

Jamur **Endofit**

Sumber Senyawa
Terapeutik dan Komersial



ASIH TRIASTUTI

ASIH TRIASTUTI

Jamur
Endofit

Sumber Senyawa
Terapeutik dan Komersial



JAMUR ENDOFIT
Sumber Senyawa Terapeutik dan Komersial

Penulis

Asih Triastuti

Tata Letak

Hanifah Prihastuti

Desain Sampul

M. Ashab Saefullah

15.5 x 23 cm, xiv + 161 hlm.

Cetakan pertama, Mei 2025

ISBN: 978-623-466-646-5

Diterbitkan oleh:

ZAHIR PUBLISHING

Kadisoka RT. 05 RW. 02, Purwomartani,

Kalasan, Sleman, Yogyakarta 55571

e-mail: zahirpublishing@gmail.com

Anggota IKAPI D.I. Yogyakarta

No. 132/DIY/2020

Hak cipta dilindungi oleh undang-undang.

Dilarang mengutip atau memperbanyak
sebagian atau seluruh isi buku ini
tanpa izin tertulis dari penerbit.

KATA PENGANTAR

Perkembangan bahan alam (*natural products*) semakin maju yang meliputi studi tentang penggunaan bahan alam untuk obat, suplemen, kecantikan, bahan baku pertanian, dan bahan makanan. Umumnya bahan alam yang dieksplorasi adalah tanaman karena secara umum lebih mudah dalam penyiapan bahan bakunya. Akan tetapi penelitian dari bahan alam memiliki beberapa keterbatasan, di antaranya: sulit dikembangkan untuk tanaman yang memiliki masa produktif panjang (Ginseng, *Eurycoma*); terkait masalah konservasi lingkungan apabila ternyata tanaman yang akan dikembangkan terlalu banyak dieksploitasi (*Taxus species*); tanaman yang terancam punah/*native* dari suatu daerah tertentu (*Myrmecodia*). Hal ini mendorong para peneliti untuk mencari sumber bahan baku dari mikroorganisme (bakteri atau jamur) sehingga memudahkan dalam hal ketersediaan dan keberlangsungan studi. Saat ini, endofit merupakan salah satu sumber untuk memperoleh senyawa bioaktif yang banyak dikembangkan karena endofit bisa diperoleh dan ditumbuhkan secara relatif mudah dan terbukti memiliki berbagai jenis aktivitas farmakologi.

Dalam buku ini akan dijelaskan mengenai hal-hal mendasar mengenai jamur endofit seperti klasifikasi dan contoh spesies jamur, media, dan beberapa istilah terkait dengan perkembangbiakan jamur. Selanjutnya akan dibahas khusus mengenai endofit, definisi, isolasi, dan perannya dalam kehidupan manusia. Istilah endofit di sini berarti mengacu kepada jamur endofit. Metode ekstraksi metabolit sekunder dari jamur endofit berikut penelitian terbaru yang melibatkan metabolomik akan dipaparkan sesudahnya. Buku ini dapat digunakan sebagai referensi untuk beberapa mata kuliah seperti Farmakognosi, Kimia Bahan alam dan Penemuan Obat, serta Bioteknologi Farmasi.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Mohamed Haddad, Dr. Marieke Vansteelandt, dan Dr. Nicolas Fabre yang telah mengenalkan dunia jamur endofit sewaktu mengambil studi doktoral di Perancis. Terima kasih kepada Dr. Ahamad Fathoni beserta tim dari Pusat Riset Mikrobiologi Terapan BRIN, Dr. Linda Sukmarini, Dr. Amila Pramisandi, dan Muhammad Ilyas, M.Sc. dari Pusat Riset Biosistematika dan Evolusi BRIN. Semoga kolaborasi tentang jamur endofit akan terus berjalan dan semakin maju. Terima kasih juga penulis ucapkan kepada Jurusan Farmasi Universitas Islam Indonesia yang telah memberikan dukungan untuk penulisan buku ini.

Yogyakarta, 17 April 2025

Penulis



Teruntuk tiga penjaga hati Memes:

Ebes Bustom

Putraku Abraham

Putriku Fatima



DAFTAR ISI

Kata Pengantar	iii
Daftar Isi.....	vii
Daftar Gambar.....	x
Daftar Tabel	xiv
Selayang Pandang Endofit	1
A. Definisi dan Sejarah Keberadaan Endofit	1
B. Peranan Endofit.....	5
C. Klasifikasi Endofit	6
Bagaimana Jamur Endofit dan Tanaman Inang Berinteraksi?.....	13
A. Mekanisme Interaksi Endofit dan Tanaman Inang	13
B. Spesifitas Endofit dan Tanaman Inang.....	15
Jamur Endofit Sebagai Sumber Metabolit Sekunder.....	21
Aplikasi Endofit	35
A. Aplikasi Endofit dalam Bidang Kesehatan.....	35
B. Aplikasi Endofit dalam Bidang Pertanian.....	48
C. Aplikasi Endofit dalam Bidang Industri	50
D. Aplikasi Endofit dalam Pengelolaan Lingkungan	52
Isolasi, Identifikasi, dan Preservasi Endofit	53
A. Isolasi Endofit	53
B. Identifikasi Endofit.....	59
C. Preservasi Endofit	77
Fermentasi Endofit	79
A. Tujuan Fermentasi	79
B. Fase Pertumbuhan Jamur.....	79

C. Media Pertumbuhan Jamur.....	81
D. Prosedur Umum Penyiapan Media	83
E. Optimasi Kultur Endofit dengan Penggunaan Media yang Berbeda	84
F. Fermentasi Cair	86
Ekstraksi dan Identifikasi Metabolit Sekunder dari Jamur Endofit.....	89
A. Metode Ekstraksi Konvensional.....	89
B. Metode Ekstraksi Modern.....	91
C. Identifikasi Metabolit dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	92
D. Identifikasi Metabolit dengan LC-MS/MS dalam Optimasi Fermentasi.....	93
Model Penelitian pada Kultur Endofit pada Media Cair	97
A. Uji Aktivitas Antimikroba dengan Pendekatan Konvensional	97
B. Uji Aktivitas Antimikroba dengan Pendekatan Metabolomik.....	98
Metode untuk Meningkatkan Jenis dan Jumlah Metabolit Jamur Endofit	107
A. Permasalahan dalam Kultur Jamur Endofit	107
B. Metode Mengaktifkan Jalur Kriptik pada Jamur Endofit.	108
Metode Ko-Kultur Jamur Endofit	113
A. Desain Penelitian Ko-Kultur Jamur.....	114
B. Morfologi Ko-Kultur Jamur	114
C. Analisis Senyawa dengan UHPLC-HRMS	116
D. Analisis Diferensial dan Analisis Multivariat Metabolit dari Jamur	123
Penambahan Senyawa Pengubah Epigenetik untuk Meningkatkan Metabolit Jamur Endofit.....	129
A. Mekanisme Kerja Pengubah Epigenetik.....	130
B. Model Penambahan Senyawa Epigenetik pada Kultur Jamur Endofit.....	131

C. Analisis Diferensial untuk Mengetahui Efek Penambahan SAHA dan VS.....	134
D. Analisis Multivariat untuk Mengetahui Perbedaan Antarkelompok dengan Penambahan SAHA dan VS	136
E. Identifikasi Senyawa <i>De novo</i> dengan Penambahan SAHA dan VS	137
F. Permasalahan dalam Kultur dengan Pengubah Epigenetik	138
Penutup.....	145
Daftar Pustaka.....	147
Index.....	157
Biografi Penulis	160

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1.	Interaksi Endofit dalam Masa Perkembangan Tanaman.....	3
Gambar 1.2.	Gambaran Jumlah Publikasi di Pubmed dengan Kata Kunci "Jamur Endofit"	4
Gambar 2.1.	Interaksi Tanaman-Mikrobia	14
Gambar 2.2.	Keanekaragaman Jamur Endofit yang Diisolasi dari Tanaman Sungkai (<i>Peronema canescens</i>)....	17
Gambar 2.3.	Karakteristik Sepuluh Jamur Endofit Terpilih yang Berasosiasi dengan <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	18
Gambar 3.1.	Jamur Endofit dalam Lingkungan Alami (Tanaman).....	22
Gambar 3.2.	Kelas Utama Metabolit Sekunder Jamur Endofit dan Senyawa Prekursornya	23
Gambar 3.3.	Modular <i>Nonribosomal Peptide Synthetase</i>	24
Gambar 3.4.	Struktur Domain <i>Polyketide Synthase (PKS)</i> Jamur.....	25
Gambar 3.5.	Contoh Skema Biosintesis Senyawa Poliketida pada Jamur Endofit.....	27
Gambar 3.6.	Biosintesis Terpenoid	29
Gambar 3.7.	Beberapa Struktur Senyawa Kimia dari Metabolit yang Diproduksi Jamur Endofit	33
Gambar 4.1.	Aplikasi Jamur Endofit.....	35
Gambar 4.2.	Mekanisme Pembentukan Spesies Oksigen Reaktif (ROS) dan Mekanisme Antioksidan dari Jamur Endofit.....	36
Gambar 5.1.	Teknik Pengambilan Sampel Daun Tanaman sebagai Sumber Endofit	55
Gambar 5.2.	Tahapan Isolasi Jamur Endofit dari Organ Tanaman.....	56
Gambar 5.3.	Skema Pengambilan Jaringan Tanaman untuk Sumber Endofit	57

Gambar 5.4.	Koloni Jamur dari Tanaman <i>Peronema canescens</i>	58
Gambar 5.5.	Metode Isolasi Endofit	59
Gambar 5.6.	Struktur Operon rDNA pada Jamur.....	64
Gambar 5.7.	Gen Inti RNA Ribosom dan Daerah ITS	65
Gambar 5.8.	Posisi IGS pada rDNA.....	66
Gambar 5.9.	Tahapan Proses dalam PCR.....	71
Gambar 5.10.	Proses Elektroforesis	74
Gambar 5.11.	Proses Sekuensing DNA	76
Gambar 5.12.	Contoh Pohon Filogenetik Jamur Endofit <i>Phomopsis</i> sp. Galur PCL-Y-48 yang Diisolasi dari <i>Peronema canescens</i>	77
Gambar 6.1.	Fase Pertumbuhan Jamur.....	80
Gambar 6.2.	Morfologi Pertumbuhan Jamur Endofit <i>Cophinforma mamane</i> Setelah 7 Hari Inkubasi.	86
Gambar 6.3.	Proses dalam Fermentasi dan Teknologi Kontrolnya.....	87
Gambar 6.4.	Alur Proses Produk Fermentasi.....	88
Gambar 7.1.	Teknik Ekstraksi Jamur Endofit	91
Gambar 7.2.	Hasil Pengamatan Ekstrak Etil Asetat <i>C. mamane</i> dengan KLT.	92
Gambar 7.3.	Perbandingan Ionisasi Puncak Dasar (<i>Base Peak</i>) (m/z 100-1500) UHPLC-HRMS dari Ekstrak Kasar <i>B. mamane</i> . <i>B. mamane</i> ditumbuhkan dalam MEA pada ionisasi negatif (NI) dan positif (PI)..	93
Gambar 7.4.	Kromatogram UHPLC-HRMS pada Ionisasi Positif dari Ekstrak Etil Asetat <i>B. mamane</i> yang Dikultur pada MEA	94
Gambar 7.5.	Struktur Senyawa Botryosulfuranol A-C dan Turunan Mellein dari Jamur <i>C. mamane</i>	95
Gambar 7.6.	Siklopeptida yang Berhasil Dideteksi dari <i>C. mamane</i> dan <i>F. decemcellulare</i>	96
Gambar 8.1.	Skema Uji Antibakteri dengan Pengukuran Zona Hambat.....	97
Gambar 8.2.	Uji Antibakteri dengan Teknik Mikrodilusi untuk Menentukan KHM dan KBM	98

Gambar 8.3.	Desain Penelitian untuk Menelusuri Mekanisme Penghambatan <i>C. mamane</i> Terhadap Pertumbuhan <i>C. albicans</i>	100
Gambar 8.4.	Morfologi Kultur <i>B. mamane</i> dan <i>C. albicans</i>	100
Gambar 8.5.	Kromatogram-MS Ko-Kultur <i>B. mamane</i> dan <i>C. albicans</i> pada Kondisi Statis.....	101
Gambar 8.6.	Hasil Uji Antijamur Ekstrak <i>B. mamane</i> pada <i>C. albicans</i>	102
Gambar 9.1.	Metode untuk Mengaktivasi " <i>Silent Gene</i> " pada Jamur Endofit.....	108
Gambar 10.1.	Morfologi Mono dan Ko-Kultur <i>B. mamane</i> , <i>F. solani</i> , dan <i>C. linicola</i> Selama 10 Hari Inkubasi..	115
Gambar 10.2.	Kromatogram UHPLC-HRMS pada Ionisasi Positif dari Ekstrak Etil Asetat <i>B. mamane</i> Hari ke 1–10	116
Gambar 10.3.	Kromatogram UHPLC-HRMS pada Ionisasi Positif dari Ekstrak Etil Asetat <i>F. solani</i> Hari ke 1–10	117
Gambar 10.4.	Kromatogram UHPLC-HRMS pada Ionisasi Positif dari Ekstrak Etil Asetat <i>C. linicola</i> pada Hari ke 1–10	118
Gambar 10.5.	Kromatogram UHPLC-HRMS Ko-Kultur BMFS pada Hari ke 1-10.....	119
Gambar 10.6.	Kromatogram UHPLC-HRMS Ko-Kultur BMCL pada Hari ke 1-10.....	120
Gambar 10.7.	Kromatogram UHPLC-HRMS Ko-Kultur FSCL pada Hari ke 1-10.....	121
Gambar 10.8.	Ko-Kultur BMFS pada Hari ke 3, 6, dan 10	122
Gambar 10.9.	<i>Heat Map</i> Klaster BM, FS, dan BMFS pada Hari ke 3, 5, dan 10	124
Gambar 10.10.	Diagram Venn yang Menggambarkan Distribusi Metabolit pada BM, FS, dan BMFS.....	125
Gambar 10.11.	Metabolit Sekunder yang Dihasilkan oleh <i>B. mamane</i> dan <i>F. solani</i>	126
Gambar 10.12.	Metabolit yang Diproduksi oleh <i>B. mamane</i> dan Tidak Ditemukan pada Ko-Kultur.....	127
Gambar 10.13.	Metabolit yang Diproduksi Baik oleh <i>B. mamane</i> dan <i>F. solani</i>	127

Gambar 10.14. Metabolit Sekunder yang Diproduksi oleh Kultur BMFS.....	128
Gambar 11.1. Struktur Kimia SAHA dan Asam Valproat.....	130
Gambar 11.2. Proses Aktivasi Gen oleh Pengubah Epigenetik Melalui Mekanisme Asetilasi dan Mekanisme Penghambatannya dengan Metilasi	131
Gambar 11.3. Morfologi dan Rendemen Ekstrak dengan Penambahan Pengubah Epigenetik	133
Gambar 11.4. <i>Volcano Plot</i> Perubahan Metabolit pada <i>B. mamane</i> sebagai Respon Terhadap Penambahan Pengubah Epigenetik pada Kondisi Pertumbuhan yang Berbeda.....	134
Gambar 11.5. Analisis PLS-DA dan 25 Senyawa Dianalisis Berdasarkan <i>Variable Importance in Projection</i> (VIP)	137
Gambar 11.6. Deteksi Metabolit Turunan SAHA pada Kultur <i>B. mamane</i> dengan UHPLC-HRMS.....	139
Gambar 11.7. Deteksi Metabolit Turunan Natrium Valproat pada Kultur <i>B. mamane</i> dengan UHPLC-HRMS	140
Gambar 11.8. Kromatogram-MS Asam Valproat dan Turunannya Beserta Struktur Kimianya.....	141
Gambar 11.9. Jaringan Molekuler Berdasarkan Kesamaan Spektral Hasil Penyelarasan dari Kelompok Kontrol dan Kelompok yang Diberi SAHA dan VS.....	142

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1.	Contoh Jamur Endofit dan Senyawa yang Dhasilkannya	4
Tabel 1.2.	Beberapa Istilah Terkait dengan Jamur dan Perkembangbiakannya	7
Tabel 1.3.	Klasifikasi Jamur Endofit	9
Tabel 2.1.	Biodiversitas Jamur Endofit dari Tanaman Sungkai (<i>Peronema canescens</i>)	15
Tabel 3.1.	Contoh Metabolit yang Diisolasi dari Jamur Endofit dan Aktivitas Farmakologinya	30
Tabel 4.1.	Jamur Endofit dan Aplikasinya dalam Bidang Industri.....	51
Tabel 5.1.	Sekuens Primer yang Digunakan untuk <i>Barcode</i> DNA Jamur pada Gen ITS.....	65
Tabel 5.2.	Sekuens Primer untuk IGS.....	66
Tabel 5.3.	Kemampuan Pemisahan Agarosa dalam Berbagai Konsentrasi.....	72
Tabel 6.1.	Komposisi Beberapa Media untuk Kultur Jamur Endofit	83
Tabel 8.1.	Metabolit <i>C. albicans</i> yang Terdeteksi Selama Ko-Kultur dengan <i>B. mamane</i>	102
Tabel 11.1.	Analisis Senyawa <i>De novo</i> yang Dhasilkan pada Penambahan SAHA dan VS	137

