

Isolasi Dan Karakterisasi Fungi Endofit Dari biji Kopi Robusta (*Coffea canephora* L.) dengan sekuen gen 18S Rrna

Aulia¹, Rusman²

^{1,2}Fakultas MIPA Universitas Islam Makassar, Makassar. Indonesia

Auliasinta2959@gmail.com

ABSTRAK

Biji kopi robusta (*Coffea canephora* L) memiliki senyawa kimia diantaranya asam klorogenat yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme, fungi endofit merupakan mikroorganisme penting dan sumber senyawa bioaktif baru memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa bioaktif yang sama dengan tanaman inangnya. Tujuan penelitian untuk mengetahui karakterisasi isolat fungi endofit dari biji kopi robusta (*Coffea canephora* L.) dengan sekuen gen 18SrRNA. Penelitian ini dilakukan dengan cara mengisolasi fungi endofit biji kopi robusta menggunakan metode tanam langsung pada medium *Potato Dextrosa Agar* dan diuji aktivitas untuk mengetahui potensi isolat yang aktif. Identifikasi makroskopik dilakukan dengan melihat langsung bentuk koloni, tepi warna dan bentuk permukaan. Isolat yang diperoleh digunakan untuk proses fermentasi dengan menggunakan media *Potato Dextrosa Broth*, diperoleh uji aktivitas hasil fermentasi isolat pada *Staphylococcus aureus* (J1-01), (J2-02) adalah 11,2 mm, 17,06 mm dan pada *Escherichia coli* adalah 10,46 mm, 13,00 mm, Isolat fungi endofit dari biji kopi robusta (*Coffea canephora*L) ditemukan jenis J1-01 *Burkholderia cepacia*, J2-02 *fusarium* sp.

Kata Kunci: Isolasi, Fungi Endofit, *Coffea canephora* L.

ABSTRACT

Robusta coffee beans (*Coffea canephora* L.) contain chemical compounds including chlorogenic acid which is able to inhibit the growth of microorganisms, endophytic fungi are important microorganisms and a source of new bioactive compounds which have the ability to produce the same bioactive compounds as their host plants. The aim of the research is to determine the characterization of fungal isolates endophytes from robusta coffee beans (*Coffea canephora* L.) with the 18SrRNA gene sequence. This research was carried out by isolating the endophytic fungi of robusta coffee beans using the direct planting method on Potato Dextrose Agar medium and activity was tested to determine the potential of active isolates. Macroscopic identification is carried out by looking directly at the colony shape, edge color and surface shape. The isolate obtained was used for the fermentation process using Potato Dextrosa Broth media. The activity test obtained from the fermentation results of the isolate on *Staphylococcus aureus* (J1-01), (J2-02) was 11.2 mm, 17.06 mm and on *Escherichia coli* was 10.46 mm, 13.00 mm, Isolates of endophytic fungi from robusta coffee beans (*Coffea canephora*L) were found to be types J1-01 *Burkholderia cepacia*, J2-02 *fusarium* sp.

Keywords: Isolation, Endophytic Fungi, *Coffea canephora* L.

PENDAHULUAN

Antimikroba merupakan senyawa yang dapat menghambat infeksi mikroba pada manusia, sedangkan antibiotik secara garis besar adalah metabolit dari mikroba tertentu yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme, Hampir semua antibiotik merupakan hasil sintesis mikroba. Beberapa antibiotik sudah dibuat secara semisintetik, antara lain senyawa-senyawa penisilin, sefalosforin, tetrasiklin, amikasin, klindamisin, rifamfisid dan dihidrosteptomisin. Kloromfenikol telah dibuat secara sintesis kimia (Rusman, yasnidar, 2020; Setyati et al., 2022).

