

Potensi antibakteri jamur *Aspergillus nomius* yang disolasi dari alga hijau *Bornetella* sp.

(Antibacterial potential of marine fungus *Aspergillus nomius* isolated from green algae *Bornetella* sp)

Deiske A. Sumilat^{1*} dan Rosita A.J. Lintang¹

¹ Faculty of Fishery and Marine Science, University of Sam Ratulangi Manado 95115

*Email: deiske.sumilat@unsrat.ac.id

Abstract

Isolation of marine fungi symbiont of green algae *Bornetella* sp as a producer of antibacterial compounds has been carried out. This study aims to obtain symbiont fungi from green algae *Bornetella* sp which produces antibacterial compounds. The symbiont fungus was isolated using the direct planting method. Screening for the antibacterial activity of pure symbiont fungi isolates against *Escherischia coli* and *Staphylococcus aureus*, and was carried out by the agar diffusion method. The isolation results obtained 4 isolates, but the one with the most potential to inhibit the growth of the tested bacteria was MFALM2. Molecular characterization showed that the MFALM2 isolate was identified as *Aspergillus nomius* with a 100% closeness level.

Keywords: isolation; marine fungi; *Aspergillus nomius*; green alga; *Bornetella* sp.

Abstrak

Isolasi jamur laut yang bersimbion dengan alga hijau *Bornetella* sp sebagai penghasil senyawa antibakteri telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh jamur simbiosis dari alga hijau *Bornetella* sp yang menghasilkan senyawa antibakteri. Isolasi jamur simbiosis dilakukan dengan metode *direct planting*. Skrining aktivitas antibakteri isolat murni jamur simbiosis terhadap bakteri uji *Escherischia coli* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan metode difusi agar. Hasil isolasi diperoleh 4 isolat, namun yang paling berpotensi menghambat pertumbuhan bakteri uji adalah MFALM2. Karakterisasi molekuler menunjukkan bahwa isolat MFALM2 teridentifikasi sebagai *Aspergillus nomius* dengan tingkat kecermatan sebesar 100%.

Kata kunci: isolasi; jamur laut; *Aspergillus nomius*; alga hijau; *Bornetella* sp.

PENDAHULUAN

Jamur endofit yang berasal dari laut hidup di jaringan internal tanpa menimbulkan efek negatif pada inangnya telah terbukti menjadi sumber produk alami bioaktif yang produktif dengan struktur unik dan aktivitas farmasi yang kuat (Deshmukh et al., 2018; Artasasta et al., 2019; Mongi et al., 2020; Sumilat et al., 2020). Jamur dapat ditemukan di hampir setiap habitat laut (Raghukumar, 2017), termasuk tanaman laut (alga, kayu apung, dan tanaman bakau), avertebrata laut (spons, karang, ascidia, dan holothuria), dan vertebrata (terutama ikan). Jamur yang berasal dari alga muncul sebagai sumber metabolit sekunder bioaktif baru yang menjanjikan untuk bioprospeksi laut.

Genus *Aspergillus* telah menjadi sumber metabolit sekunder yang memiliki daya hambat aktivitas terhadap bakteri patogen (Caroll et al., 2020), Genus *Aspergillus* banyak disolasi dari alga, jamur *Aspergillus oryzae*, diisolasi dari alga merah *Heterosiphonia japonica* aktif menghambat pertumbuhan terhadap *Escherichia coli* (Ming, et al., 2010), *Aspergillus nidulans* EN-330 dari alga merah *Polysiphonia scopulorum* var. *villum*, menunjukkan aktivitas terhadap *E. tarda* dan *Vibrio anguillarum*, *E. coli* dan *Staphylococcus aureus* (Zhang, et al., 2015), *Aspergillus sydowii* EN-534 dari alga merah *Laurencia okamurai* juga menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *E. ictaluri*, *V. alginolyticus* dan *V.*

parahaemolyticus (Yang, et al., 2018), dari spesies *L. okamurai* diisolasi *Aspergillus terreus* EN-539 menghambat pertumbuhan bakteri *M. luteus* dan *S. aureus* dan sebagai inhibitor influenza (Hong, et al., 2019).