1

SELAYANG PANDANG ENDOFIT

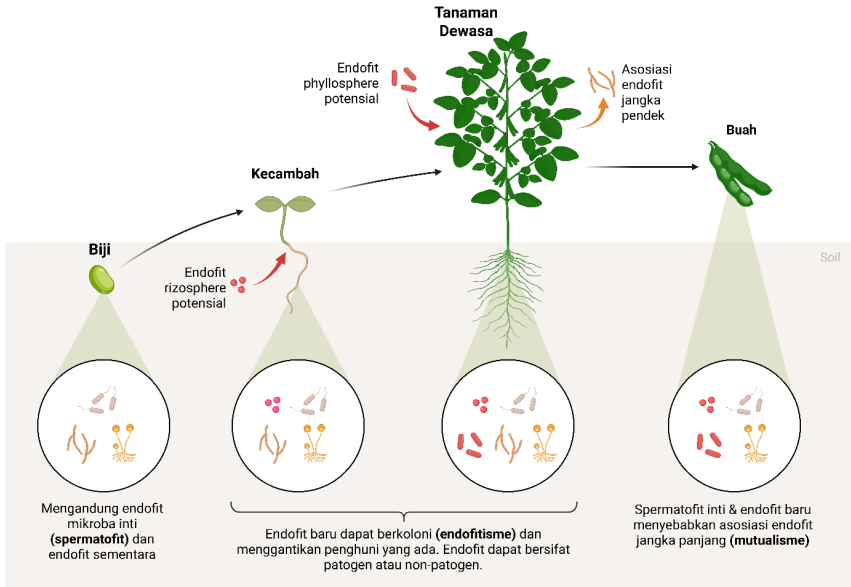
A. Definisi dan Sejarah Keberadaan Endofit

Istilah endofit pertama kali dikemukakan oleh De Bray (1886) yang mendefinisikan endofit sebagai "semua organisme yang terdapat pada jaringan tanaman" yang berarti termasuk di dalamnya adalah golongan bakteri, jamur, alga, serangga, ataupun tanaman vascular (Triastuti, 2020). Definisi ini kemudian berkembang dan secara umum endofit didefinisikan sebagai "semua organisme yang mendiami organ tanaman dan pada suatu saat dalam pertumbuhan mereka dapat berkoloni tanpa menimbulkan kerusakan pada inangnya" (Rodriguez *et al.*, 2016). Dalam beberapa tahun terakhir, penelitian ke arah endofit berfokus pada jamur sehingga peneliti sering menyebut endofit dengan jamur endofit. Istilah endofit tidak hanya ditujukan untuk organisme yang berkoloni dengan tanaman terestrial saja tetapi juga yang bersimbiosis dengan dengan makroalga dan rumput laut (Kumar & Radhakrishnan, 2020). Buku ini akan fokus membahas jamur endofit sedangkan bakteri endofit akan dibicarakan secara sekilas saja.

Penelusuran tentang keberadaan endofit pada tanaman merupakan kisah yang menarik. Keberadaan endofit di alam tertelusuri dari fosil 400 juta tahun yang lalu yang ditemukan di Devonian Rhynie (Skotlandia) yang membuktikan bahwa interaksi endofit-tanaman telah terjadi semenjak tanaman tingkat tinggi ada dan berevolusi (Krings *et al.*, 2007). Selama proses evolusi antara jamur-tanaman, telah terjadi interaksi yang sangat kuat bahkan telah terjadi transfer genetik dari tanaman ke jamur sehingga memungkinkan jamur bisa menghasilkan senyawa yang diproduksi oleh sel inangnya tersebut. Contohnya adalah *Taxomyces andreana* yang dapat menghasilkan senyawa taxol seperti halnya inangnya,

Taxus brevifolia. Interaksi jamur endofit-inang merupakan interaksi mutualisme. Sebagai contoh, beberapa tanaman yang terutama golongan rumput dan semak terhindar dari herbivora karena adanya alkaloid yang diproduksi oleh endofit yang berasosiasi dengan tanaman tersebut.

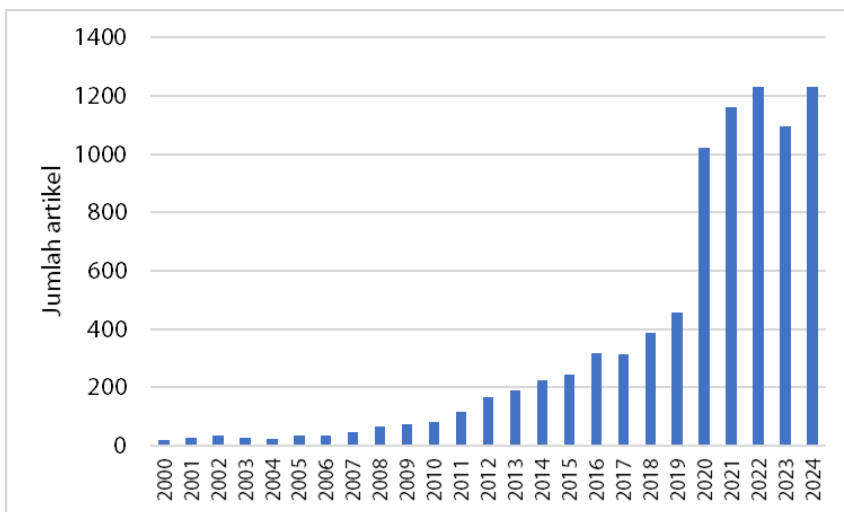
Penularan endofit dapat terjadi secara vertikal, dengan tanaman induk mewariskan endofit kepada keturunannya melalui biji. Dengan cara ini, endofit hadir untuk seluruh siklus hidup tanaman. Penularan vertikal paling umum di antara spesies rumput, yang mungkin hanya memiliki satu spesies endofit dan hanya memiliki satu genotipe untuk endofit itu. Endofit juga ditularkan secara horizontal, sering kali oleh spora yang ada di lingkungan sekitarnya (Gambar 1.1). Bibit dapat memulai hidup mereka bebas dari kolonisasi endofit dan secara bertahap menjadi terkolonisasi, dengan akumulasi pada akhir musim tanam, oleh spora dari hujan, udara atau organisme yang lewat seperti serangga atau mamalia. Cara penularan ini menyediakan komunitas endofit heterogen yang berbeda dari tanaman induk dan dapat menghasilkan populasi yang tanaman lebih tangguh. Modulasi mikrobioma pada tanaman pangan/tanaman obat dapat menggabungkan penularan vertikal dan horizontal; misalnya, menginokulasi tanaman induk dengan endofit yang diinginkan untuk membangun benih yang dikolonisasi endofit dan menerapkan inokula endofit melalui perawatan kulit benih, penambahan media pertumbuhan atau penyemprotan udara.



Gambar 1.1. Interaksi Endofit dalam Masa Perkembangan Tanaman

Gambar dibuat dengan BioRender

Penelitian terkait jamur endofit menunjukkan peningkatan dari tahun ke tahun. Berdasarkan data PubMed (diakses pada Desember 2024), ribuan artikel terkait jamur endofit telah dipublikasikan dalam situs basis data tersebut (Gambar 1.2). Hal ini menunjukkan tingginya minat dan peranan jamur endofit dalam hidup manusia.



Gambar 1.2. Gambaran Jumlah Publikasi di Pubmed dengan Kata Kunci "Jamur Endofit"

Penelitian jamur endofit masih didominasi oleh penelitian di negara maju seperti Amerika, Eropa, China, Jepang, dan Korea Selatan. Penelitian di Indonesia masih terbatas umumnya berupa isolasi dan identifikasi jamur serta skrining aktivitas farmakologinya. Di Universitas Islam Indonesia, terdapat Endophyte Research Center (ERC) yang bekerja sama dengan Pusat Riset Mikrobiologi Terapan BRIN yang mengembangkan penelitian terkait endofit Nusantara.

Pengembangan endofit sebagai sumber bahan baku obat ataupun enzim sudah banyak diterapkan. Beberapa contoh metabolit dari jamur endofit dan aplikasinya ditampilkan pada tabel 1.1.

Tabel 1.1. Contoh Jamur Endofit dan Senyawa yang Dihasilkannya

Sumber Endofit	Jenis Endofit	Senyawa dan Aktivitas Farmakologinya	Referensi
<i>Taxus sp.</i>	<i>Taxomyces andreana</i>	Paclitaxel; anti kanker	Heinig, Scholz, & Jennewein, 2013)

Sumber Endofit	Jenis Endofit	Senyawa dan Aktivitas Farmakologinya	Referensi
<i>Terminalia morobensis</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Pestacin & isopestacin; antioksidan	(Kouipou & Boyom, 2019)
<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	<i>Trametes hirsuta</i>	Podophyllotoxin; anti kanker	(Venugopalan & Srivastava, 2015)
<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Vicristine, chaetoglobosin	(Doan <i>et al.</i> , 2024)
<i>Tripterygium wilfordii</i>	<i>Fusarium subglutinans</i>	Subglutinol A dan B; imunosupresan	(Lee, <i>et al.</i> , 1995)
<i>Trifolium alexanderinum</i>	<i>Fusarium rosesus</i>	Cyclosporin; imunosupresan	(Ismail <i>et al.</i> , 2010)
<i>Astragalus adsurgens</i>	<i>Gaeumannomyces cylindrosporus</i>	Melanin, bioremediasi tanah	(Corrêa <i>et al.</i> , 2014)

B. Peranan Endofit

Jamur endofit memiliki beberapa peranan terkait dengan ekologi dan keberlangsungan tanaman inang. Peranan tersebut di antaranya adalah:

1. Mempermudah akses nutrisi: Endofit mampu memacu pertumbuhan sel tanaman karena simbiosis menghasilkan hormon auxin yang penting untuk memacu pertumbuhan akar. Jamur seperti *Penicillium* sp. Telah dilaporkan memacu pertumbuhan tunas dengan menghasilkan hormone giberelin dan indole acetic acid (IAA).
2. Meningkatkan toleransi terhadap kekeringan: Endofit juga meningkatkan ambang stres tanaman terhadap kekeringan karena meristem lebih mudah diperbaiki. Kondisi garam yang tinggi pada penelitian tanaman barley (*Hordeum vulgare*) dibantu oleh adanya basidiomycete endofit *Piriformospora indica*.

3. Meningkatkan kemampuan meristem untuk perbaikan (*recovery*) setelah kondisi kekeringan.
4. Proteksi terhadap serangga: Endofit *Phomopsis oblonga* dari pohon elm menghasilkan alkaloid dan mycotoxin yang membantu mengontrol penyebaran *Physocnemum brevilinenu*.
 - a. Hal ini diakibatkan oleh adanya produksi alkaloid seperti peramine, yang berfungsi sebagai *antifeedant* (zat yang menghambat/mencegah serangga untuk makan tanaman)
 - b. Proteksi terhadap jamur parasit. Adanya senyawa sesquiterpen dan sterol dari endofit yang menghambat pertumbuhan jamur patogen. Contoh *Streptomyces sp* pada *Allium fistulosum* mengurangi kerusakan biji sawi karena jamur *Alternaria brassicicola*.
5. Meningkatkan pertumbuhan vegetatif karena adanya produksi auxin sebagai akibat endosimbiosis.
6. *Toxic syndromes* terhadap herbivora. Alkaloid yang dihasilkan seperti ergovaline dan ergotamine keduanya menyebabkan vasokonstriksi pada ternak setelah mengkonsumsi rumput *Festuca arundinacea*. Contoh lain adalah produksi alkaloid ergot dari beberapa species *Neotyphodium*.
7. Penghasil enzim industri seperti amilase, tyrosinase, protease, dan lain-lain.
8. Endofit sebagai penghasil senyawa kimia yang memiliki aktivitas farmakologi.

C. Klasifikasi Endofit

Jamur/fungi adalah organisme eukariotik heterotrof, hampir semuanya memiliki struktur hifa dan mencukupi kebutuhan nutrisinya melalui absorpsi senyawa organik di medium sekitarnya. Sifat heterotrof menjadikan jamur bersifat saprofit (saprotofik) atau dengan cara bersimbiosis dengan organisme lain. Saprofit berarti jamur mengabsorpsi senyawa organik dari organisme lain yang sudah mati seperti sisa pohon atau tanaman yang sudah mati,

bangkai hewan, atau sisa makhluk hidup lain. Sementara simbiosis merupakan bentuk hubungan antara jamur dengan organisme lain apakah itu netralistik, mutualistik, atau parasitik. Simbiosis parasitik terjadi apabila jamur mengakibatkan kerusakan pada organisme lain; misalnya menyebabkan penyakit pada tumbuhan (hama), hewan, dan manusia (misalnya jamur patogen); simbiosis mutualistik berarti jamur dan sel inang hidup saling bekerja sama dan saling menguntungkan, misalnya jamur mendapatkan senyawa organik dari inang tetapi dia membantu inang dengan menghasilkan senyawa yang dibutuhkan seperti antiserangga atau antiherbivora.

Pada awalnya jamur digolongkan ke dalam filum tumbuhan karena bentuknya yang menyerupai bangun tanaman, namun berdasarkan studi genetika jamur ternyata lebih mirip dengan filum hewan. Jamur memiliki dinding sel yang khas yaitu tersusun atas chitin (yang merupakan dinding sel dari golongan Crustacea), selain itu jamur juga bersifat heterotrof seperti hewan, bukan autotrof seperti tumbuhan.

Diperkirakan ada sekitar 4.000 species jamur di dunia ini dan jamur endofit sendiri digolongkan menjadi empat kelas. Untuk lebih memudahkan dalam memahami klasifikasi jamur, beberapa istilah terkait dengan sifat dan karakteristik jamur bisa dilihat dalam tabel 1.2.

Tabel 1.2. Beberapa Istilah Terkait dengan Jamur dan Perkembangbiakannya

Istilah	Penjelasan
Thalus	Keseluruhan organ fungi yang meliputi hifa dan badan buah.
Septat	Dinding penyekat pada hifa atau spora (\neq aseptat).
Hifa	Bagian dari jamur berupa benang-benang filamen yang tersusun dari dinding sel dan sitoplasma.
Miselium	Kumpulan hifa yang saling berhubungan.

Istilah	Penjelasan
Homothalus	Sifat miselium suatu koloni yang mampu melakukan perkawinan; fungsi kelamin yang berlawanan dilakukan oleh sel-sel yang berlainan pada satu miselium yang berasal.
Heterothalus	Bentuk perkembangbiakan fungi secara seksual (umumnya merujuk ke askospora dan basidiospora).
Basidiospora	Spora seksual yang diproduksi dari basidium.
Plasmogami	Penggabungan struktur fungsi yang saling kompatibel, dilanjutkan dengan kariogami.
Kariogami	Fusi/penggabungan inti sel.
Biotrofik	Tumbuh tergantung kepada inang yang hidup.
Nektrotropik	Parasit yang awalnya membunuh sel inang kemudian mencerna substrat dari organisme tersebut.
Mycorrhiza	Simbiosis mutualisme antara akar tanaman dan jamur.
Zoogamy	Perkembangbiakan seksual dengan spora yang motil.

Semua tanaman dalam ekosistem alami tampaknya bersimbiosis dengan jamur endofit. Biodiversitas jamur endofit memiliki efek pada kemampuan tanaman untuk merespon lingkungan biotik dan abiotik. Berdasarkan klasifikasi yang dikemukakan oleh Rodriguez *et al.*, 2019, terdapat empat kelompok endofit (tabel 1.3).

Golongan Clavicipitaceus berkoloni dengan rumput sementara non-Clavicipitaceus berkoloni dengan tanaman tidak berpembuluh, paku-pakuan, Coniferae, dan Angiospermae. Clavicipitaceae (Hypocreales; Ascomycota) mencakup spesies yang hidup bebas dan bersimbiosis dengan serangga dan jamur (misalnya *Cordyceps* spp.) atau rumput, dan alang-alang (misalnya *Balansia* spp., *Epichloë* spp., dan *Claviceps* spp.)