Fungi endofit merupakan kelompok bakteri yang menguntungkan. Bakteri ini mampu mengendalikan patogen tanaman dan meningkatkan pertumbuhan tanaman melalui senyawa-senyawa bioaktif yang dihasilkannya. Beberapa bakteri endofit diketahui banyak dimanfaatkan di bidang kesehatan

sebagai bahan baku obat seperti antibiotik, antioksidan, antiinflamasi, imunosupresi dan antidiabetes(Ek-Ramos et al., 2013; Hilma et al., 2016; Podgórska-Kryszczuk et al., 2022; Setiawan et al., 2016).

Kopi secara empirik telah digunakan sebagai pengobatan luka oleh masyarakat. Dalam catatan sejarah, kopi digunakan sebagai ramuan kuno untuk mengobati luka karena kopi memiliki kandungan senyawa yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri antara lain asam klorogenat, kafein, trigonolin (Hasanuddin et al., 2021; Rasyid et al., 2022; Rusman, yasnidar, 2020)

Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Hizkia, (2016) dan Yaqin (2015) menyatakan bahwa kopi robusta (*Coffea canephora* L.) mengandung kadar asam klorogenat 6-10% yang memiliki efek antibakteri yang sebanding dengan clindamycin dalam menghambat *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli*.

Berdasarkan uraian diatas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana karakterisasi fungi endofit dari biji Kopi Robusta (*Coffea canephora* L.) dengan sekuen gen 18S rRNA. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui karakterisasi isolat fungi endofit dari biji kopi robusta (*Coffea canephora* L.) dengan sekuen gen 18Sr RNA.

METODE PENELITIAN

Pengambilan Sampel

Sampel biji kopi robusta (*Coffea canephora* L) di ambil diperkebunan biji kopi di daerah rano kabupaten tanah toraja Sulawesi selatan.Sampel berada pada 3^o432.2332 lintang selatan dan 11^o4515.0696 bujur timur.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu Autoklaf (GEA), Cawan petri (Normax), Erlenmeyer (Pirex), Gelas kimia (Iwaki), Jarum ose bulat, Laminar Air Flow (LAF) , Lampu spiritus, oven (B-One), PCR (BioRad), sentrifuge (BioFuge), shaking incubator, Tabung reaksi (pirex), tabung sentrifuge(Pirex) , dan timbangan analitik (ACIS).

Pelarut etanol 70% (Bratachem, Indonesia), NaCl 09% (B-Braun, Indonesia),

dst. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Aquadest (Waterone), Aluminium foil (KlinPak), Etanol 70% (Onemed), Biji kopi robusta (*Coffea canephora* L), Nutrient agar (Millipore), Potato dekstrosa agar (Millipore), Potato dekstrosa broth (Himedia), NaCl, Natrium hipoklorit.

Prosedur Kerja

Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dicuci dengan bersih menggunakan air suling, kemudian alat gelas disterilkan dengan oven pada suhu 160°C selama 2 jam dan untuk alat-alat yang tidak tahan panas dengan suhu 121°C selama 15 menit.

Pembuatan Media

1. Pembuatan Media PDA (Potato Dextrosa Agar)

Medium *Potato Dextrosa Agar* ditimbang sebanyak 3,9 gram kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquadest, dan dipanaskan menggunakan lampu spiritus sampai mendidih dan kelihatan bening kemudian disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C, Medium yang telah mendidih ditunggu hingga keadaan hangat. Medium, selanjutnya dituang dalam cawan petri sebanyak 20 mL.

