix 2x, primer ITS1 (F 5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'), primer ITS4 (R 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3').

Penyiapan Sampel Dan Determinasi Sampel Umbi Bawang Rambut

Sampel tanaman bawang rambut diperoleh dari petani di Desa Bulungan, Kalimantan Utara.

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Anatomi dan Sistematika Tumbuhan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman, Samarinda.

Isolasi Jamur Endofit dari Umbi Bawang Rambut

Sampel segar umbi bawang rambut dicuci dengan air mengalir. Sterilisasi sampel dilakukan dengan merendam sampel kedalam alkohol 70% dan dicuci kembali dengan aquadest steril (Radji, 2011). Bagian dalam umbi bawang rambut dipotong kecil sedemikian rupa. Potongan sampel dimasukkan kedalam media PDA dan diinkubasi selama 3 – 4 minggu. Setiap pengerjaan dilakukan secara aseptis.

Identifikasi Hasil Isolat Jamur Endofit Secara Makroskopis dan Mikroskopis

Isolat jamur endofit yang telah diperoleh dilakukan identifikasi berdasarkan ciri-ciri yang terlihat dari permukaan media PDA. Pengamatan makroskopis meliputi pengamatan secara langsung dengan melihat bentuk dan warna hifa jamur yang terbentuk. Untuk pengamatan secara mikroskopis dilakukan dibawah mikroskop binokuler. Pengamatan mikroskopis dilakukan setiap hari sampai terlihat dari konidia jamur tersebut. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan

menggunakan mikroskop binokuler. Preparat untuk pengamatan dilakukan dengan mengambil konidia atau spora dari biakan murni jamur endofit pada media PDA menggunakan jarum ose yang telah disterilkan. Inokulum jamur diletakkan di atas potongan media pada objek glass dan ditutup dengan *cover glass* kemudian diletakkan secara perlahan-lahan. Pengamatan ciri-ciri mikroskopis meliputi ada tidaknya spora atau konidia, rhizoid, tipe hifa, bentuk spora dan konidia dengan menggunakan mikroskop binokuler perbesaran 40x.

Identifikasi Secara Molekuler Isolat Jamur Endofit yang Diisolasi Dari Umbi Bawang Rambut

Ekstraksi *genomic* DNA (gDNA)

Ekstraksi *genomic* DNA (gDNA) jamur endofit dilakukan dengan menggunakan protokol dari Kit Gene aid GBY100. Proses isolasi terdiri dari beberapa tahapan yaitu preparasi proses lisis sel dengan berbasis enzimatis dengan bantuan *lysozyme*, eliminasi protein dan tahap pencucian DNA.

Preparasi Sampel. Isolat jamur endofit dimasukkan ke tabung *microcentrifuge* 1,5 ml dan disentrifugasi selama 10 menit pada 5.000 rpm, kemudian buang *supernatant* lalu *resuspend* pelet dengan *vortex*. 200 U *lyticase* atau *zymolase* ditambahkan dan diinkubasi

pada 30°C selama 30 menit. Hasil yang didapat disentrifugasi kembali selama 10 menit pada 2.000 rpm untuk memanen *spheroplast*.

Proses Lisis. Sel Lysis Buffer ditambahkan sebanyak 300 ml kemudian resuspend pelet sel dengan pipet dan dinkubasi pada 60°C selama setidaknya 10 menit untuk memastikan sampel benar-benar jelas. Selama inkubasi, tabung dibalikkan setiap 3 menit, Setelah diinkubasi 60°C, 5 µl RNase A ditambahkan (50 mg/ml) ke dalam sampel lisis yang jelas lalu dicampurkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit.

Eliminasi Protein. Protein Removal Buffer ditambahkan 100 ml ke dalam sampel yang telah lisis kemudian di vortex segera selama 10 detik dan disentrifuge pada 14-16,000 x g selama 3 menit untuk membentuk pellet protein yang ketat dan putih. Jika pelet tidak ketat maka inkubasi kembali diatas es selama 5 menit diikuti dengan sentrifugasi pada 14-16,000 x g selama 3 menit lagi.