Endofit Kelas 2 mencakup berbagai spesies, yang semuanya merupakan anggota Dikarya (Ascomycota atau Basidiomycota). Sebagian besar termasuk dalam Ascomycota, dengan sebagian kecil Basidiomycota. Anggota yang pertama terbatas pada Pezizomycotina, yang mana mereka mewakili beberapa kelas. Endofit Kelas 2 dalam Basidiomycota mencakup beberapa anggota Agaricomycotina dan Pucciniomycotina. Endofit Kelas 2 berbeda dari endofit NC lainnya karena secara umum mereka mengkoloni akar, batang, dan daun; mampu membentuk infeksi yang luas di dalam tanaman; ditularkan melalui kulit biji dan/atau rimpang; memiliki kelimpahan rendah di rizosfer; memberikan manfaat kebugaran yang beradaptasi dengan habitat selain manfaat yang tidak beradaptasi dengan habitat; dan biasanya memiliki frekuensi infeksi yang tinggi (90–100%) pada tanaman yang tumbuh di habitat dengan tingkat stres tinggi.

Tabel 1.3. Klasifikasi Jamur Endofit

Kriteria	Clavicipitaceus	Non-Clavicipitaceus		
	Kelas 1	Kelas 2	Kelas 3	Kelas 4
Jangkauan Inang	Sempit (pada famili rumput)	Luas	Luas	Luas
Jaringan yang Dikolonisasi	Tunas dan rimpang	Tunas, akar, dan rimpang	Tunas	Akar
Kolonisasi <i>in Planta</i>	Ekstensif	Ekstensif	Terbatas	Ekstensif
Diversitas <i>in Planta</i>	Rendah	Rendah	Tinggi	Tidak diketahui
Transmisi	Vertikal dan horizontal	Vertikal dan horizontal	Horizontal	Horizontal
Manfaat	NHA (tidak beradaptasi dengan habitat)	NHA dan beradaptasi dengan habitat (HA)	NHA	NHA

*Manfaat yang tidak beradaptasi dengan habitat (NHA) seperti toleransi terhadap kekeringan dan peningkatan pertumbuhan merupakan hal yang umum di antara endofit terlepas dari habitat asalnya. Manfaat yang beradaptasi dengan habitat (HA) merupakan hasil dari adaptasi terhadap pH, suhu, dan salinitas.

Endofit kelas 3 dibedakan atas dasar kemunculannya terutama atau hanya pada jaringan di atas tanah; penularan horizontal; pembentukan infeksi yang sangat terlokalisasi; potensi memberikan manfaat pada inang yang tidak selalu spesifik habitatnya; dan keanekaragaman hayati tanaman yang sangat tinggi (tabel 1.3). Endofit kelas 3 mencakup jamur endofit yang berasosiasi dengan daun pohon tropis serta asosiasi yang sangat beragam dari jaringan di atas tanah tanaman nonvaskular, tanaman vaskular tak berbiji, konifer, dan angiosperma berkayu dan herba dalam bioma mulai dari hutan tropis hingga komunitas boreal dan Arktik/Antartika. Selain terdapat dalam jaringan fotosintesis dan herba, endofit kelas 3 ditemukan dalam bunga dan buah, serta dalam kayu dan kulit bagian dalam yang tidak menunjukkan gejala. Jamur dengan riwayat hidup yang mirip dengan endofit kelas 3 juga terdapat dalam lumut kerak yang tidak menunjukkan gejala, dan dalam kasus tersebut dikenal sebagai jamur 'endolichenik'.

Endofit kelas 3 khususnya terkenal karena keanekaragamannya yang tinggi dalam jaringan inang, tanaman, dan populasi individu. Misalnya, daun yang tampak sehat di hutan tropis pada dataran rendah yang lembap mengandung banyak infeksi independen, bukan pertumbuhan hifa yang sistemik atau ekstensif. Biomassa yang dihasilkan dari infeksi tertentu sangat rendah, sehingga setiap daun mewakili mosaik spesies endofit yang beragam dan padat. Di hutan tropis di Panama tengah, di mana 100% daun dewasa dari berbagai pohon dan semak biasanya mengandung endofit, setiap daun dapat menampung hingga satu isolat per 2 mm² jaringan daun dan sering kali mengandung lusinan spesies. Daun yang berbeda pada pohon yang sama mungkin memiliki kumpulan jamur endofit yang sangat berbeda. Satu tanaman dapat menampung ratusan

spesies, dan spesies tanaman di seluruh wilayah asalnya dapat dihuni oleh ribuan spesies (Arnold & Lutzoni, 2007).

Endofit kelas 4 (endofit bersepta gelap/DSE/*Dark Septate Endophyte*) dibedakan sebagai kelompok fungsional berdasarkan keberadaan septa melanin gelap, dan keterbatasannya pada akar tanaman. Secara umum, endofit kelas 4 terutama adalah jamur Ascomycetes yang bersifat konidia atau steril dan yang membentuk struktur melanin seperti hifa interseluler dan intraseluler dan mikrosklerotia di akar. DSE memiliki sedikit spesifisitas inang atau habitat; dilaporkan berasosiasi dengan sekitar 600 tanaman termasuk tanaman yang tidak bermikoriza, dari Antartika, Arktik, Alpen, sub-Alpen, dan zona beriklim sedang, serta dari dataran pantai dan dataran rendah Afrika, dan beberapa ekosistem tropis. DSE sering ditemukan di hutan boreal dan beriklim sedang yang berasosiasi dengan akar pohon dan semak yang halus, terutama konifer. Jamur ini tidak dianggap patogen, karena mereka ditemukan pada akar halus yang sehat, dan dalam konteks ini, akan disebut sebagai endofit dalam arti luas karena DSE 'mengkoloni organ tanaman hidup tanpa efek negatif yang nyata'. Singkatnya, DSE ditemukan di seluruh dunia, lazim di lingkungan dengan tekanan tinggi, dan tampaknya ada di mana-mana dan melimpah di berbagai ekosistem (Rodriguez *et al.*, 2009).

Dalam beberapa dekade mendatang penelitian terkait biologi endofit akan terus diteliti untuk menjawab pertanyaan mendasar seperti bagaimana komunikasi endofit dengan inangnya, bagaimana komunitas antarmikrobia terbentuk dalam tanaman dan bagaimana pola komunikasi antarmikrobia tersebut. Peneliti dapat mengoptimalkan pola interaksi tanaman-endofit untuk tujuan khusus seperti memaksimalkan pertumbuhan tanaman atau memaksimalkan biosintesis metabolit.

2

BAGAIMANA JAMUR ENDOFIT DAN TANAMAN INANG BERINTERAKSI?

Tanaman adalah organisme fototropik yang mampu mengubah energi cahaya menjadi senyawa biologi yang kemudian bisa digunakan sebagai sumber energi. Dalam evolusi di bumi, proses ini memungkinkan setiap organisme berfungsi sehingga bisa dipahami bahwa organisme heterotrof seperti jamur terkait langsung atau tidak langsung untuk menggunakan energi ini selama proses fotosintesis berlangsung.

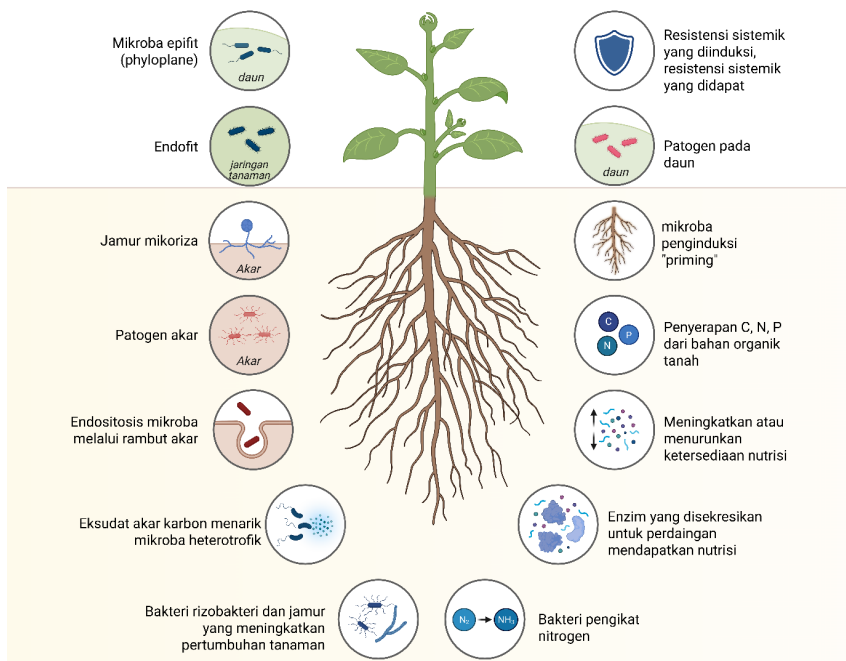
A. Mekanisme Interaksi Endofit dan Tanaman Inang

Jamur endofit menghuni jaringan tanaman secara asimtomatik dan berkolonisasi pada semua bagian tanaman. Dalam hampir semua penelitian, pemeriksaan tanaman inang mengungkapkan keberadaan endofit. Suatu tanaman dapat menampung banyak spesies endofit, yang dapat tetap terlokalisasi dan menyebabkan perlindungan spesifik jaringan dari penyakit atau dapat menyebar secara sistemik pada tanaman. Interaksi simbiosis, dan berpotensi mutualistik, antara tanaman dan endofit ini sangat beragam dan mencakup spesies tanaman liar dan budi daya. Diperkirakan terdapat lebih dari 1 juta spesies endofit pada 300.000 spesies tanaman yang berbeda, namun hanya sebagian kecil saja yang telah diisolasi dan diteliti peranannya dalam tanaman yang mereka huni (Strobel & Daisy, 2003).

Jamur berinteraksi dengan tanaman dalam berbagai cara (gambar 2.1). Beberapa interaksi menghasilkan respon yang cukup jelas pada tanaman induk. Interaksi ini sangat kompleks karena bukan hanya jamur yang mengeksploitasi tanaman tetapi tanaman di satu sisi juga bisa membatasi pertumbuhan jamur untuk saling berkompetisi. Tanaman bisa menghasilkan sinyal yang membatasi,

memacu, atau bahkan menghentikan pertumbuhan jamur dan sebaliknya, jamur meresponnya dengan menghasilkan senyawa/signal untuk pertahanan diri. Secara bertahap dengan berjalannya waktu terbentuklah proses interaksi yang tetap dimana proses komunikasi dan saling merespon antara jamur dan tanaman terus terjadi.

Interaksi Tanaman - Mikroba



Gambar 2.1. Interaksi Tanaman-Mikrobia
Gambar dibuat dengan BioRender

Interaksi tanaman-mikroba bisa berupa mikroba epifit yang berkolonisasi di permukaan daun (*phylloplane*), endofit (pada jaringan tanaman), jamur mikoriza (simbiosis jamur/bakteri-akar tanaman), patogen (pada akar atau daun).

B. Spesifitas Endofit dan Tanaman Inang

Survei tentang endofit 30 tahun terakhir membuktikan bahwa endofit mengkolonisasi tanaman terestrial. Endofit ditemukan pada tanaman yang hidup di daerah tropis, hutan, mulai dari tanaman herbaceous, berkayu, lumut, alga, rumput laut, paku, dan tanaman lainnya. Diperkirakan sekitar 250.000 spesies tanaman di bumi ini, dan bisa diperkirakan satu tanaman dikolonisasi oleh empat spesies endofit, maka ada sekitar satu juta endofit. Sekitar 100.000 spesies jamur termasuk endofit telah diketahui dan sisanya masih belum (Arnold, 2007).

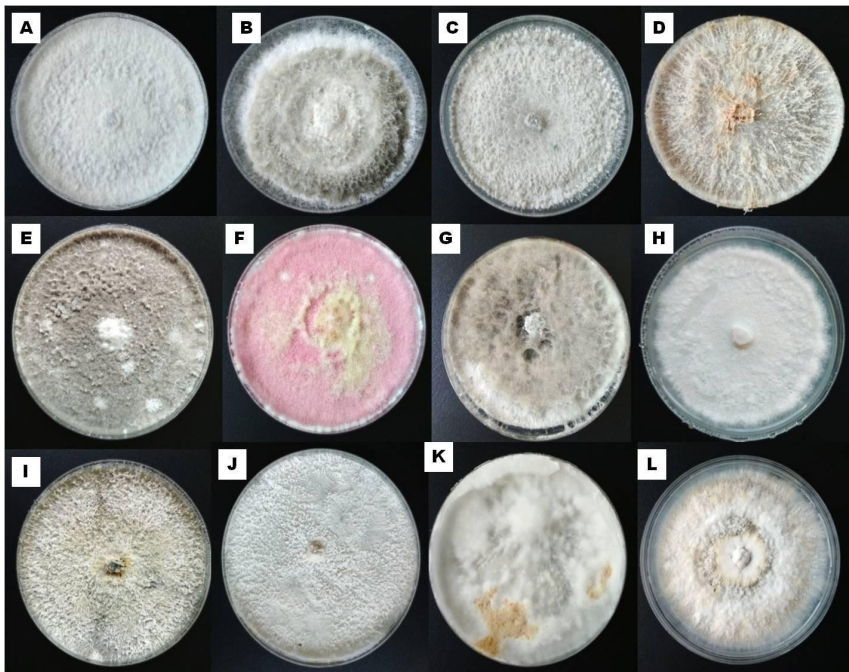
Berbagai studi yang dilakukan pada satu jenis tanaman obat dari lokasi kultivasi yang berbeda menunjukkan variabilitas jenis endofit yang mengkoloni tanaman tersebut. Sebagai contoh adalah studi jamur endofit dari tanaman sungkai (*Peronema canescens* Jack). Tanaman sungkai merupakan tanaman khas daerah Asia Tenggara seperti di Malaysia, Singapura, dan Indonesia. Tanaman ini telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antioksidan, imunomodulator, antihiperurisemia, dan antikanker (Shalihin, *et al.*, 2024). Penelitian yang dilakukan oleh Elfita *et al.*, (2022) hanya berhasil mengisolasi 12 jamur endofit dari tanaman sungkai yang tumbuh di Palembang atau penelitian Ayik, *et al.*, (2019) yang hanya mengisolasi 4 endofit dari Tanah Merah-Samarinda. Sementara penelitian Triastuti *et al.*, (2025) melaporkan sebanyak 47 endofit berhasil diisolasi dari tanaman sungkai dari Banjar-Kalimantan Selatan (tabel 2.1). Morfologi jamur dari sungkai ditampilkan pada gambar 2.2.

Tabel 2.1. Biodiversitas Jamur Endofit dari Tanaman Sungkai (*Peronema canescens*)

No	Galur	Bagian Tanaman	Taksa	No	Galur	Bagian tanaman	Taksa
1	PCL-Y-1-A	Daun muda	<i>Phomopsis</i> sp.	25	PCL-Y-57-B	Daun muda	<i>Colletotrichum</i> sp.
2	PCL-Y-1-B	Daun muda	<i>Arthrinium</i> sp.	26	PCL-Y-58	Daun muda	<i>Schizophyllum</i> sp.
3	PCL-Y-4-B	Daun muda	<i>Arthrinium</i> sp.	27	PCL-O-3	Daun tua	<i>Phomopsis</i> sp.