Perairan Sulawesi Utara menjadi habitat banyak spesies karang, ikan, reptil, mamalia laut, alga laut dan avertebrata laut seperti moluska, spons, dan ascidia. Pantai Malalayang, Manado merupakan salah satu perairan di Sulawesi Utara yang berhadapan langsung dengan daerah Taman laut Bunaken, memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi. Salah satu biota yang memiliki potensi untuk diteliti adalah alga laut termasuk jamur yang bersimbion dengan alga. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh jamur simbion dari alga hijau *Bornetella* sp.

yang memiliki potensi bioaktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus*.

METODE PENELITIAN

Persiapan sampel

Alga hijau *Bornetella* sp. dikumpulkan dengan melakukan snorkeling di Pantai Malalayang, Manado, Sulawesi Utara (Gambar 1). Alga hijau dibilas menggunakan air laut steril dan direndam dalam etanol 70% selama 60 detik kemudian masukkan ke dalam plastik yang berisi air laut steril (Sumilat, et al., 2020). Sampel selanjutnya dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasetika Laut Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNSRAT, dan simpan dalam lemari pendingin – 20 °C sebelum digunakan.



Gambar 1. Marine alga *Bornetella* sp. Malalayang, collected from Manado, North Sulawesi, Indonesia

Isolasi Jamur Endofitik

Alga hijau *Bornetella* sp. dipotong-potong kecil dan dicuci dengan air laut steril, dan secara aseptik diletakkan di petridish yang mengandung media PDA [PDA (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)]. Petridish diinkubasi pada suhu 25°C – 27°C selama 6 – 7 hari. Koloni yang terbentuk dan menunjukkan bentuk berbeda dengan yang lain dianggap sebagai isolat yang berbeda. Koloni yang bertumbuh selanjutnya ditanam kembali pada media yang baru sampai mendapatkan isolat tunggal yang murni (Kjer et al., 2010).

Skrining awal Antibakteri

Skrining awal antibakteri dilakukan untuk mendapatkan isolat yang terindikasi memiliki bioaktivitas antibakteri, menggunakan media cair dan padat B1 dengan komposisi seperti Tabel 1. Bakteri uji *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus* diperoleh dari Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasetika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNSRAT.

Skrining antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar yang dimodifikasi (Kirby and Bauer) berdasarkan panduan “Kirby-

Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol" (Hudzicki, 2009).

Tabel 1. Komposisi media B1

Media B1	Komposisi bahan gr/100 ml					
	Pepton	<i>Meat extract</i>	NaCl	Agar	H ₂ O	Bacteria
Cair	0,5	0,3	0,3	-	100	√
Padat	0,5	0,3	0,3	1,5	100	√

Media cair B1 yang sudah disiapkan, ditambahkan dengan masing-masing bakteri yang sudah dikultur (*S. aureus* dan *E. coli*) sebanyak 100 µL, kemudian tuangkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda secara aseptik dan dimasukkan ke dalam inkubator selama 1x24 jam pada suhu 37 °C. Media agar B1 yang sudah diautoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, kemudian dinginkan sampai suhu 40 °C dan tambahkan 100 µL bakteri, dikocok perlahan dan tuang ke petridish sampai media agar B1 mengeras. Letakkan agar blok dari isolat jamur ukuran diameter 6 mm ke dalam cawan petri bersama dengan kertas cakram sebagai kontrol positif dan negatif, lalu diinkubasi selama 1x24 jam (Ortez, 2005). Setelah 1x24 jam masa inkubasi, dilakukan pengamatan pada setiap petridish dan zona bening yang muncul di sekitar isolat menunjukkan kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji. Adanya zona bening yang terbentuk pada isolat jamur ditandai dengan tanda positif (+) dan sebaliknya yang tidak ada zona bening ditandai dengan negatif (-). Isolat jamur yang memiliki bioaktivitas antibakteri, selanjutnya ditentukan spesiesnya secara molekuler DNA.