Pengendapan DNA. Supernatan dari Langkah sebelumnya dimasukkan ke tabung mikrosentrifuge 1,5 ml baru. 300 µl isopropanol ditambahkan dan diaduk rata dengan cara membalik tabung sebanyak 20 kali. Hasil yang didapat disentrifuge pada 14-16,000 x g selama 5 menit. Supernatan dilepaskan secara hati-hati dan ditambahkan 300 µl etanol 70% untuk mencuci pelet.

Sentrifuge kembali pada 14-16,000 x g selama 3 menit dan lalu supernatan dibuang dan pellet dikeringkan dengan vakum sentrifuge selama 10 menit.

Rehidrasi DNA. 50-100 ml *DNA Hydration Buffer* ditambahkan dan diinkubasi pada 60°C selama 10 menit untuk melarutkan pelet DNA dan mengetuk bagian bawah tabung selama inkubasi untuk meningkatkan rehidrasi DNA.

Amplifikasi dengan PCR

DNA template diamplifikasi dengan menggunakan *MyTaq Red Mix (Bioline)*. Amplifikasi ITS rRNA dilakukan dengan primer universal ITS1 dan ITS4 rRNA dengan optimasi kondisi PCR (Tabel 1).

Tabel.1 Optimasi kondisi PCR

Tahapan	Suhu	Waktu	Siklus
Pre-denaturasi	95°C	3 menit	1
Denaturasi	95°C	10 detik	35
Annealing	52°C	30 detik	
Ekstensi	72°C	45 detik	
Final Ekstensi	4°C	∞	1

Elektroforesis Hasil PCR

Produk PCR kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis menggunakan 1% (b/v) gel agarosa, yang diwarnai dengan etidium bromida dan divisualisasikan menggunakan sinar UV. Produk PCR sebanyak 3 µl ditambahkan kedalam sumur gel agarosa. Sedangkan marker sebanyak 0,5 µl ditambahkan 0,5 µl *Loading Dye Fermentase*

dan 2 µl mili-Q dicampur dan kemudian dimasukkan kedalam sumur yang berbeda. Proses elektroforesis dilakukan selama 60 menit dengan voltase 100 V dalam larutan buffer TBE. Hasil elektroforesis divisualisasikan pada sinar UV untuk melihat pita DNA hasil amplifikasi PCR.

Konstruksi Pohon Filogenetik

Jamur endofit yang telah berhasil diamplifikasi gen ITS rRNA dapat dilihat kekerabatannya dengan prokariot lain yang ada dibasis data berdasarkan sekuens gen ITS rRNA-nya. Pensejajaran sekuen dilakukan dengan menggunakan program DNA MAN v7.0. Selanjutnya hasil pensejajaran dianalisis menggunakan program BLAST pada situs NCBI untuk mengetahui jenis spesies isolat jamur endofit tersebut. Rekonstruksi pohon filogenetik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah benar tanaman Bawang Rambut dengan nama latin *Allium chinense* G. Don. Hal ini dilakukan sebagai pemastian bahwa tanaman yang digunakan sesuai dengan yang diharapkan.

Isolasi jamur endofit dilakukan dengan menggunakan media PDA. Media PDA digunakan sebagai sumber nutrisi yang baik

untuk pertumbuhan jamur. Media PDA mudah didapat, mudah dibuat dan harganya murah. Media PDA dibuat berdasarkan prosedur yang tertera pada kemasannya. Dimana sebanyak 39 gram PDA dilarutkan dalam 1000 ml aquades. Media tersebut dicampur sampai merata dengan cara pengadukkan dan pemanasan menggunakan *hotplate* dan *stirrer*.

Media PDA yang telah dibuat, kemudian ditambahkan antibiotik kloramfenikol 5 mg/mg. Penambahan antibiotik dimaksud untuk menghindari kontaminasi bakteri. Selanjutnya media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit.