No	Galur	Bagian Tanaman	Taksa	No	Galur	Bagian tanaman	Taksa
4	PCL-Y-12	Daun muda	<i>Colletotrichum</i> sp.	28	PCL-O-7	Daun tua	<i>Colletotrichum</i> sp.
5	PCL-Y-13	Daun muda	<i>Ceratobasidium</i> sp.	29	PCL-O-8	Daun tua	<i>Colletotrichum</i> sp.
6	PCL-Y-14	Daun muda	<i>Arthrinium</i> sp.	30	PCL-O-9	Daun tua	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
7	PCL-Y-18-A	Daun muda	<i>Colletotrichum</i> sp.	31	PCL-O-11	Daun tua	<i>Xylaria</i> sp.
8	PCL-Y-24	Daun muda	<i>Xylaria</i> sp.	32	PCL-O-14	Daun tua	<i>Colletotrichum</i> sp.
9	PCL-Y-25	Daun muda	<i>Phomopsis</i> sp.	33	PCL-O-18	Daun tua	<i>Phomopsis</i> sp.
10	PCL-Y-27	Daun muda	<i>Arthrinium</i> sp.	34	PCL-O-21	Daun tua	<i>Colletotrichum</i> sp.
11	PCL-Y-31-B	Daun muda	<i>Neocosmospora</i> sp.	35	PCL-O-22	Daun tua	<i>Xylaria</i> sp.
12	PCL-Y-32	Daun muda	<i>Colletotrichum</i> sp.	36	PCL-O-23	Daun tua	<i>Phomopsis</i> sp.
13	PCL-Y-34-A	Daun muda	<i>Fusarium</i> sp.	37	PCL-O-25	Daun tua	<i>Phomopsis</i> sp.
14	PCL-Y-34-B	Daun muda	<i>Fusarium</i> sp.	38	PCL-O-26	Daun tua	<i>Colletotrichum</i> sp.
15	PCL-Y-37	Daun muda	<i>Colletotrichum</i> sp.	39	PCL-O-27	Daun tua	<i>Arthrinium</i> sp.
16	PCL-Y-38-B	Daun muda	<i>Arthrinium</i> sp.	40	PCL-O-28	Daun tua	<i>Colletotrichum</i> sp.
17	PCL-Y-46	Daun muda	<i>Colletotrichum</i> sp.	41	PCL-O-29	Daun tua	<i>Colletotrichum</i> sp.
18	PCL-Y-48	Daun muda	<i>Phomopsis</i> sp.	42	PCL-O-30	Daun tua	<i>Colletotrichum</i> sp.
19	PCL-Y-49	Daun muda	<i>Arthrinium</i> sp.	43	PCL-O-31	Daun tua	<i>Daldinia</i> sp.
20	PCL-Y-50-B	Daun muda	<i>Colletotrichum</i> sp.	44	PCL-O-32	Daun tua	<i>Daldinia</i> sp.
21	PCL-Y-51	Daun muda	<i>Colletotrichum</i> sp.	45	PCL-O-34	Daun tua	<i>Colletotrichum</i> sp.
22	PCL-Y-52	Daun muda	<i>Colletotrichum</i> sp.	46	PCL-O-35	Daun tua	<i>Phomopsis</i> sp.
23	PCL-Y-54	Daun muda	<i>Colletotrichum</i> sp.	47	PCL-O-36	Daun tua	<i>Phomopsis</i> sp.
24	PCL-Y-57-A	Daun muda	<i>Colletotrichum</i> sp.	48	PCL-O-38	Daun tua	<i>Phomopsis</i> sp.

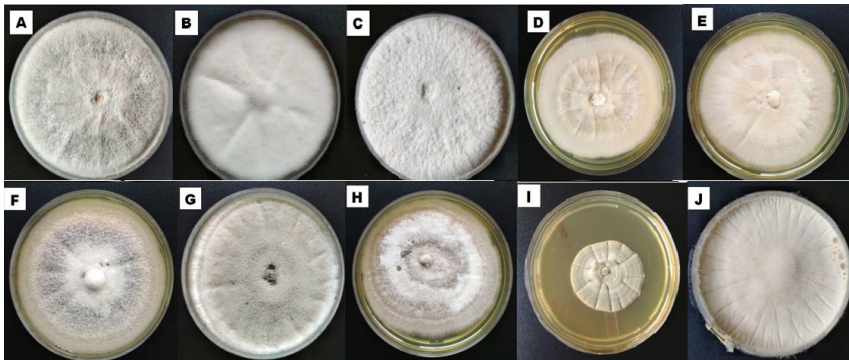
Tabel 2.1. memperlihatkan jenis taksa yang mengkolonisasi tanaman sungkai. Sebanyak 26 jamur endofit ditemukan pada daun muda (54%), sedangkan 22 endofit ditemukan pada daun tua (46%). Dari jumlah tersebut, 20 endofit (41,67%) diidentifikasi sebagai *Colletotrichum*, 10 (20,83%) sebagai *Phomopsis*, 6 (12,5%) sebagai *Arhtrinium*, dan sisanya masing-masing endofit jamur berjumlah kurang dari 5%. Hal ini berbeda dengan peneliitan sebelumnya yang mendeskripsikan 12 endofit jamur dan 7 genus dari sungkai yang berasal dari Palembang, Sumatera, Indonesia (*Cylindrocarpon*, *Phytium*, *Trichoderma*, *Lasiodiplodia*, *Penicillium*, *Plectospora*, dan *Phialophora*).



Gambar 2.2. Keanekaragaman Jamur Endofit yang Diisolasi dari Tanaman Sungkai (*Peronema canescens*)
Sumber: Foto koleksi pribadi

Contoh lain adalah biodiversitas endofit dari tanaman *Houttuynia cordata* (amis-amisan). Beberapa penelitian terkait

eksplorasi jamur endofit dari *H. cordata* telah dilakukan. Perbedaan lokasi pertumbuhan tanaman inang menyebabkan spesies jamur endofit bervariasi. Sebuah penelitian oleh Talukdar dan rekan-rekannya pada tahun 2020 mengungkapkan 56 jamur endofit yang diisolasi dari *H. cordata* di timur laut India, termasuk dalam genus *Colletotrichum*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Pseudozyma*, dan *Corynespora* (Talukdar *et al.*, 2020). Eksplorasi lain terhadap *H. cordata* dari Tiongkok mengungkapkan berbagai spesies *Ilyonectria liriodendra*, *Penicillium* sp., dan *Chaetomium globusum* (Ye *et al.*, 2021). Penelitian Tamhid *et al.*, (2024) menunjukkan bahwa keanekaragaman endofit pada tanaman obat *H. cordata* dari Indonesia lebih besar pada daun daripada pada batang. Lebih lanjut, penyelidikan tersebut juga mengidentifikasi empat spesies jamur yang belum pernah diisolasi dari *H. cordata*: *Fusarium* sp., *Phomopsis* sp., *Cladosporium* sp., dan *Ceratobasidium* sp. Penulisan ini berkontribusi pada bukti yang ada bahwa tanaman inang tunggal dapat berfungsi sebagai habitat bagi berbagai macam endofit, dengan spesies spesifik yang bervariasi berdasarkan lokasi geografis tanaman.



Gambar 2.3. Karakteristik Sepuluh Jamur Endofit Terpilih yang Berasosiasi dengan *Houttuynia cordata* Thunb

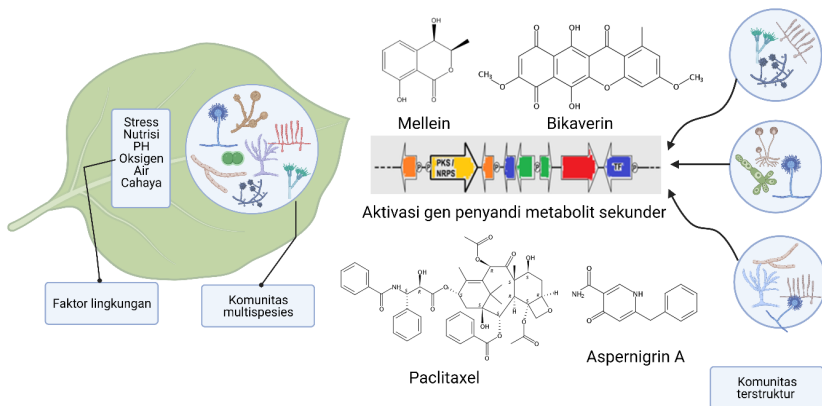
Jamur dikulturkan pada PDA, diinkubasi selama 10 hari pada suhu 27 °C: (A) *Colletotrichum* sp. HCL-1, (B) *Colletotrichum* sp. HCL-2, (C) *Phomopsis* sp. HCL-5, (D) *Fusarium* sp. HCL-8, (E) *Fusarium* sp. HCL-9.1, (F) *Fusarium* sp. HCL-10, (G) *Colletotrichum* sp. HCL-11, (H) *Fusarium* sp. HCL-15, (I) *Cladosporium* sp. HCS-2, dan (J) *Ceratobasidium* sp. HCS-3.

Dari dua contoh studi biodiversitas endofit di atas terlihat bahwa setiap tanaman dapat dikolonisasi oleh jenis jamur yang berbeda. Organ tanaman yang berbeda juga dikoloni oleh jenis jamur yang berbeda. Hal ini menunjukkan besarnya potensi keanekaragaman jamur di Nusantara. Selain itu, lokasi tempat tumbuh tanaman juga berpengaruh terhadap jenis endofit yang mengkolonisasi. Beberapa fakta tersebut harus menjadi pertimbangan dalam isolasi endofit.

3

JAMUR ENDOFIT SEBAGAI SUMBER METABOLIT SEKUNDER

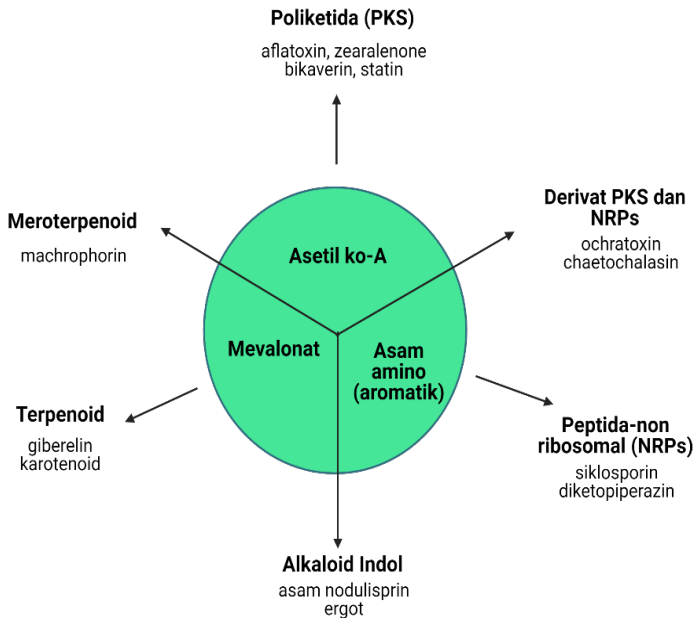
Sebagai organisme saprofit, jamur endofit dapat memanfaatkan material dari lingkungannya sebagai sumber hara untuk membangun senyawa metabolit primer dan sekunder. Di dalam lingkungan alaminya (di dalam organ tanaman), terdapat komunitas multispecies yang dapat terdiri dari bakteri, jamur, atau organisme lain. Organisme tersebut dapat berinteraksi satu sama lain dengan berbagai mekanisme, di antaranya melalui komunikasi kimiawi (*chemical talk*), yaitu jamur memproduksi senyawa yang dapat digunakan untuk bertahan hidup pada tanaman dengan cara menghambat pertumbuhan jamur yang lain, merebut zat hara dari jamur lain (prinsip kompetisi), atau menghasilkan senyawa kimia untuk bertahan hidup berdampingan demi membentuk komunitas yang tidak saling mengganggu. Senyawa kimia ini dihasilkan jamur untuk dapat bertahan hidup dan berkompetisi satu sama lain dalam tanaman. Senyawa tersebut disintesis ketika gen penyandi metabolit sekunder teraktivasi oleh adanya pengaruh luar apakah karena adanya jamur/organisme lain, dan juga karena faktor lingkungan seperti faktor stress, nutrisi, PH, oksigen, ketersediaan air, dan cahaya matahari (Gambar 3.1).



Gambar 3.1. Jamur Endofit dalam Lingkungan Alami (Tanaman)
 Sumber: Triastuti (2018)

Golongan Senyawa yang Dihasilkan oleh Endofit

Berdasarkan senyawa prekursoranya, metabolit yang dihasilkan oleh jamur endofit dapat diklasifikasikan menjadi: (1) peptida nonribosomal (nonribosomal peptides/NPRs) dan senyawa turunan asam amino, (2) poliketida dan turunan asam lemak, (3) terpenoid, dan (4) alkaloid indol (Zeilinger *et al.*, 2015) (Gambar 3.2).



Gambar 3.2. Kelas Utama Metabolit Sekunder Jamur Endofit dan Senyawa Prekursornya

Sumber: Dimodifikasi dari Zeilinger *et al.*, 2015

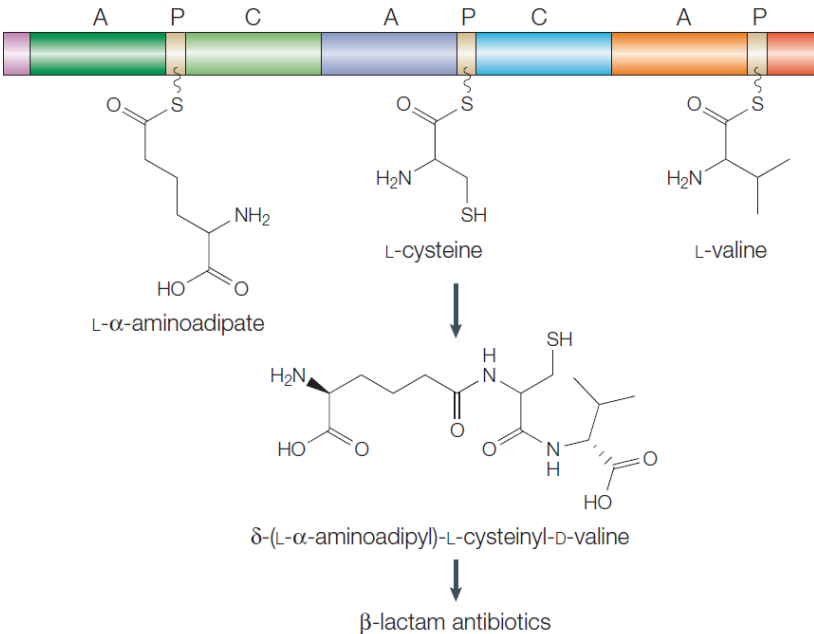
Sebagian besar senyawa metabolit sekunder jamur dibentuk dari jalur asetil ko-A, mevalonat, dan asam amino serta dibantu oleh enzim poliketida sintase (PKS), peptida non ribosomal (NRPs), hibrid PKS-NRPs, dan terpen siklase. Meroterpenoid merupakan gabungan dari prekursor terpenoid dan poliketida.

1. Senyawa Nonribosomal Peptide (NRPs)

NRPs terdiri dari asam amino proteinogenik dan non proteinogenik dan dibentuk melalui biosintesis secara independen dari fungsi ribosom oleh enzim NRPS multi modular. Urutan linier modul dalam enzim biasanya sesuai dengan urutan asam amino yang dihasilkan dalam produk peptida. Pertama-tama, asam amino diaktivasi melalui konversi menjadi ester AMP, yang kemudian mengikat enzim melalui ikatan tioester. Residu ditahan sehingga memungkinkan serangkaian formasi ikatan peptida berurutan

sampai peptida akhirnya dilepaskan dari enzim. Modul umum terdiri dari domain adenilasi (A), domain protein pembawa peptidil (P), dan domain kondensasi (C) atau elongasi (gambar 3.3). Domain A mengaktifkan asam amino spesifik sebagai aminoacyladenylate, yang kemudian ditransfer ke domain P membentuk aminoacyl thioester (Dewick, 2009; Keller *et al.*, 2005).

NRPs bisa bermacam-macam panjangnya, termasuk zat-zat seperti tripeptide beta-laktam, obat immunosupresan dekapeptida siklik siklosporin, siderophores variabel struktural, diketopiperazine (DKP) dan siklopeptida. Sebuah subkelompok DKP, menampilkan baik kelompok tiometil atau jembatan disulfida, yang disebut epipolythiodioxopiperazines (ETPs) terdiri dari metabolit toksik khas dari jamur berserabut (filamen) (Prado *et al.*, 2012).



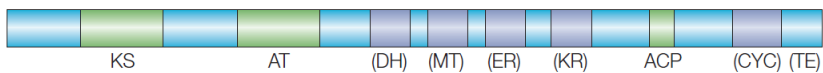
Gambar 3.3. Modular *Nonribosomal Peptide Synthetase*

Contoh ACV sintetase, suatu trimodular NRPs nonribosomal peptide sintetase sebagai langkah pertama dalam biosintesis

penicillin dan cephalosporin biosynthesis. Setiap asam amino dikenali dan diaktivasi oleh domain adenilasi (A), dan dilampirkan ke domain karier peptide (P) sebagai thioester to 4'-phosphopantetheine. Ikatan peptide terbentuk dengan keterlibatan domain kondensasi (C). Tripeptida terakhir, menempel pada domain karier peptide dari modul terminal C, dilepaskan oleh domain thioesterase terintegrasi (TE), dengan L-valine terisomerisasi ke D-valine. Tripeptida tersebut selanjutnya mengalami sikliksi menjadi isopenicillin N.

2. Poliketida

Poliketida adalah kelompok metabolit sekunder yang paling melimpah dan dibentuk melalui jalur poliketida oleh sintase poliketida tipe I (PKS) melalui kondensasi asetil-koenzim A (KoA) dan malonil-KoA selama reaksi kondensasi. Poliketida terutama diproduksi oleh spesies jamur *Penicillium*, *Fusarium*, dan *Alternaria* (Daley *et al.*, 2016). PKS pada jamur setidaknya mengandung ketoasil sintase, asil transferase, dan domain phosphopantetheine dan sebagian besar enzim ini mensintesis poliketida dengan berulang kali menambahkan dua unit karbon ke dalam rantai strukturnya (gambar 3.4). Golongan poliketida jamur terdiri dari mikotoksin aflatoksin dan fumonisin, pigmen bikaverin dan fusarubin, dan agen antikolesterolemia lovastatin dan compactin (Dewick, 2009; Hill, 2006; Keller *et al.*, 2005; Zeilinger *et al.*, 2015). PKS juga dapat dihibridisasi dengan NRPs yang memasukkan asam amino ke dalam struktur poliketida (Prado *et al.*, 2012).