2. Pembuatan Media NA (Nutrient Agar)

Pembuatan *nutrient agar* dibuat dengan cara menimbang *Nutrient Agar* sebanyak 2,8 gram dan ditambahkan aquadest steril 100 mL dalam Erlenmeyer. Kemudian dipanaskan menggunakan lampu spiritus hingga mendidih dan dihomogenkan lalu disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

3. Pembuatan Medium PDB (*Potato Dextrosa Broth*)

Potato Dextrosa Broth ditimbang sebanyak 7,16 gram dan dilarutkan dalam 250 mL aquadest steril dalam erlenmeyer lalu dipanaskan menggunakan lampu spiritus hingga mendidih dan larut. Kemudian disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

Isolasi Fungi Endofit

Sampel biji kopi robusta (*Coffea Canephora* L) yang diambil dalam

kondisi segar. Sampel direndam dengan etanol 70% selama 30 detik setelah itu direndam dengan natrium hipoklorit 5,23% selama 3-5 menit selanjutnya dicuci dengan aquadest setelah itu dipotong kecil kemudian ditanam langsung di cawan petri berisi medium menggunakan pinset steril lalu di inkubasi pada suhu 27°C selama 4 hari. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap koloni fungi yang tumbuh ditandai dengan adanya fungi yang tumbuh disekitar sampel yang telah ditanam, kemudian dilakukan pemindahan kedalam cawan petri baru yang berisi medium *Potato Dextrosa Agar* menggunakan jarum ose secara aseptis hal ini dilakukan sebanyak tiga kali hingga didapat biakan murni.

Peremajaan Bakteri Uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Peremajaan bakteri uji dilakukan dengan mengambil 1 ose biakan bakteri murni, kemudian digoreskan diatas permukaan medium *Nutrien Agar* miring dalam tabung reaksi. Kemudian dimasukkan dalam incubator pada suhu 37°C.

Uji Aktivitas

Uji aktivitas dilakukan dengan dituangkan 20 mL *Nutrient Agar* dalam cawan petri kemudian ditambahkan 2 mL suspense mikroba uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* ke dalam masing-masing cawan petri lalu ditunggu hingga memadat masukkan sampel fungi endofit yang sudah dipotong kecil, selanjutnya diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C kemudian diamati zona hambat yang terbentuk pada cawan.

Analisis Data

Data yang diperoleh dikumpulkan dan analisis berdasarkan hasil pengukuran zona bening zona hambat

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel. 1. Hasil Pengamatan Makroskopik

Kode Isolat	Gambar koloni	Ciri Makroskopik
-------------	---------------	------------------

J1-01		Warna koloni kuning kecoklatan lama-lama menjadi putih pucat meselium beraturan jika diinkubasi terlalu lama warna berubah menjadi putih krem bergelombang dan licin
J2-02		Warna koloni putih kekuningan, meselium halus, tipis licin dan tidak menyebar.
J3-03		Warna koloni putih pucat lama kelamaan meselium menyebar berwarna putih, halus dan licin.

Tabel 2. Isolasi fungi Endofit

No	Kode Isolat	Biakan Fungi
1	J1-01	Biakan fungi ke-1
2	J2-02	Biakan fungi ke-2

Keterangan:

J1-01 1 : Isolasi Fungi Endofit Biji kopi Ke-1

J2-02 2 : Isolasi Fungi Endofit Biji kopi Ke-2

Tabel. 3. Hasil pengamatan uji aktivitas fungi endofit

Isolat	Bakteri uji	
	<i>StaphylococcusAureus</i>	<i>Eshcerichiacoli</i>
J1-01	+ 11,2 (mm)	+ 10,46 (mm)
J2-02	+ 17,06 (mm)	+ 13 (mm)

Ket:

(+) = ada zona hambat bening

(-) = tidak ada zona hambat bening

Isolasi fungi endofit biji kopi robusta (*Coffea canephora* L) dilakukan dengan metode tanam langsung pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*). Medium PDA mengandung nutrient untuk kehidupan dan pertumbuhan fungi, dimana ekstrak kentang sebagai sumber karbohidrat dan dektrosa sebagai sumber karbon.