Identifikasi Molekuler DNA

Identifikasi isolat dilakukan di Laboratorium Genetika Science Jakarta. Ekstraksi DNA dari isolat jamur dilakukan dengan menggunakan Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, D6005). Penanda molekuler yang digunakan adalah ITS 1 dan ITS 4. Untuk memperjelas fragmen ITS 1 dan ITS 4 dari setiap isolat dilakukan amplifikasi

PCR menggunakan MyTaq HS Red Mix (Bioline, BIO-25047). Produk PCR dimurnikan menggunakan Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, D4001) dan dikirim ke penyedia layanan pengurutan FIRST BASE Malaysia. Hasil sequencing diproses mengikuti prosedur BLAST (Basic Search Alignment Search Tool) di NCBI (National Center for Biothecnology Information; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), dan BOLD (Barcode of Life Data System <http://www.boldsystems.org/>), dan MycoBank (<http://mycobank.org>) untuk identifikasi spesies.

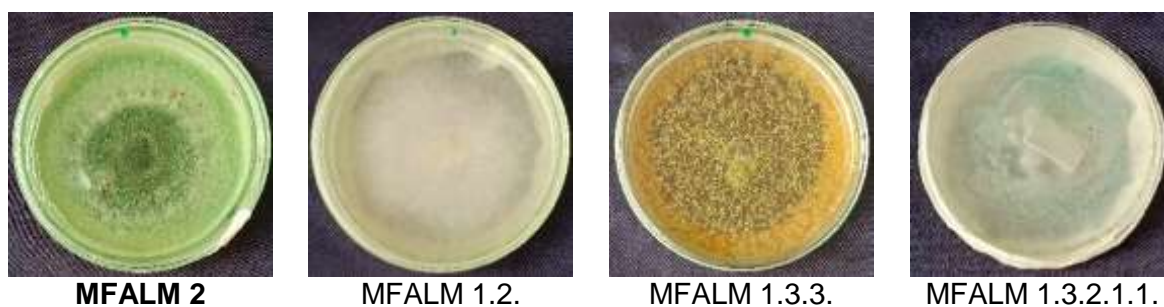
HASIL DAN DISKUSI

Jamur yang diisolasi dan dipurifikasi dari alga hijau *Bornetella* sp. terdiri dari 4, dengan kode isolat yaitu: MFALM 1.2., MFALM 2, MFALM 1.3.3., MFALM 1.3.2.1.1. (Gambar 2).

Berdasarkan skrining awal secara kualitatif Strain MFALM 2 memperlihatkan kemampuan menghambat pertumbuhan kedua bakteri uji *S. aureus* dan *E. coli* (Tabel 2).

Hasil identifikasi DNA Strain MFALM2

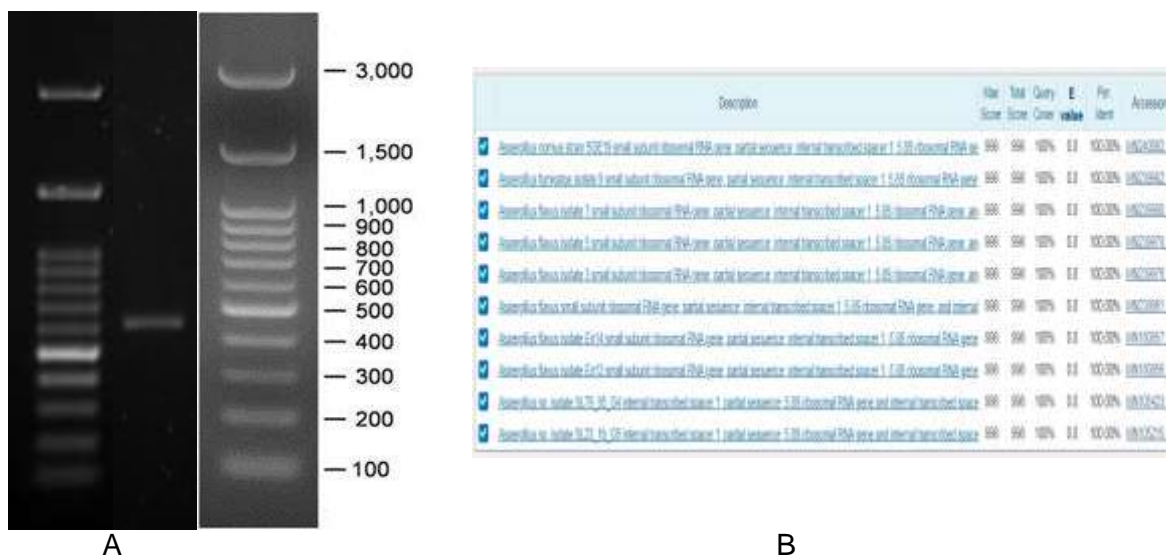
Untuk menentukan jenisnya maka strain MFALM 2 dilanjutkan dengan analisis DNA. Gambar 3 memperlihatkan elektrogram hasil amplifikasi PCR Strain MFALM 2 dengan panjang fragmen 553 pb. Dari hasil pencarian BLAST melalui NCBI-GenBank strain MFALM2 menunjukkan 100% identik dengan *Aspergillus nomius* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN240892.1,MN239982.1,MN239980.1,MN239978.1,M%20N239976.1,MN238861.1,MN180857.1,MN180856.1,MN105423.1,MN105215.1>)