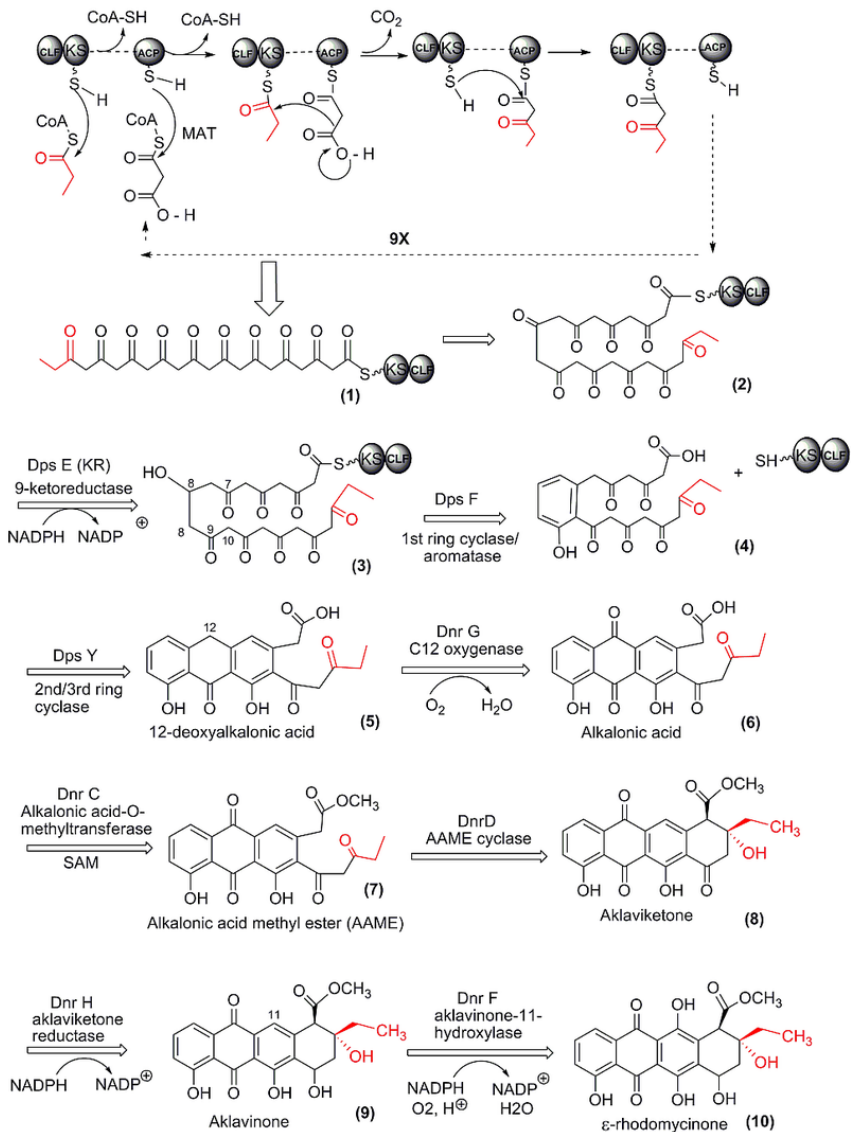


Gambar 3.4. Struktur Domain *Polyketide Synthase* (PKS) Jamur

Struktur minimal tersusun dari KS-AT-ACP. Tanda kurung menyatakan domain opsional. Sintesis poliketida dimulai ketika asetil dan malonil koenzim A (CoA) dimuat sebagai tioester pada domain 4'-phosphopantotheine dari domain pembawa asil (ACP)

melalui domain asiltransferase (AT). Kondensasi kemudian terjadi dengan perantara tioester lain yang terikat ke domain ketoasil CoA sintase (KS), dan dekarboksilasi dari zat antara terikat ACP terjadi. B-ketothioester yang dihasilkan kemudian dapat direduksi dengan aksi domain ketoreduktase (KR), diikuti oleh dehidrasi oleh domain dehidratase (DH). Jika terdapat domain enoyl reductase (ER), maka terbentuk perantara tak jenuh. Beberapa PKS mengandung domain methyltransferase (MT) yang memetilasi α -karbon dari thioester. CYC, siklase; TE, thioesterase (Triastuti, 2018).

Contoh biosintesis senyawa poliketoda ϵ -Rhodomycinone ditampilkan pada gambar 3.5.

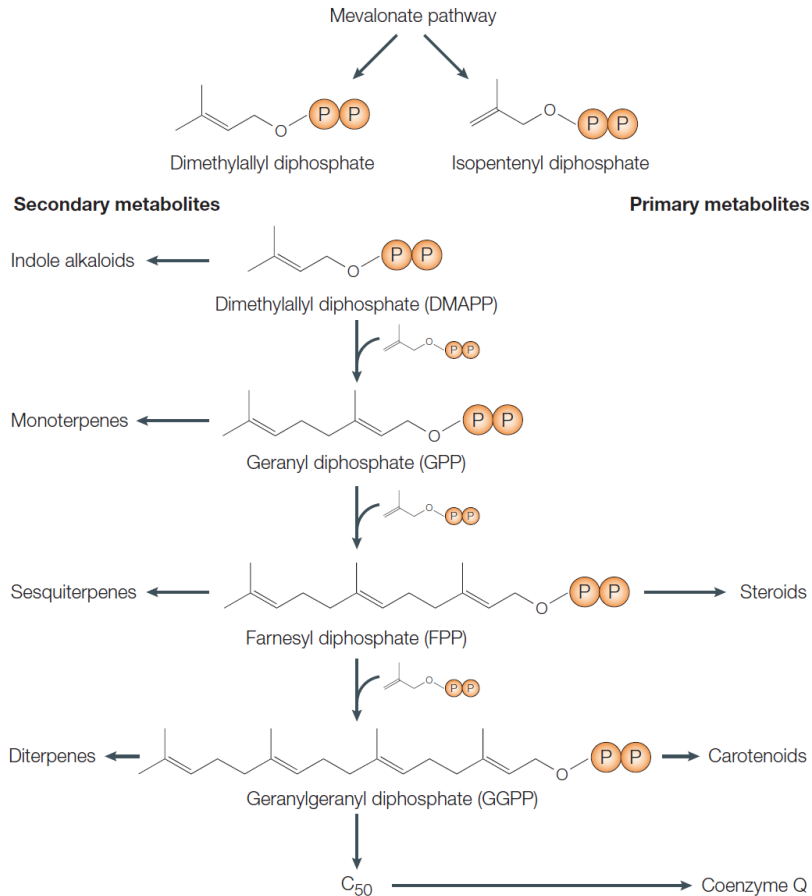


Gambar 3.5. Contoh Skema Biosintesis Senyawa Poliketida pada Jamur Endofit

Sumber: Triastuti, 2018

3. Terpenoid

Terpenoid terdiri dari beberapa unit isoprena, dapat linier atau siklik, jenuh atau tidak jenuh, dan dapat dimodifikasi dengan berbagai cara. Enzim kunci dalam biosintesis terpena adalah terpena cyclases termasuk sesquiterpena cyclases dan diterpen cyclases untuk pembentukan kompleks terpena siklik, prenyl transferases untuk sintesis indole diterpenes dan phytoene synthases untuk pembentukan karotenoid (Keller *et al.*, 2005; Zeilinger *et al.*, 2015). Metabolit sekunder hibrida terpenoid yang umum juga dikenal, yaitu meroterpenoid, yang terdiri dari poliketida dan isopren, serta hibrida peptida poliketida-nonribosomal (Dewick, 2009; Kück *et al.*, 2014). Biosintesis terpenoid ditampilkan pada gambar 3.6.



Gambar 3.6. Biosintesis Terpenoid
 Sumber: Keller *et al.*, 2005

Isopentenil difosfat (pirofosfat/IPP) dan isomernya dimetilalil difosfat (DMAPP) yang merupakan produk dari jalur mevalonat, adalah blok pembangun unit isoprena C5 untuk poliprenil difosfat linier. Enzim isoprenyl difosfat sintase bertanggung jawab untuk pemanjangan rantai. DMAPP dan zat antara isoprenoid juga merupakan titik awal untuk berbagai metabolit sekunder, termasuk alkaloid indol, monoterpen, seskuiterpen, dan diterpen. Terpen diproduksi dengan siklisasi isoprenoid. Misalnya, farnesyl difosfat

disiklik untuk menghasilkan berbagai macam seskuiterpen, tergantung pada struktur dan fungsinya. DMAPP dapat ditambahkan sebagai rantai samping pada berbagai senyawa aromatik. Misalnya, ergotamin diturunkan dari dimetilalil triptofan (Keller *et al.*, 2005).

4. Alkaloid

Alkaloid terdiri dari senyawa terkait yang disintesis sebagai campuran kompleks dengan kontribusi jalur asam shikimat dan jalur mevalonat karena biasanya berasal dari asam amino triptofan aromatik dan dimethyl pirofosfat. Metabolit yang dikarakterisasi dengan baik dari kelas ini adalah alkaloid ergot yang terutama diproduksi oleh spesies *Claviceps*, roquefortine C, dan senyawa terkait seperti meleagrins dan glandicolines yang berasal dari spesies *Penicillium* (Zeilinger *et al.*, 2015).

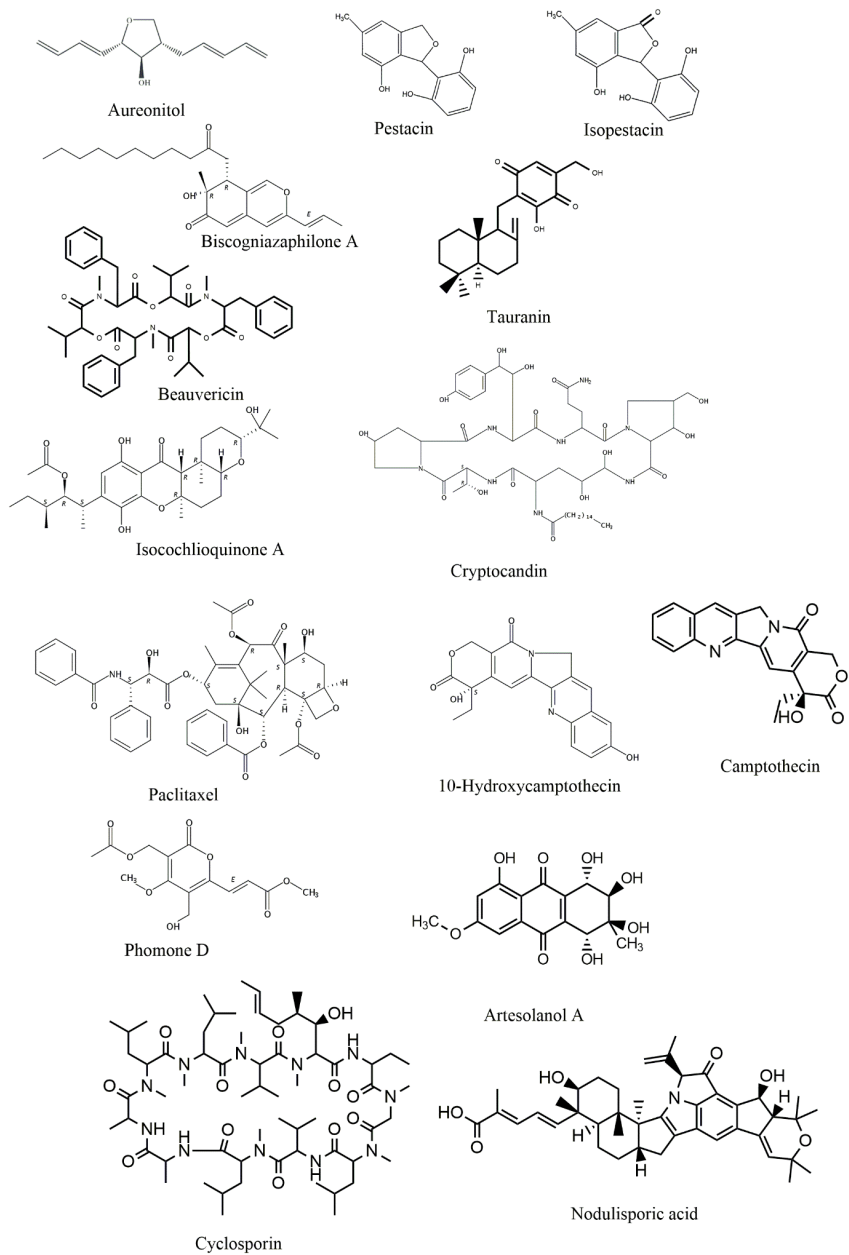
Dalam bidang kedokteran, skrining kimia kultur jamur endofit telah menghasilkan berbagai produk alami yang potensial dengan sifat antimikroba, antiparasit, sitotoksik, neuroprotektif, antioksidan, atau immunosupresan (Aly *et al.*, 2011; Gunatilaka, 2006; Newman dan Cragg, 2015; Smith *et al.*, 2008) (Tabel 3.1 dan Gambar 3.7).

Tabel 3.1. Contoh Metabolit yang Diisolasi dari Jamur Endofit dan Aktivitas Farmakologinya

Metabolit	Golongan Senyawa	Aktivitas	Jamur Endofit	Referensi
Aureonitol-(+)	Derivat Aromatics- aryl sederhana	Antibakteri	<i>Chaetomium globosum</i> dari tanaman tomat	(Kurt <i>et al.</i> , 2016)
Biscogniazaphilone A dan Biscogniazaphilone B	Azaphilone 2-benzopyrans	Anti mycobacterium	<i>Biscogniauxia formosana</i> BCRC 33718 dari <i>Cinnamomum</i> sp.	(Cheng <i>et al.</i> , 2012)
Cochlioquinone A dan isochochlioquinone A	Meroterpenoid	Anti Leishmania amazonensis	<i>Cochliobolus sativus</i> dari tanaman <i>Vernonia polyanthes</i>	(do Nascimento <i>et al.</i> , 2015)

Metabolit	Golongan Senyawa	Aktivitas	Jamur Endofit	Referensi
Cycloepoxylactone	Monocarbocyclic polyketides	Antijamur, antibakteri, antialga	<i>Phomopsis</i> sp dari tanaman <i>Laurus azorica</i>	(Hussain <i>et al.</i> , 2009)
Cryptocandin	Lipopeptide	Antijamur	<i>Cryptosporiopsis cf. quercina</i> dari <i>Tripterygium wilfordii</i>	(Strobel <i>et al.</i> , 1999)
Deacetyl-mycopoxydiene	Monocarbocyclic polyketides	Antikanker	<i>Phomopsis</i> sp. pada tanaman bakau	(Zhu <i>et al.</i> , 2015)
7-desmethyl fusarin C -derivates	Miscellaneous pyrrolidine alkaloids	Antibakteri terhadap <i>E. coli</i>	<i>Fusarium solani JK10</i> dari <i>Chlorophora regia</i>	(Kyekyeku <i>et al.</i> , 2017)
Epichlicin	Cyclic peptide	Antijamur	<i>Ephichloe typina</i> dari <i>Phleum pretense</i>	(Seto <i>et al.</i> , 2007)
Eremoxylarin B	Sesquiterpen eremophilane	Inhibitor calcineurin	<i>Xylariaceae</i> sp. galur YUA-026	(Nicoletti and Fiorentino, 2015)
Huperzine A, Huperzine B	Sesquiterpen alkaloid	Inhibitor acetylcholine esterase	Jamur endofit dari <i>Huperzia serrata</i>	(Newman and Cragg, 2015)
Pestalofone F	Turunan asam amino dan peptida - Xanthones	Antikanker pada sel HeLa dan MCF-7 cells	<i>Pestalotiopsis fici</i>	(Kumar and Kaushik, 2012)
Phaeosphaeride A	Alkaloid	Inhibitor STAT3-	Jamur dari <i>Phaeosphaeria avenaria</i>	(Maloney <i>et al.</i> , 2006)
Phomone D	Polyketida	Antikanker	<i>Phoma</i> sp. YN02-P-3	(Li <i>et al.</i> , 2018)
Pycnophorin	Meroterpenoid	Antibakteri terhadap <i>S. aureus</i> dan <i>B. subtilis</i>	<i>Botryosphaeria dothidea</i> dari tanalan <i>Melia azedarach</i>	(Xiao <i>et al.</i> , 2014)
L 755807 (3,4-Epoxy-5-hydroxy-5-isopropyl-1-(8,10,12-trimethyl-2,4,6,8-tetradecatetraenoyl)-2(5H)-pyrrolidinone)	Alkaloid Tetramic acids	Inhibitor ikatan bradikinin	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	(Lam <i>et al.</i> , 1996)