Hasil isolasi dari biji kopi robusta (*Coffea canephora* L.) selanjutnya dilakukan pemurnian. Pemurnian bertujuan untuk mendapatkan isolat tunggal dan murni, lalu isolat yang didapat diberi kode J1-01, dan J2-02, sebelum dilakukan pemurnian diamati secara makroskopik dilihat dari warna bentuk tipe permukaan koloni dan tekstur koloni. Fungi endofit yang diperoleh kemudian dilakukan pemurnian untuk memperoleh isolat tunggal berdasarkan pengamatan makroskopik atau perbedaan morfologi koloni (Roni, dkk., 2020).

Blast di NCBI ditemukan bahwa fungi endofit yang di dapatkan digolongkan J1-01 adalah jenis *Burkholderia cepacia*. Jenis *Burkholderia cepacia* merupakan kelompok bakteri gram negatif, tidak dapat membentuk spora, bersifat aerobik, Katalase dan oksidase positif serta mempunyai flagel polar. Suhu optimal pertumbuhan *Burkholderia cepacia* adalah 30-35°C, *Burkholderia cepacia* dinyatakan sebagai bakteri *ubiquitous*. Namun habitat alaminya pada tanah, air dan tumbuhan. Infeksi bakteri ini sering diasosiasikan dengan berbagai masalah kesehatan, diantaranya endokaritis, infeksi luka, infeksi saluran kemih akibat keteter dan bakterimia. Bakteri ini merupakan patogen oportunistis pada pasien dengan kelainan sistem imun, terutama pada pasien *Gramilomatous*. Beberapa kelompok populasi spesifik yang rentan terhadap infeksi bakteri ini antara *Pseudomallei* dan *Burkholderis cepacia* sedikit berbeda, jenis-jenis faktor virulensi yang dimiliki oleh kedua spesies ini hampir sama secara keseluruhan.

Golongan J2-02 yang didapatkan adalah jenis *Fusarium sp.* Jenis *Fusarium sp* merupakan salah satu jenis tular tanah yang mematikan, Karena itu mempunyai strain yang dapat dorman selama 30 tahun sebelum melanjutkan virulensi yang

menginfeksi tanaman Layu fusarium disebabkan oleh jenis *Fusarium sp.* Kasus serangan ini banyak terjadi di daerah rendah. Umumnya, tanaman ini akan layu dan mati dalam tempo waktu 14-90 hari. Resahan air di lahan yang buruk atau lahan yang banyak genangan airnya akan meningkatkan resiko serangan penyakit ini (Rosmana et al., 2013; Samuels et al., 2009; Sholihah et al., 2019).

Fusarium sp membentuk polipeptida yang disebut likomarasmin yaitu suatu toksin yang mengganggu permeabilitas membran plasma tanaman. Selain itu, *Fusarium sp*, juga membentuk senyawa yang lebih sederhana, yaitu asam fusarat dan menghasilkan enzim pektolitik, terutama *pektinmetilsterase* (PME) dan *depolimerase* (DP). PME menghilangkan metil pada rantai pektin menjadi asam pektat. Depolimerase memecah rantai asam pektat menjadi poligalakturonida dengan bermacam-macam berat molekul. Enzim-enzim tersebut memecah bahan pektin yang ada dalam dinding xylem yang kemudian membentuk massa koloidal yang mengandung bahan non pektin yang dapat menyumbat pembuluh. Bekas pembuluh akan menjadi coklat disebabkan karena fenol fenol yang terlepas masuk ke dalam bekas pembuluh. Fenol-fenol oksidase yang dihasilkan tumbuhan inang akan mengalami polimerasi menjadi melanin yang berwarna coklat. Bahan berwarna ini terutama diserap oleh pembuluh xylem yang berlignin yang menyebabkan warna coklat yang khas pada jamur fusarium (Leslie & Summerell, 2006; Samuels et al., 2009)

Kesimpulan

Isolat fungi endofit dari biji kopi robusta (*Coffea canephora* L) ditemukan jenis J1-01 *Burkholderia cepacia*, J2-02 *fusarium sp.* Jenis *Burkholderia cepacia* merupakan kelompok bakteri gram negatif basil, tidak dapat membentuk spora, bersifat aerobik, jenis *Fusarium Sp* J2-02.