Gambar 2. Isolat isolat jamur yang diisolasi dari alga hijau *Bornetella* sp.

Tabel 2. Skrining awal antibakteri isolat jamur

Isolat Jamur	Bakteri Uji	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
MFALM 1.2.	+	-
MFALM 2	+	+
MFALM 1.3.3.	-	-
MFALM 1.3.2.1.1.	+	-
Kontrol + (Kloramfenicol)	+	+
Kontrol -	-	-



Gambar 3. A. Hasil elektroforesis PCR Strain MFALM2 dengan Primer ITS 553 bp dengan penanda 1 kb
 B. Hasil BLAST strain MFLAM 2 melalui NCBI-GenBank

Aspergillus nomius adalah salah satu spesies jamur dalam genus *Aspergillus*. *A. nomius* berbentuk konidia berwarna hijau kekuningan, biseriata dan radiate,

seringkali membelah menjadi beberapa kolom secara makroskopis. Konidia berbentuk bulat hingga subglobose, echinulate dan berdiameter 4 - 6 µm

(Manikandan, et al., 2009.). *A. nomius* merupakan jamur yang hidup di hampir semua jenis substrat, penyebarannya kosmopolitan, dan merupakan jamur saprofit dan patogen. (Manikandan, et al., 2009; Tam, et al, 2014).

Berdasarkan skrining awal yang telah dilakukan, *A. nomius* juga merupakan spesies jamur yang memiliki potensi antimikroba. Artasasta et al., (2019). melaporkan adanya aktivitas sitotoksik dan antibakteri dari *A. nomius* Nc06 yang diisolasi dari spons laut, dalam penelitiannya beberapa jenis bakteri Gram negatif digunakan sebagai bakteri uji yaitu *Salmonella typhosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli*, dan bakteri gram positif *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus mutans*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*. Bersama dengan genus *Aspergillus* lainnya yakni *A. flavus* dan *A. parasiticus*, *A. nomius* diketahui dapat menghasilkan senyawa Aflatoxin yang merupakan racun yang dapat mengkontaminasi makanan (Shukla, et al., 2016). Dalam penelitiannya terhadap spons *Hyatella cribriformis* yang dikoleksi dari India, Meenupriya dan Thangaraj (2012) mengisolasi dan mengidentifikasi jamur *A. flavus*, *A. melleus*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. nomius*, *A. ochraceus*. Jamur *A. nomius* MV4 ditemukan memiliki aktivitas antibakteri lebih kuat terhadap tiga pelarut dengan berbagai polaritas (Butanol, Kloroform, Etil Asetat). Dari beberapa hasil penelitian di atas terhadap jamur *A. nomius*, ditemukan jamur ini memiliki aktivitas antibakteri yang kuat seperti skrining awal dari Strain MFALM 2 yang memperlihatkan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Namun demikian secara keseluruhan informasi tentang metabolit sekunder dari *A. nomius* yang diisolasi dari alga masih sangat kurang.

KESIMPULAN

Jamur endofit strain MFALM2 yang diisolasi dari alga hijau *Bornetella* sp. memiliki potensi bioaktif terhadap beberapa

mikroba patogen *S. aureus* dan *E. coli*. Karakterisasi molekuler DNA menunjukkan bahwa strain MFALM2 adalah *A. nomius*. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk menentukan senyawa bioaktif yang memiliki peran dalam menghambat pertumbuhan mikroba pathogen.