Metabolit	Golongan Senyawa	Aktivitas	Jamur Endofit	Referensi
Paclitaxel	Diterpenoid	Antikanker	<i>Taxomyces andreanae</i>	(Heinig <i>et al.</i> , 2013)
Torreyanic acid	Alifatik poli-siklohetero-alisiklik	Sitotoksik	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	(Kaul <i>et al.</i> , 2012)
10-Hydroxycamptothecin	Alkaloid camptothecin	Antikanker	<i>Fusarium solani</i> dari <i>Camptotheca acuminata</i>	(Pu <i>et al.</i> , 2013)



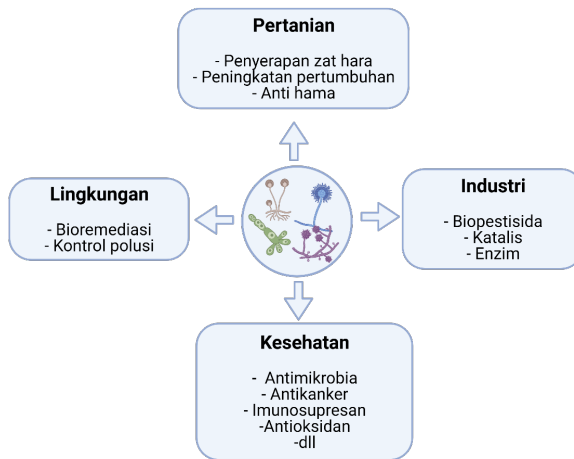
Gambar 3.7. Beberapa Struktur Senyawa Kimia dari Metabolit yang Diproduksi Jamur Endofit
Sumber: Triastuti, 2018

Dari tabel 3.1 dan gambar 3.7 dapat ditarik kesimpulan bahwa jamur endofit memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa dari berbagai jenis golongan kimia, dengan struktur yang bermacam-macam dan aktivitas farmakologi yang berde-a-beda. Tak heran jika jamur endofit diproyeksikan sebagai "*bioreactor*" atau "mesin biologi" karena kemampuannya tersebut. Dalam istilah penulis, bisa disebutkan bahwa endofit adalah bahan alam *underrated* karena potensinya yang luar biasa namun belum banyak dieksplorasi karena kurang dikenal. Dalam bab berikutnya akan dijelaskan manfaat jamur endofit yang menunjukkan potensi pengembangannya sebagai sumber senyawa terapeutik dan komersial.

4

APLIKASI ENDOFIT

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa jamur endofit mampu menghasilkan sejumlah metabolit sekunder bioaktif yang penting, yang sampai saat ini hanya diketahui dari tumbuhan, sehingga meningkatkan potensi penggunaan endofit sebagai sumber alternatif untuk metabolit tersebut (Aly *et al.*, 2011). Penerapan endofit sangat luas, mulai dari pertanian hingga keperluan pengobatan (Maheshwari, 2017) (gambar 4.1).



Gambar 4.1. Aplikasi Jamur Endofit
Sumber: Dimodifikasi dari Maheswari (2017)

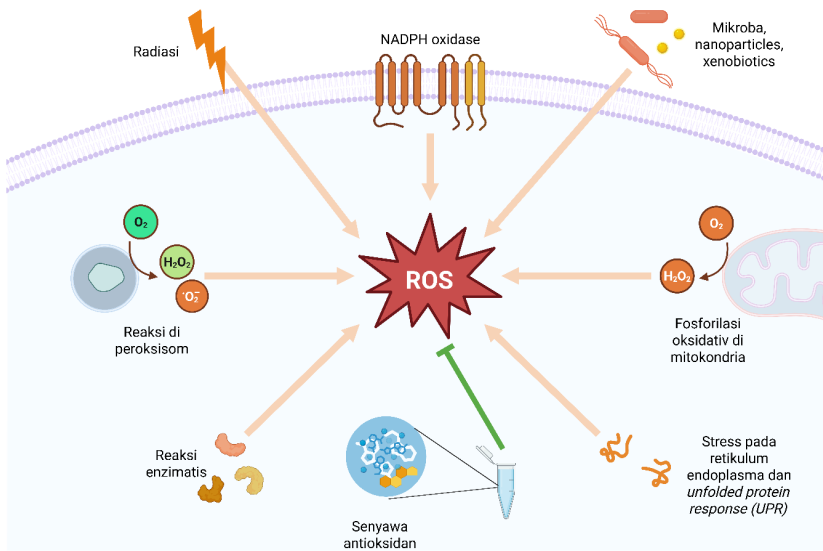
A. Aplikasi Endofit dalam Bidang Kesehatan

Endofit menghasilkan metabolit sekunder dengan beberapa aktivitas farmakologi yang telah banyak dipublikasikan dan bahkan telah disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA). Aktivitas tersebut misalnya sebagai antioksidan, antibakteri, antijamur,

antikanker, dan antiinflamasi. Berikut dijelaskan aktivitas jamur endofit berikut jamur penghasilnya.

1. Endofit sebagai Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang berfungsi mencegah terjadinya oksidasi senyawa kimia karena radikal bebas dan spesies oksigen reaktif (ROS). Radikal bebas dan ROS dapat memperantarai beberapa proses patologi seperti karsinogenesis, kerusakan DNA, sindrom metabolik (diabetes, hipertensi, atau hiperlipidemia) dan penyakit degeneratif seperti penyakit Alzheimer. Eksplorasi senyawa antioksidan umumnya diperoleh dari tanaman obat sebagai terapi alternatif untuk mengobati penyakit terkait spesies oksigen reaktif yang menyerang manusia.



Gambar 4.2. Mekanisme Pembentukan Spesies Oksigen Reaktif (ROS) dan Mekanisme Antioksidan dari Jamur Endofit
Gambar dibuat dengan BioRender

Beberapa antioksidan alami yang diisolasi dari endofit di antaranya adalah: pestacin, isopestacin, graphislactone A

yang diproduksi oleh jamur endofit *Pestalotiopsis microspore*, corynesidone A dan B, 2,14-dihydroxy-7-drimen-12,11-olide, lapachol, coumarin, 5-(hydroxymethyl)-2-furanocarboxylic acid, phloroglucinol, tetrahydroxy-1-methylxanthone, salidroside, p-tyrosol, borneol, dan rutin. Selain itu juga telah dilaporkan aktivitas antioksidan dari ekstrak jamur endofit *Cepalosporin* spp. yang diisolasi dari *Terminalia morobensis* dan *Tracheospermum jasminoides*. Senyawa-senyawa dengan sifat antioksidan ini efektif dalam menekan kerusakan akibat radikal bebas yang berasal dari oksigen dan ROS. Meskipun penelitian telah dilakukan pada antioksidan, uji klinisnya masih sangat terbatas. Dibutuhkan penelitian lanjutan untuk menemukan antioksidan yang baru dan efektif.

2. Endofit sebagai Antimikroba

Resistensi antibiotik merupakan permasalahan yang sangat urgen untuk diatasi pada kasus penyakit menular. Penyakit menular (infeksi) adalah salah satu penyebab utama kematian setelah gangguan kardiovaskular dan kanker (World Health Organization, 2022). Untuk mengatasi masalah yang mendesak ini, upaya untuk menemukan agen antimikroba baru yang efektif dan memiliki efek samping minimal sangat penting dilakukan. Jamur endofit telah dikenal baik karena kemampuannya untuk menghasilkan beragam metabolit sekunder seperti alkaloid, terpenoid, flavonoid, dan poliketida. Senyawa-senyawa tersebut telah menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap berbagai mikroorganisme patogen seperti *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Shigella flexneri*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *F. oxysporum*, *human immunodeficiency virus* (HIV), herpes simplex virus (HSV) dan influenza virus (H1N1).

Dalam beberapa tahun terakhir, senyawa bioaktif telah banyak diisolasi dari jamur endofit, yang menunjukkan aktivitas antimikroba yang poten. Senyawa tersebut di antaranya Fumigaclavine C dan fraxetin yang diproduksi oleh *A. fumigatus* yang diisolasi dari tanaman

Ceriops decandra dengan aktivitas antibakteri yang kuat terhadap *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus*, dan *P. aeruginosa*. Aktivitas antibakteri juga ditunjukkan oleh Cristatumin B, asam quiannulatic, dan Dihydroauroglaucin, yang diisolasi dari *Aspergillus niger*, dan jamur *Emericella* sp. Senyawa-senyawa ini telah menunjukkan aktivitas spektrum luas terhadap bakteri patogen seperti *E. faecalis*, *K. pneumonia*, dan *P. aeruginosa*., dan *Staphylococcus aureus* yang resistan terhadap banyak obat (MDRSA). Demikian pula jamur *Athelia rolfsii* yang diisolasi dari *Coleus amboinicus* menghasilkan senyawa aromatik yang mengandung gugus metoksi, hidroksil, dan metil yang menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat terhadap *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, dan *Streptococcus mutans*. Selain itu, *Penicillium citrinum* yang diisolasi dari *Digitaria bicornis* menghasilkan ciprofloxacin, yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, dan *S. typhi*.

Jamur endofit juga menghasilkan senyawa yang bersifat sebagai antijamur. Di antaranya 7-Hydroxycoumarine, β -asarone, diphenyl sulfone, dan griseofulvin, yang diproduksi oleh *Curvularia protuberate* yang diisolasi dari tanaman *Paspalidium favidum* menunjukkan aktivitas antijamur terhadap *Alternaria alternata* dan *F. oxysporum*. Asam 3-fenilpropionat yang berasal dari *Cladosporium cladosporioides* yang diisolasi dari tanaman *Zygophyllum mandavillei* menunjukkan sifat antijamur terhadap *Aspergillus flavus* dan *F. solani*. Aplojaveediins AF yang diekstraksi dari jamur endofit *Aplosporella javeedii* yang ditemukan bersama dengan *Orychophragmus violaceus* menunjukkan aktivitas penting terhadap *C. albicans*. Demikian pula, *F. oxysporum* KU527806 endofit yang diisolasi dari *Dendrobim lindley* mensintesis Gibepyrone A, Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl) dan asam indole asetat yang menunjukkan aktivitas penghambatan yang signifikan terhadap spesies *C. albicans*, *Candida tropicalis*, *Curvularia*, dan *Fusarium*. Demikian pula, *Lophodermium nitens* DAOM 250027 endofit yang diisolasi dari *Pinus strobus* menghasilkan methoxysdonol dan turunannya pyrenophorin, yang menunjukkan aktivitas antijamur terhadap *S. cerevisiae*. Selain itu, Phialomustin C

dan D yang diisolasi dari *Phialophora mustea* endofit yang hidup pada tanaman *Crocus sativus* menunjukkan aktivitas antijamur terhadap *C. albicans* dengan nilai IC50 masing-masing sebesar 14,3 dan 73,6 μ M.

Jamur endofit juga dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antivirus. Di antaranya endofit *Acremonium* sp. MER V1 dan *Chaetomium* sp. MER V7 yang diisolasi dari *Avicennia marina* menunjukkan aktivitas antivirus terhadap virus hepatitis C. Phomanolide B yang diperoleh dari endofit *Phoma* sp. menunjukkan sifat antivirus terhadap virus influenza, sedangkan senyawa bioaktif baru Aspulvinone E, yang diperoleh dari jamur endofit *A. terreus* menunjukkan aktivitas antivirus yang kuat terhadap HIV. *Pestalotiopsis thea* adalah jamur endofit yang menghasilkan metabolit aktif seperti chloroisosulochrin, ficipyrone A dan asam pestheic. Chloroisosulochrin menunjukkan aktivitas penghambat *antirespiratory syncytial viral* (RSV) yang maksimal, sedangkan dua senyawa lainnya menunjukkan aktivitas sedang terhadap virus. Endofit *Pleospora tarda* menghasilkan alternariol dan alternariol-(9)-methyl ester yang menunjukkan aktivitas penghambatan sedang terhadap HSV (40%). Lebih jauh lagi, endofit jamur seperti *Nigrospora sphaerica*, *Acremonium strictum*, *Phoma leveillei*, *Aspergillus flavus*, *Chaetomium globosum*, *Mucor fuscus*, *Acremonium strictum*, dan *Penicillium chrysogenum*, yang diisolasi dari *Chiliadenus montanus*, *Launea spinosa*, *Euphorbia sancta*, *Stachys aegyptiaca*, *Hypericum sinaicum*, *Stachys aegyptiaca*, dan *Launea spinosa*, masing-masing, menunjukkan aktivitas lemah hingga sedang (2–14%) terhadap HSV. Penelitian jamur endofit terkait penghambatan virus COVID-19 juga telah dilakukan. Temuan awal menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat dari endofit *Curvularia papendorffii* menunjukkan aktivitas antivirus yang poten terhadap human coronavirus HCoV229E dan feline coronavirus (FCV F9) (Adeleke & Babalola, 2021).

3. Endofit sebagai Antidiabetes

Diabetes melitus (DM) adalah gangguan metabolisme kronis yang ditandai dengan peningkatan kadar glukosa dalam

darah (hiperglikemia) dan gangguan metabolisme karbohidrat, protein, dan lemak. DM yang tidak terkontrol mengakibatkan komplikasi pada gangguan kardiovaskular, retinopati, nefropati, dan neuropati. Prevalensi DM dilaporkan terus meningkat, dan proyeksi menunjukkan bahwa pada tahun 2030 sekitar 522 juta orang akan menderita DM. Indonesia merupakan negara keempat di dunia dengan penderita DM terbanyak (Kemenkes RI, 2019). Salah satu strategi pengelolaan penyakit DM adalah penghambatan enzim α -glukosidase dan α -amilase. Enzim-enzim ini memainkan peran penting untuk pemecahan karbohidrat selama pencernaan. Dengan memperlambat aktivitasnya, laju pencernaan karbohidrat dan penyerapan glukosa berikutnya ke dalam aliran darah dapat dikurangi, yang mengarah pada kontrol kadar glukosa darah yang lebih baik. Penghambatan pada kedua enzim ini merupakan pendekatan yang efektif dalam mengelola DM dan mengurangi hiperglikemia.

Studi terbaru telah menunjukkan bahwa jamur endofit memiliki potensi untuk berfungsi sebagai inhibitor enzim α -glukosidase dan α -amilase. Senyawa S (+)-2 cis 4-trans abscisic acid dan 7' hydroxyl abscisic acid, 4' deshydroxyl, dan altersolanol A yang diisolasi dari *Nigrospora oryzae*, endofit yang berasosiasi dengan *Combretum dolichopetalum* mampu menurunkan kadar gula darah pada tikus diabetes. S (+)-2 cis 4-trans abscisic acid secara spesifik menunjukkan sifat antidiabetik dengan meningkatkan aktivitas reseptor *Peroxisome proliferator-activated gamma* (PPAR γ) pada sel imun. Selain itu, senyawa Thielavin A, J, dan K yang diperoleh dari isolat jamur endofit MEXU 27095 menunjukkan penghambatan α -glukosidase yang bergantung pada dosis, dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 15,8; 22,1; dan 23,8 μ M. Demikian pula, Aspergiamides A dan F, yang diisolasi dari *Aspergillus* sp. yang berasal dari tanaman *Sonneratia apetala*, menunjukkan aktivitas penghambatan α -glukosidase dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 40 μ M dan 83 μ M. Peptida yang diproduksi oleh *Aspergillus awamori* secara signifikan menghambat aktivitas α -glukosidase dan α -amilase dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 3,75 dan 5,62

$\mu\text{g/mL}$. Peptida tersebut stabil pada berbagai kondisi pH dan suhu dan menunjukkan sifat nonmutagenik.

Senyawa lain juga telah dilaporkan sebagai inhibitor α -amilase, seperti K-10, ekstrak metanol flavon polimetoksilasi dari *Aspergillus egypticus* -HT166S endofit yang diisolasi dari *Helianthus tuberosus* menunjukkan penghambatan α -amilase yang mirip dengan obat standar akarbosa. Demikian pula, endofit dari *Stemphylium globuliferum* PTFL005 dan PTFL011 menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap α -glukosidase dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 17,37 dan 10,71 $\mu\text{g/mL}$. Selain itu, *Stemphylium globuliferum* PTFL005 dan PTFL006 menunjukkan aktivitas penghambatan α -amilase dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 15,48 dan 13,48 $\mu\text{g/mL}$. Contoh lainnya adalah *Alternaria destruens* endofit yang diisolasi dari *Calotropis gigantea* menunjukkan penghambatan lemah terhadap α -amilase (31%) dan penghambatan kuat terhadap α -glukosidase (93%). Demikian pula, *Xylariaceae* sp. QGS01, *Penicillium citrinum*, dan *Colletotrichum* sp. juga dilaporkan sebagai penghambat α -glukosidase yang potensial.