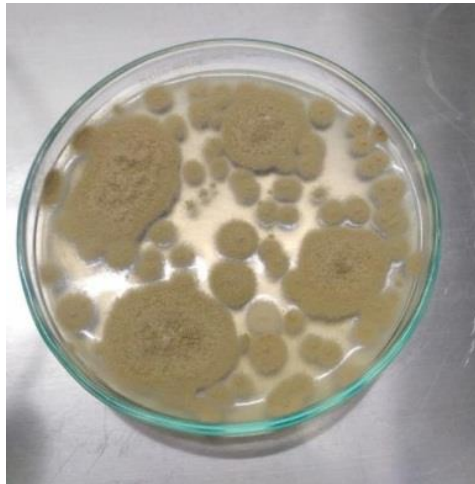
Isolasi jamur endofit dari tanaman bawang rambut dilakukan dengan menggunakan potongan atau irisan bagian umbi bawang rambut. Hasil isolasi jamur endofit bawang rambut (*Allium Chinense* G.Don) diperoleh setelah diinkubasi selama 2 minggu. Pengamatan dilakukan setiap hari. Setiap koloni yang tumbuh dipindahkan ke media PDA yang baru hingga diperoleh isolat jamur endofit murni (*single* koloni). Dari hasil isolasi didapatkan satu isolat murni jamur endofit dari umbi bawang rambut (*Allium Chinense* G.Don) berwarna coklat.

Hasil Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis Isolat Jamur Endofit Dari

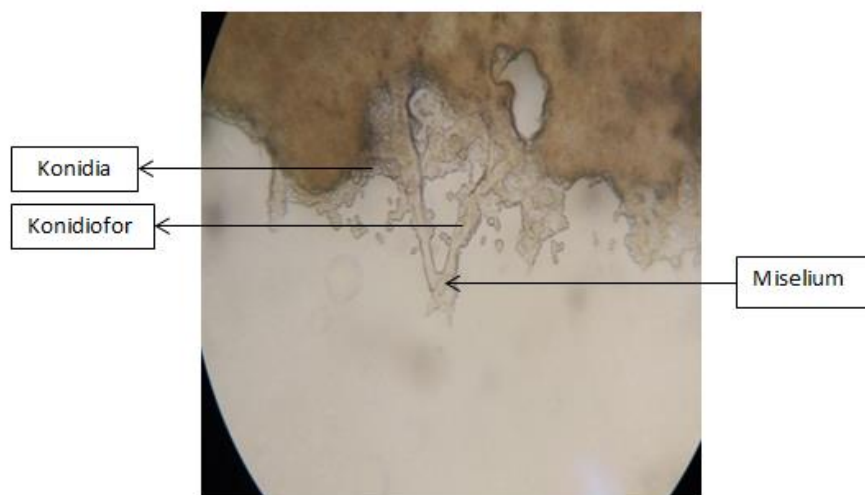
Umbi Bawang Rambut (*Allium chinense* G. Don)

Hasil pemeriksaan isolat jamur endofit dari umbi bawang rambut (*Allium chinense* G.

Don) secara makroskopis dan mikroskopis dapat dilihat pada gambar 1 dan gambar 2.



Gambar 1. Gambaran Makroskopis



Gambar 2. Mikroskopis

Berdasarkan hasil pengamatan yang telah dilakukan, dengan melihat ciri makroskopis dan mikroskopis dan mengacu pada buku petunjuk klasifikasi menurut Barnett (1972). Gambaran makroskopis menunjukkan kumpulan hifa dengan serbuk spora di atasnya yang berwarna kuning kecoklatan. Gambaran

secara mikroskopis menunjukkan terdapat miselium bercabang dan terdapat konidiofor panjang yang bersepta. Konidia bulat seperti telur terdiri atas 1 sel dan tumbuh berantai (Gambar 2). Berdasarkan ciri mikroskopis seperti yang dijelaskan di atas, dan setelah dibandingkan dengan buku petunjuk

klasifikasi menurut Barnet (1972), maka dapat diketahui bahwa isolat jamur endofit umbi bawang rambut termasuk famili *Trichocomaceae*, genus *Byssoschlamys*.

Hasil Identifikasi Molekuler Jamur Endofit Pada Tanaman Bawang Rambut (*Allium chinense* G. Don)

Analisis data dilakukan secara deskriptif kualitatif. Hasil isolasi gDNA diidentifikasi konsentrasinya dengan mengukur pada panjang gelombang 260 dan 280 nm, hasilnya seperti pada tabel 2. gDNA merupakan DNA total di inti sel dan mitokondria.