DAFTAR PUSTAKA

- Artasasta, MA., Yanwirasti, Taher M., Djamaan A., Handayani D. 2019. Cytotoxic and antibacterial activities of marine sponge-derived fungus *Aspergillus nomius* Nc06. *Rasayan J. Chem.*, 12(3): 1463-1469.
- Caroll AR., Copp BR., Davis RA., Keyzers RA., Prinsep MR. 2020. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* <https://doi.org/10.1039/C9NP00069K>
- Deshmukh SK., Prakash V., Ranjan N. 2018. Marine fungi: a source of potential anticancer compounds. *Front. Microb.*, 8: 2536. 10.3389/fmicb.2017.02536.
- Hong-Lei Li, Xiao-Ming Li, Xin Li, Sui-Qun Yang, Bin-Gui Wang. 2019. Structure, absolute conformation and biological evaluation of polyoxygenated meroterpenoids from the marine algal-derived *Aspergillus terreus* EN-539. *Phytochemistry Lett.*, 32: 138-142.
- Hudzicki, J. 2009. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American Society for Microbiology.* 23 hal.
- Kjer J., Debbab A., Aly AH., Proksch P. 2010. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nat. Protoc.*, 5: 479-490. 10.1038/nprot.2009.233
- Manikandan P., Varga J., Kocsube S., Samson RA., Anita R., Revathi R., Doczi I., Nemeth TM., Narendran V., Vagvolgyi C., Manoharan C., Kredics L. 2009. Mycotic keratitis due to *Aspergillus nomius*. *J. Clin. Microbiol.*, 47:3382-3385.
- Meenupriya J., Thangaraj M. 2012.

- Bioprospecting of potent fungal strains from marine sponge *Hyatella cribriformis* from Gulf of Mannar Coast. International Conference on Bioscience, Biotechnology and Healthcare Sciences (ICBBS'2012) December 14-15, 2012 Singapore.
- Mongi AWW.S., Sumilat DA., Losung F., Mangindaan REP., Lintang RAJ., Undap SL. 2020. Bioaktivitas jamur *Aspergillus flavus* yang bersimbion dengan ascidian *Eudistoma* sp. Jurnal Pesisir dan Laut Tropis 8 (2): 21-26.
- Ortez, J.H. 2005. Disk diffusion testing in manual of antimicrobial susceptibility testing. Marie B. Coyle (Coord. Ed). American society for Microbiology.
- Raghukumar S. 2017. Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems. Springer International Publishing AG. 378 pp.
- Shukla S., Kim D-H., Chung SH., Kim M. 2016. Occurrence of aflatoxins in fermented food products (chapter 28) In: Fermented foods in health and disease prevention. Edited by Frias J, Martinez-Villaluenga C and Peñas E. Academic Press: 653-674
- Sumilat DA., Ginting EL., Pollo, GAV., Adam AA, Tallei TE. 2020. Antimicrobial Activities of *Rhopalaea*-Associated Fungus *Aspergillus flavus* Strain MFABU9. Pakistan Journal of Biological Science. 23 (7): 911-916. doi:10.3923/pjbs.2020.911.916
- Tam EWT., Chen JHK., Lau ECL., Ngan AHY., Fung KSC., Kim CL., Ching WL., Kwok, YY, Lau SKP., Woo PCY. 2014. Misidentification of *Aspergillus nomius* and *Aspergillus tamaris* as *Aspergillus flavus*: Characterization by Internal Transcribed Spacer, β -Tubulin, and Calmodulin Gene Sequencing, Metabolic Fingerprinting, and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. Journal of Clinical Microbiology, 52(4): 1153–1160.
- Yang SQ., Xiao-Ming Li, Xin Li, Hong-Lei Li, Ling-Hong Meng, Bin-Gui Wang. 2018. New citrinin analogues produced by co-culture of the marine algal-derived endophytic fungal strains *Aspergillus sydowii* EN-534 and *Penicillium citrinum* EN-535. Phytochemistry Lett., 25: 191-195.
- Zhang P, Xiao-Ming Li, Xin Li, Bin-Gui Wang. 2015. New indole-diterpenoids from the algal-associated fungus *Aspergillus nidulans*. Phytochemistry Lett., 12: 182-185.