Jamur yang diisolasi dari laut dan perairan bakau juga memiliki aktivitas antidiabetik yang menjanjikan. Senyawa sesquiterpene eremophilane dari endofit *Xylaria* sp., dan diterpene isopimarane dan 11-deoxydiapothein A dari *Epicoccum* sp. HS-1 secara signifikan menghambat enzim α -glukosidase. Demikian pula, tripalmitin, inhibitor campuran yang berasal dari endofit bakau *Zasmidium* sp. strain EM5-10 menunjukkan aktivitas penghambatan yang signifikan terhadap α -glukosidase dibandingkan dengan akarbosa. Penelitian dengan teknik *in silico* terhadap senyawa tripalmitin menunjukkan lokasi ikatan yang sama akarbosa serta lokasi alosterik tambahan pada α -glukosidase usus manusia. Penelitian ini mendukung pembuktian ilmiah aktivitas tripalmitin untuk dapat dikembangkan sebagai obat DM. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa endofit berpotensi sebagai penghambat α -amilase dan α -glukosidase baru, yang dapat berkontribusi pada peningkatan pengelolaan DM (Adeleke & Babalola, 2021).

4. Endofit sebagai Antiprotozoa

Protozoa seperti *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium falciparum*, dan *Leishmania amazonensis* menyebabkan berbagai penyakit termasuk penyakit chagas, malaria, dan leishmaniasis. Penyakit-penyakit ini ditularkan melalui vektor nyamuk atau lalat dan ditularkan ke manusia. Penyakit-penyakit ini diklasifikasikan sebagai penyakit terabaikan oleh WHO, dan terutama menyerang negara berpendapatan rendah, sehingga kurang mendapat perhatian dalam hal penelitian dan pengembangan. Selain itu, obat-obatan yang tersedia saat ini digunakan untuk mengobati penyakit-penyakit ini memiliki keterbatasan yang signifikan seperti efektivitas rendah, toksisitas tinggi, timbulnya resistensi obat, dan biaya pengobatan yang tinggi. Akibatnya, ada kebutuhan mendesak untuk menemukan obat-obatan baru yang efektif, lebih aman, dan terjangkau. Untuk mengatasi masalah-masalah ini, berbagai upaya sedang dilakukan untuk seperti penggunaan kembali obat-obatan yang ada, dan mengembangkan kandidat-kandidat baru berbasis bahan alam (Paloque *et al.*, 2017).

Studi menunjukkan bahwa jamur endofit yang berasal dari tanaman obat yang telah digunakan untuk mengobati parasit di atas seperti *Artemisia annua*, *Cinchona calisaya*, dan *Markhamia platycalyx* telah ditemukan menghasilkan senyawa bioaktif terhadap parasit yang disebutkan di atas. Sebagai contoh, *Nigrospora oryzae* Cf-298113 yang diisolasi dari akar *Triticum sp.*, memproduksi pipecolisporin, yang memiliki aktivitas penghambatan kuat terhadap *P. falciparum* (3,21 μ M) dan *T. cruzi* (8,68 μ M). Sementara itu, aktivitas antiplasmodia *Aspergillus terreus*, *Penicillium commune*, *P. chrysogenum*, dan *Talaromyces piophilus* yang diisolasi dari *A. annua* telah diselidiki. Ekstrak *P. commune* dan *P. chrysogenum* mampu menghambat *P. falciparum* dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 1,1 dan 3,3 μ g/mL. Ekstrak dari *Talaromyces* menunjukkan aktivitas sedang dengan nilai IC_{50} sebesar 7,6–9,9 μ g/mL, sedangkan ekstrak dari *A. terreus* menunjukkan aktivitas yang lebih rendah dengan IC_{50} sebesar 35 μ g/mL. Selain itu, dua strain jamur endofit (IP-2 dan IP-6) yang diisolasi dari *A. annua* menunjukkan aktivitas antiplasmodia

dengan IC_{50} masing-masing 30 dan 42 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan 19,20 epoxychothalasin C yang berasal dari ekstrak etil asetat *Nemania* sp. UM10M menunjukkan aktivitas antiplasmodia yang relatif lemah (Adeleke & Babalola, 2021).

Endofit juga menunjukkan aktivitas terhadap *P. falciparum* yang resisten terhadap klorokuin. *P. citrinum* AMrb11 dan *Neocosmospora rubicola* AMb22 menunjukkan aktivitas antiplasmodial yang kuat terhadap strain *P. falciparum* yang sensitif terhadap klorokuin Pf3D7 dan yang resisten terhadap klorokuin PfINDO/PfDd2, dengan nilai IC_{50} berkisar antara 0,39 hingga 1,92 $\mu\text{g/mL}$ untuk *Neocosmospora rubicola* AMb22 dan 0,84–0,93 $\mu\text{g/mL}$ untuk *P. citrinum* Amrb11. Selain itu, ekstrak fermentasi *Aspergillus flocculus* menghasilkan 3-hydroxymellein dan dorcinol, yang menunjukkan efek penghambatan signifikan sebesar 56% dan 97% terhadap *T. cruzi*. Aktivitas antitrypanosoma dari *A. flocculus* diyakini disebabkan oleh efek sinergis dari senyawa steroid seperti campesterol, ergosterol, dan ergosterol peroksida.

5. Endofit sebagai Antikanker

Kanker adalah kelompok penyakit yang kompleks dan beragam yang ditandai dengan pertumbuhan dan penyebaran sel abnormal yang tidak terkendali di dalam tubuh. Kanker merupakan salah satu penyebab utama kematian global dan menunjukkan tren peningkatan prevalensi dan mortalitas kematian terkait kanker. WHO memperkirakan bahwa sekitar sepuluh juta orang meninggal karena kanker di seluruh dunia pada tahun 2020, dan angka ini diperkirakan akan mencapai 13,1 juta pada tahun 2030 (World Health Organization, 2022). Jenis kanker yang paling umum secara global meliputi kanker payudara, kanker serviks kanker usus besar, kanker prostat, kanker mulut, kanker rektum, kanker kulit, dan kanker perut. Insiden kanker menunjukkan variasi yang signifikan di berbagai negara dan kawasan dengan tingkat yang lebih tinggi diamati di negara-negara yang lebih maju. Insiden kanker dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk genetika, gaya hidup, dan akses ke pelayanan kesehatan. Pilihan pengobatan utama untuk

kanker umumnya meliputi pembedahan, radiasi, imunoterapi, dan kemoterapi. Meskipun pengobatan ini dapat efektif sampai batas tertentu, pengobatan ini seringkali disertai dengan efek samping yang signifikan seperti *cachexia*, *alopecia* (rambut rontok), gangguan kognitif, dan peningkatan kerentanan terhadap infeksi. Selain itu, beberapa sel kanker telah dilaporkan memiliki mekanisme resistensi terhadap obat-obatan antikanker.

Untuk mengatasi tantangan ini, penelitian antikanker ditujukan untuk mengembangkan senyawa dan terapi antikanker baru yang menargetkan sel kanker sehingga memiliki efek samping lebih sedikit. Jamur endofit dalam dua dekade terakhir telah dikembangkan sebagai sumber potensial obat baru. Hal ini didasari dari penemuan luar biasa obat antikanker "taxol" dalam jamur endofit *T. andreanae* yang diisolasi dari pohon *Taxus brevifolia*. Terobosan ini memicu inisiatif secara luas dan sistematis menyaring berbagai spesies tanaman untuk keberadaan endofit penghasil taxol. Pendekatan ini telah berhasil menemukan endofit penghasil taxol tidak hanya pada tanaman *Taxus* tetapi juga pada berbagai spesies tanaman lainnya. Penelitian ekstensif telah mengidentifikasi endofit penghasil taxol atau analognya dalam berbagai genus jamur seperti *Alternaria*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Pestalotiopsis*, *Penicillium*, *Phoma*, *Pithomyces*, dan *Trichothecium*.

Antikanker seperti vinblastine dan vincristine yang diisolasi dari tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus*), menunjukkan aktivitas antikanker dengan mekanisme mengikat protein mikrotubulus dan *spindle* (gelendong) pembelahan, yang menyebabkan penghentian siklus sel dan kematian sel karena apoptosis. Vincristine dan vinblastine juga dihasilkan oleh jamur endofit seperti seperti *Eutypella* sp., *Fusarium oxysporum*, *Nigrospora sphaerica* dan *Talaromyces radicus* yang diisolasi dari *C. roseus*. Senyawa-senyawa ini telah menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap beberapa jenis sel kanker seperti HeLa, MCF-7, A-549, U-251, A-431, dan MDA-MB 231 dan menunjukkan fenomena aktivitas tergantung dosis.

Camptothecin, senyawa alkaloid kuinolon pentasiklik, yang awalnya diisolasi dari kayu *Camptotheca acuminata* dan akar *Nothapodytes foetida* memiliki aktivitas antikanker dengan mekanisme menghambat topoisomerase I secara selektif. Topoisomerase I merupakan enzim yang memainkan peran penting dalam replikasi DNA. Jamur seperti *Aspergillus* sp. LY341, LY355, *Alternaria burnsi*, *F. solani* S-019, dan *Trichoderma atroviride* LY357 telah dilaporkan mampu menghasilkan camptothecin dan aktif pada sel kanker payudara, kanker paru-paru, dan kanker ovarium manusia.

Podophyllotoxin merupakan prekursor untuk sintesis obat antikanker termasuk etoposide, teniposide, dan etopophos phosphate, yang secara klinis digunakan untuk mengobati kanker paru dan testis. Podophyllotoxin memiliki efek penghambatan yang kuat pada sintesis mikrotubulus, sementara turunannya, etoposide dan teniposide menghambat aktivitas enzim topoisomerase II, yang mengakibatkan siklus sel berhenti pada fase S. Jamur endofit *Mucor fragilis* TW5 dan *A. tenuissima* telah diidentifikasi sebagai produsen podophyllotoxin, yang menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker usus besar, paru-paru, dan prostat manusia (Adeleke & Babalola, 2021).

6. Endofit sebagai Imunosupresan

Obat imunosupresan sangat penting dalam mencegah, menekan, atau meminimalkan penolakan organ pada pasien transplantasi. Oleh karena itu, obat-obatan ini sangat penting dalam mengelola penyakit autoimun seperti lupus, psoriasis, diabetes tipe I, dan rheumatoid arthritis. Meskipun efektif, obat-obatan ini dilaporkan memiliki potensi efek samping, sehingga diperlukan alternatif obat yang lebih aman. Jamur endofit telah dilaporkan mampu menghasilkan senyawa yang bersifat imunosupresan. Senyawa tersebut di antaranya Colutellin A, dibenzofurane, lipopeptide, sydoxanthone A dan B, subglutinol A dan B, dan 13-O-acetylsydowinin B. Jamur endofit (PGS1 dan NLL3) yang diisolasi dari *Psidium guajava* dan *Newbouldia laevis*, masing-masing, menghasilkan citrinin, nidulalin,

asam p-hidroksibenzoat, dan siklofenin. Senyawa-senyawa ini telah dikaitkan dengan sifat immunosupresan. Demikian pula, analisis kimia jamur endofit *Mycosphaerella nawae* ZJLQ129 yang berasal dari daun *Smilax china* menunjukkan adanya turunan amida baru (-) mycousnine enamine yang mampu menghambat proliferasi sel T dengan menghalangi ekspresi antigen permukaan CD25 dan CD69 secara selektif. Temuan ini menunjukkan bahwa jamur endofit memiliki potensi untuk berfungsi sebagai sumber immunosupresan yang berharga yang menunjukkan efektivitas tinggi dan toksisitas rendah.

Demikian pula jamur endofit *Penicillium* sp. ZJ-SY2, yang berasosiasi dengan spesies bakau *Sonneratia apetala*, menghasilkan poliketida berupa turunan benzofenon yang disebut penifenon dan metil penifenon, serta tujuh Xanton. Senyawa-senyawa ini menunjukkan sifat immunosupresif yang kuat, dengan nilai IC_{50} berkisar antara 5,9 hingga 9,3 $\mu\text{g/mL}$. Subglutininol A dan B diproduksi oleh *Fusarium subglutinans* yang diisolasi dari *Tripterygium wilfordii* telah dilaporkan memiliki sifat immunosupresan. Contoh lainnya jamur endofit *Albifimbria viridis* menghasilkan Albifpyrrols B, secara khusus menghambat proliferasi sel limfosit B yang diinduksi oleh lipopolisakarida (LPS) dengan nilai I_{50} sebesar 16,16 μM . Senyawa libertellenone J yang berasal dari *Phomopsis* sp. S12 juga telah dilaporkan efektif mengurangi produksi NO, IL-1 β , IL-6, dan TNF- α dengan nilai IC_{50} berkisar antara 2,2 hingga 10,2 μM . Libertellenone J juga menurunkan ekspresi iNOS, IL-1 β , IL-6, dan mRNA TNF- α pada makrofag yang diinduksi LPS, dengan nilai IC_{50} berkisar antara 3,2 hingga 15,2 μM . Ekstrak *Botryosphaeria dothidea* BAK-1 yang diisolasi dari tanaman *Kigelia africana* menunjukkan hambatan pada proliferasi sel T yang bergantung dosis sebesar 50% dan produksi TNF- α sebesar 55%. Laporan-laporan penting ini mengilhami eksplorasi lebih lanjut dari endofit jamur untuk agen immunosupresan baru.

7. Endofit sebagai Antiinflamasi

Peradangan adalah serangkaian proses respons imun yang muncul sebagai respons terhadap berbagai faktor seperti cedera, patogen, toksin, dan radiasi. Peradangan dapat bermanifestasi sebagai reaksi langsung jangka pendek atau sebagai kondisi persisten jangka panjang. Peradangan berpotensi mempengaruhi berbagai organ tubuh termasuk jantung, pankreas, hati, ginjal, paru-paru, otak, saluran cerna, dan sistem reproduksi. Penyebab mendasar peradangan dapat berupa agen infeksi atau non-infeksi dan jika tidak diatasi, dapat mengakibatkan kerusakan jaringan atau berkontribusi pada perkembangan penyakit, tergantung pada agen penyebab yang terlibat.

Jamur endofit dilaporkan mampu menghasilkan senyawa antiinflamasi yang mirip dengan inangnya dan dengan demikian diyakini sebagai sumber agen potensial untuk memerangi peradangan dan meningkatkan kesehatan manusia. Sebagai contoh, Lasiodiplactone A, yang berasal dari tanaman bakau *Acanthus ilicifolius* juga dihasilkan oleh jamur endofit *Lasiodiplodia theobromae* menunjukkan aktivitas antiinflamasi yang signifikan dengan menghambat produksi oksida nitrat (NO) dalam sel RAW 264.7 yang diinduksi dengan LPS (lipopolisakarida) dengan IC_{50} sebesar 23,5 μ M. Lasiodiplactone A juga menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap α -glukosidase dengan nilai IC_{50} sebesar 29,4 μ M. Senyawa Botryosphaerin B yang berasal dari jamur endofit *Botryosphaeria* sp. SCSIO KcF6 yang berasosiasi dengan tanaman bakau *Kandelia candel* menunjukkan efek penghambatan pada enzim siklooksigenase (COX)-2 dengan nilai IC_{50} sebesar 1,12 mM. Siklonerodial B yang diperoleh dari jamur endofit *Trichoderma* sp. Xy24 yang diisolasi dari tanaman *Xylocarpus granatum* menunjukkan sifat antiinflamasi dengan menekan produksi oksida nitrat (NO) pada sel mikroglia BV2. Senyawa ini juga memiliki potensi aplikasi terapeutik dalam pengobatan penyakit neurodegeneratif seperti Parkinson dan Alzheimer. Selain itu berbagai jamur endofit seperti *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Dendryphion nanum*, *Pleospora*

tarda, dan *Penicillium* sp. juga menunjukkan sifat anti-inflamasi. Jamur ini telah menunjukkan kemampuan untuk menghambat aktivitas COX 1, COX 2, dan 5-lipoksigenase yang terlibat dalam proses inflamasi (Sharma *et al.*, 2009).

B. Aplikasi Endofit dalam Bidang Pertanian

Dalam pertanian, patogen dan hama tanaman mengurangi hasil panen tahunan global sekitar 30 hingga 50%, yang harus ditangani untuk memastikan keamanan pangan bagi populasi manusia yang terus meningkat. Hama biasanya dikendalikan dengan pestisida kimia namun, aturan dan pembatasan pada berbagai pestisida kimia serta permintaan konsumen untuk mengurangi residu pestisida kimia baik dalam bahan pangan maupun lingkungan mendesak pemerintah dan industri pertanian untuk mengejar teknologi alternatif yang bersih untuk produksi tanaman. Salah satu pendekatan alternatif yang belum dieksplorasi secara optimal, tetapi menjanjikan, adalah penggunaan jamur endofit yang bermanfaat sebagai agen pengendali hayati untuk perlindungan tanaman. Hampir semua tumbuhan vaskular yang diteliti hingga saat ini mengandung endofit dan distribusi beberapa endofit bersifat spesifik terhadap inang dan/atau lingkungan.