Tabel.2 Hasil Pengukuran Konsentrasi gDNA pada panjang gelombang 260 dan 280 nm

Nama Sampel	Panjang Gelombang (A)		Konsentrasi ng/ul
	260/280	260/230	
UBR_H	1,90	1,68	75,7

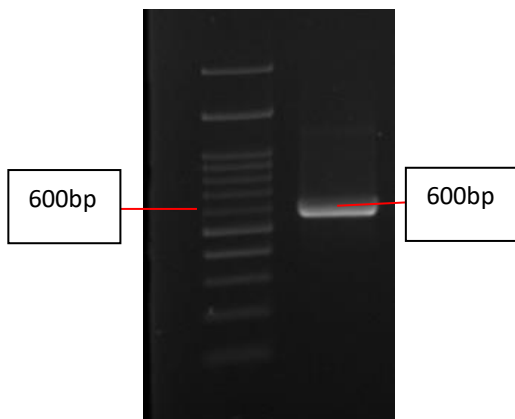
Kemurnian gDNA dapat dilihat dari rasio absorbansi gDNA (A260/A280) dimana kemurnian gDNA yang diperoleh dari penelitian ini adalah untuk UBR_H adalah 1,90 yang menurut Sambrook *et al* (1989) hasil isolasi gDNA dikatakan murni apabila nilai rasio pada A260/A280 antara 1,80-2,00. Pada penelitian ini didapatkan konsentrasi gDNA hasil ekstraksi adalah 75,7 ng/ul. Hasil kuantitas gDNA menunjukkan bahwa nilai kemurnian pada sampel berbeda dan tingkat

konsentrasi gDNA yang diperoleh berbeda-beda pula. Hal ini mengakibatkan ketebalan pita yang beragam. Perbedaan konsentrasi DNA yang diperoleh pada sampel dapat ditentukan oleh perlakuan fisik yang diberikan serta kemampuan *buffer* ekstraksi dalam memecah sel. Proses perusakan sel dengan penggerusan sampel yang sempurna dapat mempermudah *buffer* ekstraksi dalam memecah sel. Disamping itu *buffer* ekstraksi yang digunakan dapat menentukan konsentrasi gDNA yang dihasilkan.

Hasil Amplifikasi gDNA Dengan Teknik PCR

Penelitian ini memiliki nilai konsentrasi gDNA yang didapatkan cukup baik yakni 75,7 ng/ul. sedangkan menurut Wilkerson *et al.* (1993) bahwa konsentrasi (C) yang baik untuk PCR berkisar 50 ng/ul sehingga sampel UBR_H (Tabel 2) dapat digunakan proses PCR. Proses PCR pada penelitian ini menggunakan Kit KOD dan 1 buah penanda. Keseluruhan komponen PCR tersebut kemudian diamplifikasikan berdasarkan siklus yang disesuaikan. Kemudian dielektroforesis dengan gel agarose pada konsentrasi 1 %. Elektroforesis hasil PCR dapat dilihat pada (Gambar 3). Hasil proses PCR isolasi genom pada sampel UBR_H berhasil diamplifikasi. Isolat gDNA dikatakan murni bila nilainya berkisar 1,8-2,0 dan telah memenuhi

persyaratan yang telah dilakukan dalam analisis molekuler (Sambrook *et al.*, 1989). Hasil yang ditampilkan dengan menggunakan sinar UV menunjukkan pita yang terlihat jelas dengan ukuran 600 bp, sehingga masuk dalam persyaratan dan isolat gDNA yang dikatakan murni.



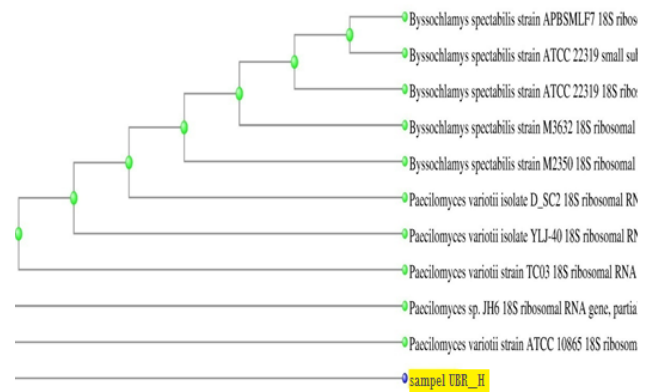
Gambar 3. Hasil Elektroforesis sampel UBR_H diperoleh pita 600 bp