DAFTAR PUSTAKA

- Ek-Ramos, M. J., Zhou, W., Valencia, C. U., Antwi, J. B., Kalns, L. L., Morgan, G. D., Kerns, D. L., & Sword, G. A. (2013). Spatial and Temporal Variation in Fungal Endophyte Communities Isolated from Cultivated Cotton (*Gossypium hirsutum*). *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066049>
- Hasanuddin, R., Jasmiadi, J., & Abdillah, N. (2021). The Analysis of the Chlorogenic Acid in the Ethanol Fraction of Robusta Coffee Beans and Its Effect on Glucose Levels in Wistar Rats. *Disease Prevention and Public Health Journal*, 15(2), 118. <https://doi.org/10.12928/dpphj.v15i2.4705>
- Hilma, R., Mukhlisa, S., & Fadli, H. (2016). ANTIBACTERIAL, ANTIFUNGAL AND ANTIDIABETIC ACTIVITIES OF *Dimocarpus longan* FRUIT SKIN EXTRACT. *Prosiding SEMIRATA Bidang MIPA BKS-PTN Wilayah Barat Universitas Sriwijaya*, May, 1943–1952.
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *Fusarium* laboratory workshops - A recent history. *Mycotoxin Research*, 22(2), 73–74. <https://doi.org/10.1007/BF02956766>
- Podgórska-Kryszczuk, I., Solarska, E., & Kordowska-Wiater, M. (2022). Biological Control of *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* and *Fusarium poae* by Antagonistic Yeasts. *Pathogens*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010086>
- Rasyid, H., Bukhari, A., Hasanuddin, R., Alim, N., & Djabir, Y. Y. (2022). *Effect of Sanrego (Lunasia amara Blanco) Stem Extract on Aphrodisiac Activity of Diabetes Mellitus Rats Induced by High-Fat Diet*. 62(09), 4921–4928.
- Rosmana, A., Zulfikar, M., & Fadillah, D. (2013). Identification of a Disease on Cocoa Caused by *Fusarium* in Sulawesi Identifikasi Penyakit oleh *Fusarium* pada Kakao di Sulawesi. *Pelita Perkebunan*, 29(3), 210–219.
- Rusman, yasnidar, R. (2020). *Isolasi Bakteri Rhizosfer Penghasil Antimikroba Tanah Disekitaran Akar*. 1(2), 0–4.
- Samuels, G. J., Lu, B. S., Chaverri, P., Candoussau, F., Fournier, J., & Rossman, A. Y. (2009). *Cyanonectria*, a new genus for *Nectria cyanostoma* and its *Fusarium* anamorph. *Mycological Progress*, 8(1), 49–58. <https://doi.org/10.1007/s11557-008-0577-x>
- Setiawan, M. A., Hasnawati, H., Sernita, S., & Sulistia, L. (2016). Antibacterial Inhibition Test of Endophytic Fungi on Lime Peel (*Citrus aurantifolia*) Against *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*, 3(1), 14–18. <http://jsfkonline.org/index.php/jsfk/article/view/90>

- Setyati, W. A., Arifidyani, A., & Susanto, A. (2022). Aktivitas Antijamur dari Bakteri Sedimen Mangrove Terhadap *Candida albicans* dan *Malassezia furfur*. *Jurnal Kelautan Tropis*, 25(3), 411–420. <https://doi.org/10.14710/jkt.v25i3.15114>
- Sholihah, R. I., Sritamin, M., & Wijaya, I. N. (2019). Identifikasi Jamur *Fusarium solani* yang Berasosiasi dengan Penyakit Busuk Batang pada Tanaman Buah Naga (*Hylocereus* sp.) Di Kecamatan Bangorejo, Kabupaten Banyuwangi. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*, 8(1), 91–102. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/JAT91>