Analisis Hasil Sequencing Dan Konstruksi Pohon Filogenetik

Sekuensing dilakukan dengan mengirimkan produk PCR ke 1st Base Malaysia dan hasilnya dianalisis dengan program DNA MAN v7.0. untuk mengetahui kekerabatan genom suatu spesies sampel isolat jamur endofit potensial dianalisa lebih lanjut dengan program BLAST yang ada pada data base di www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast Berikut adalah hasil analisa Blast dari sample UBR_H

Berdasarkan hasil persentase kemiripan pada program BLAST yang diakses melalui situs www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast diperoleh persentase 99% menunjukkan bahwa isolat

jamur endofit yang didapat adalah *Byssoschlamys spectabillis*.



Gambar 4. Hasil Analisis Pohon Filogenetik UBR_H

Genus *Byssoschlamys* merupakan jamur yang tahan panas, dapat tumbuh pada daerah dataran tinggi yang memiliki kadar oksigen rendah (Hoff *et al.*, 2004). Penelitian terkait bioaktivitas spesies *Byssoschlamys spectabillis* ini pernah dilaporkan memiliki potensi sebagai antibakteri dengan nilai kadar hambat minimum sebesar 0,5 mg/mL terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Khiralla *et al.*, 2016).

KESIMPULAN

Jamur endofit yang berhasil diisolasi dan diidentifikasi secara molekuler dari umbi bawang rambut (*Allium chinense* G. Don) adalah spesies *Byssoschlamys spectabillis*. Dari hasil penelitian ini sedang dilanjutkan ketahap uji aktivitas dan isolasi metabolit sekunder.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih peneliti kepada Kemennristekdikti dengan nomor kontrak 7/E/KPT/2019 yang telah mendanai penelitian ini melalui skim penelitian dosen pemula pendanaan tahun 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Barnet, H. L. and Hunter, B. B. 1972. The Fungal Host – Parasite Relationship. Ann. Rev. Phytopathologi. 126pp.
- Hoff, J. A., N. B. Klopfenstein., G. I. McDonald., J. R. Tonn., M.-S. Kim., P. J. Zambino., P. F. Hessburg., J. D. Rogers., T. L. Peever2 & L. M. Carris. 2004. Fungal endophytes in woody roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). *Journal of Forestry Sciences Laboratory*, ISSN 1437–4781.
- Khiralla, A. *et al.* 2016. Endophytic fungi associated with Sudanese medicinal plants show cytotoxic and antibiotic potential. *FEMS Microbiology Letters*, 363(11), pp. 1–8.
- Radji, M, Sumiati, A., Rachmayani, R., Elya B. 2011. Isolation of fungal endophytes from *Garcinia mangostana* and their antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology*. 10(1): 103-107.
- Sambrook, J., Russell, D. W. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd edition. New York: Laboratory Pr.
- Naibaho, F. G., Bintang, M., Pasaribu, F. H. 2015. Antimicrobial activity *Allium chinense* G. Don. *Current Biochemistry*. 2(3): 129 – 138.
- NCBI. 2019. Basic Local Alignment Tool. [Online]. Available at: www.ncbi.nlm.nih.gov/ [Accessed 20 Agustus 2019].
- Yu, Z., Zhang, T., Zhou, F., Xiao, X., Ding, X., He, H., Rang, J., Quan, M., Wang, T., Zuo, M. and Xia, L. 2015. Anticancer Activity of Saponins from *Allium chinense* against the B16 Melanoma and 4T1 Breast Carcinoma Cell. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Volume 2015: 1 – 12.
- Zhi-Hong, Y., Zi-Fei, Q., Yi, D., Xin-Sheng, Y. 2016. Phytochemistry and pharmacology of *Allii Macrostemonis Bulbus*, a traditional Chinese medicine [J]. *Chinese Journal Natural Medicines*. 14(7): 481-498.