Jamur endofit meningkatkan pertumbuhan tanaman dan memberikan perlindungan terhadap hama dan patogen melalui berbagai mekanisme. Endofit memproduksi dan mengeluarkan metabolit sekunder yang menekan/mengurangi efek negatif dari patogen tanaman, termasuk senyawa volatil yang mampu menekan pertumbuhan patogen. Endofit lain melindungi tanaman inangnya dengan menginduksi mekanisme pertahanan tanaman, yang dapat dicapai dengan resistensi yang diperoleh secara sistemik (*Systemic Acquired Resistance/SAR*) atau resistensi sistemik yang diinduksi (*Induced Systemic Resistance/ISR*). Contoh mekanisme pertahanan ISR adalah *Piriformospora indica*, yang menginduksi respons pertahanan yang bergantung pada asam jasmonat pada tanaman *Arabidopsis thaliana* melalui ko-inokulasi dengan patogen.

Beberapa endofit dapat menunjukkan potensi biokontrolnya dengan mengeluarkan senyawa antijamur dan antibakteri, sehingga menghambat persaingan patogen, atau mereka memiliki aktivitas mikoparasit (yaitu, parasitisme satu jamur oleh jamur lain). Sebagai contoh, strain *Enterobacter* sp. yang diisolasi dari *Eleusine coracana* mampu menekan patogen rumput *Fusarium graminearum* dalam sistem akar tanaman inangnya dan secara simultan menghasilkan beberapa senyawa antijamur yang membunuh jamur tersebut. Endofit juga secara langsung bersaing dengan patogen inang untuk mendapatkan ruang dan nutrisi (Vujanovic *et al.*, 2022).

Selain melindungi tanaman inangnya secara langsung terhadap patogen, beberapa endofit memiliki sifat memacu pertumbuhan tanaman (*Plant growth-promoting/PGP*) yang menghasilkan tanaman yang lebih kuat. Endofit PGP ini tidak hanya menyediakan nutrisi seperti nitrogen, fosfat dan/atau zat besi, tetapi dapat memfasilitasi pertumbuhan dan perkembangan tanaman melalui stimulasi pertumbuhan. Berkaitan dengan akar, jamur PGP dapat menghasilkan beberapa senyawa kimia yang mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Misalnya hormon tanaman asam indole-3-asetat (IAA), giberelin, dan sitokinin, dan/atau aktivitas deaminase asam 1-aminosiklopropana-1-karboksilat (ACC). Endofit juga dapat memodulasi hormon tanaman seperti auksin, sitokinin, etilen dan giberelin, dan menghasilkan senyawa bioaktif lainnya. Jamur PGP dapat memainkan peran tidak langsung dalam perlindungan tanaman terhadap patogen dan hama dengan meningkatkan pertumbuhan dan kesehatan inangnya secara keseluruhan dibandingkan dengan tanaman lain yang tidak terkolonisasi.

Beberapa endofit dapat memberikan berbagai manfaat bagi tanaman inangnya, menawarkan peningkatan kesegaran tanaman dibandingkan dengan tanaman tak berkoloni endofit. Selain itu, endofit dapat meringankan stres abiotik dan biotik yang dialami tanaman seperti kekeringan, salinitas tinggi, logam berat dan senyawa toksik lainnya yang dibawa oleh lingkungan, banjir, suhu

ekstrem, predator, dan patogen. Endofit memberikan manfaat bagi inangnya, seperti menghalangi mikroba patogen, serangga dan herbivora lainnya, sementara juga memberikan stimulan untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

Selain itu, jamur endofit merupakan agen pengendali hayati (biokontrol) dalam menekan hama tanaman (serangga dan patogen) dan mengatasi tekanan abiotik (kekeringan, garam, dan panas). Sebagai contoh, *Trichoderma* spp. banyak digunakan dalam pertanian. Galur *T. reesei* biasanya diaplikasikan untuk produksi protein, sedangkan isolat jamur sebagai biokontrol digunakan sebagai biopestisida, bioprotektan, biostimulan, dan biofertilizer pada berbagai jenis tanaman. Saat ini, lebih dari 50 produk pertanian berbasis *Trichoderma* yang berbeda dapat ditemukan di internet, terdaftar di banyak negara di lima benua, dan dijual serta digunakan untuk melindungi dan meningkatkan hasil tanaman sayuran, tanaman hias, dan pohon buah-buahan Woo *et al.*, 2006). Contoh lainnya, *Nodulisporium* sp. Yang menghasilkan asam nodulisporium, yaitu indol diterpen yang menunjukkan sifat insektisida yang kuat terhadap larva lalat, yang bekerja dengan mengaktifkan channel klorida yang dikendalikan glutamat pada serangga (Strobel & Daisy, 2003).

C. Aplikasi Endofit dalam Bidang Industri

Jamur endofit mampu menghasilkan enzim seperti amilase, lipase, dan protease sebagai bagian dari mekanisme mereka untuk mengatasi pertahanan inang terhadap invasi mikroba. Kemampuan jamur endofit untuk mendegradasi struktur kompleks lignoselulosa membuat jamur endofit potensial untuk dikembangkan dalam eksplorasi biomassa lignoselulosa dalam rangka memproduksi etanol sebagai bahan bakar dan bahan kimia bernilai tambah lainnya (Corrêa *et al.*, 2014). Dalam penelitian terbaru, mikroorganisme ini telah digunakan dalam transformasi biokatalitik substrat eksobiotik, khususnya dalam reaksi redoks (Rodriguez *et al.*, 2016). Contoh aplikasi endofit dalam bidang industri ditampilkan pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Jamur Endofit dan Aplikasinya dalam Bidang Industri

Tanaman Inang	Jamur Endofit	Aplikasi
<i>Coffea arabica</i> L.	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	Pectinase
<i>Tithonia diversifolia</i>	<i>C. kikuchii</i>	Lipase
<i>Clerodendrum viscosum</i> L.	<i>Phoma</i> sp.	Bio-pigmen
<i>Eucryphia cordifolia</i> Cav	<i>Gliocladium roseum</i>	Myco-diesel
<i>Zea mays</i>	<i>Acremonio zeae</i>	Xylanase
<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Colletotrichum</i> sp., <i>Fusarium solani</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Nigrospora sphaerica</i>	Amylase, cellulase, protease
<i>Eucalyptus</i>	<i>Hormonema</i> sp., <i>Neofusicoccum luteum</i> , <i>N. australe</i> , <i>Ulocladium</i> sp	Laccase
<i>Cajanus cajan</i> L.	<i>M. verrucaria</i>	Laccase
<i>Centella asiatica</i>	<i>Penicillium</i> sp.	Cellulase
<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill.	<i>Nigrosporasphaerica</i> , <i>Penicillium aurantiogriseum</i> , <i>Pestalotiopsis guepinii</i> , <i>Xylaria</i> sp., <i>Acremonium terricola</i> , <i>C. cladosporioides</i> , <i>Fusarium lateritium</i>	Cellulase, Protease, Xylanase
<i>Glycine max</i> (L.) Merril	<i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Fusarium verticillioides</i>	Phytase
dari berbagai tanaman	<i>Beauveria bassiana</i>	Chitinase, lipase dan protease

D. Aplikasi Endofit dalam Pengelolaan Lingkungan

Di seluruh dunia, pencemaran logam berat sebagian besar disebabkan oleh pertumbuhan populasi yang cepat dan pembangunan industri yang terakumulasi dalam jaringan makanan yang menyebabkan risiko kesehatan masyarakat yang serius. Mikroorganisme endofit memiliki berbagai mekanisme untuk penyerapan logam yang memiliki kapasitas biosorpsi logam. Jamur endofit terbukti membantu tanaman untuk meningkatkan kesehatannya, mengurangi stres, dan mendetoksifikasi logam. Endofit memiliki kecenderungan lebih tinggi untuk meningkatkan kelarutan logam dan mineral oleh sel-sel yang mengeluarkan asam organik dengan berat molekul rendah dan ligan khusus logam seperti siderofor, yang mengubah pH tanah dan meningkatkan aktivitas pengikatan. Pendekatan terkait protein seperti chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-Seq) dan *modified enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA test) dapat digunakan untuk menguji jamur endofit dan interaksi DNA-protein selama proses reduksi logam.

Di bidang lingkungan, peneliti menemukan bahwa jamur endofit dapat menjadi sumber baru dan penting untuk degradasi hidrokarbon aromatik polisiklik (PAH). Jamur seperti *Ceratobasidium stevensii* yang diisolasi dari tanaman golongan Euphorbiaceae dan jamur *Phomopsis* sp. yang diisolasi dari tanaman padi dilaporkan mampu memetabolisme fenantren secara efektif. Selain itu, jamur *Pestalotiopsis microspora* mampu mendegradasi poliester sintesis poliuretan (PUR) yang menghasilkan serin hidrolase (Russell *et al.*, 2011).

Dalam bab ini telah dijelaskan manfaat luas jamur endofit. Dalam bidang kesehatan dan farmasi, penemuan obat baru dengan pendekatan jamur endofit menawarkan beberapa keuntungan di antaranya bahan baku reversibel (dapat disimpan-kulturkan berulang), berkelanjutan, *scale-up* produksi relatif mudah, dan parameter produksi dapat dikontrol dengan teknik fermentasi, serta diperolehnya metabolit yang memiliki diversitas tinggi secara kimia dan biologi.

5

ISOLASI, IDENTIFIKASI, DAN PRESERVASI ENDOFIT

Untuk dapat diteliti dan dikembangkan sebagai organisme penghasil metabolit, endofit harus diisolasi dari tanaman inangnya, dikultur murni, dan diidentifikasi di laboratorium untuk kemudian dapat dilakukan perbanyakan atau fermentasi. Proses ini dapat dijamin validitas dan keberlangsungannya apabila dilakukan dengan teknik yang benar dan valid. Untuk proses kultur jangka panjang, jamur endofit juga harus disimpan dan diawetkan (preservasi) dengan teknik yang benar agar dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama tanpa mengubah genetika jamur tersebut.

A. Isolasi Endofit

Diperkirakan semua tanaman di bumi bersimbiosis dengan jamur endofit. Dalam memilih tanaman yang akan dijadikan sebagai sumber endofit harus memperhatikan beberapa faktor penting agar endofit yang diperoleh memiliki aktivitas biologi yang diinginkan. Pemilihan tanaman yang potensial sebagai sumber endofit hendaknya mempertimbangkan hal-hal sebagai berikut:

1. Tanaman inang memiliki aktivitas biologi yang potensial

Tanaman yang telah dilaporkan memiliki khasiat kesehatan ataupun secara saintifik sudah banyak diteliti merupakan kandidat bagus sebagai sumber endofit. Diharapkan endofit yang berasosiasi dengan tanaman tersebut memiliki aktivitas yang mirip dengan inangnya.

2. Studi etnobotani

Tanaman yang belum banyak diteliti tetapi secara empiris banyak digunakan oleh masyarakat untuk mengobati penyakit

tertentu juga merupakan kandidat yang baik sebagai sumber endofit.

3. Endemik di daerah tertentu

Tanaman endemik adalah tanaman asli dan hanya hanya hidup di kawasan geografis tertentu. Tanaman ini memiliki kemampuan adaptasi khusus sehingga rentan terhadap perubahan lingkungan. Kemampuan mereka bertahan dalam ekosistem umumnya dibantu oleh endofit terasosiasi.

4. Lingkungan

Tanaman yang tumbuh di daerah tropis memiliki biodiversitas endofit lebih besar dibandingkan dengan tanaman yang tumbuh di daerah kering atau dingin sehingga isolasi endofit akan menghasilkan rasio keberhasilan yang lebih tinggi.

5. Daerah yang kaya keanekaragaman hayati

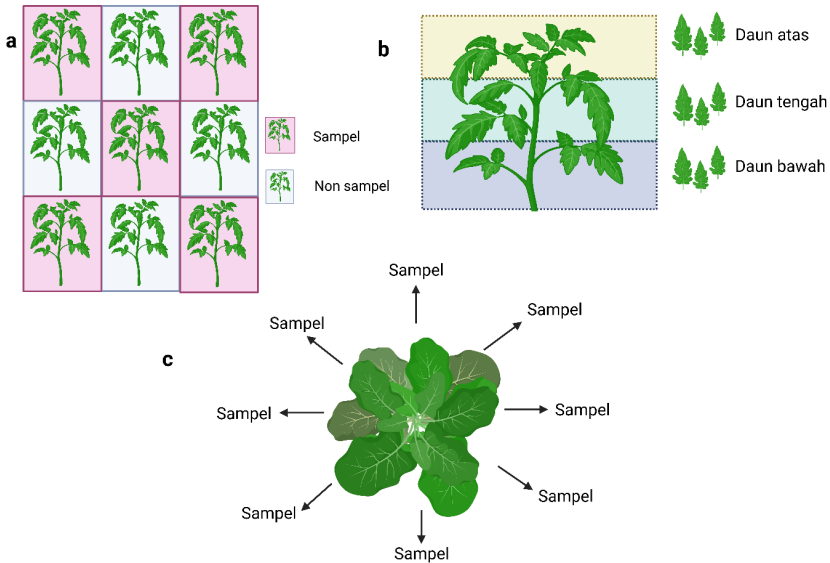
Daerah seperti *coral triangle zone*, kawasan hutan tropis (Amazon, Kalimantan, Papua, Australia) yang kaya akan beragam hayati merupakan sumber melimpah ditemukannya endofit. Beragamnya interaksi antartanaman, antarmikroba, dan antara tanaman-mikroba akan memberikan biodiversitas jamur endofit yang melimpah sekaligus diharapkan aktivitas farmakologi yang beragam.

Dengan memilih tanaman berdasarkan kriteria di atas, untuk sumber isolasi endofit kita mengurangi pemilihan acak yang berarti menghemat waktu dan biaya karena menurunkan risiko gagalnya mengisolasi endofit dari tanaman inang.

1. Teknik *Sampling* Endofit

Tanaman yang dipilih untuk sumber endofit diidentifikasi (ditentukan nama ilmiahnya) dan ditentukan lokasi geografisnya (bisa menggunakan *Global Positioning Service*/GPS). Hal ini penting untuk memudahkan dalam pengulangan data ataupun untuk mempelajari biodiversitas endofit. Dalam mengambil organ tanaman sebagai sumber endofit, harus diperhatikan teknik pengambilan sampelnya.

Organ harus dipilih secara merata dari suatu tanaman sehingga memungkinkan pengambilan area yang rata untuk endofit. Teknik pengambilan sampel organ tanaman ditampilkan pada gambar 5.1.



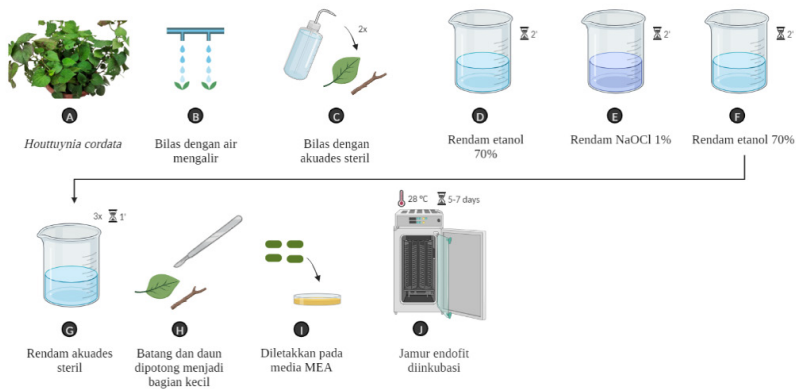
Gambar 5.1. Teknik Pengambilan Sampel Daun Tanaman sebagai Sumber Endofit
Gambar dibuat dengan BioRender

(a) Desain eksperimen pemilihan individu yang akan dijadikan sampel untuk memperoleh sampel yang representatif. (b) Skema pengambilan sampel jaringan daun dari daun bagian bawah, tengah, dan atas. (c) Tampak atas spesimen yang dijadikan sampel, dan panah hitam menunjukkan bahwa pengambilan sampel harus dilakukan di daerah yang berbeda.

2. Metode Isolasi Endofit

Pada saat kita mengisolasi endofit jangan sampai kita juga menumbuhkan epifit, yaitu organisme yang hidup di permukaan organ tanaman. Umumnya, bagian tanaman (daun atau batang) yang akan dijadikan sebagai sumber endofit dipotong dan ditaruh di dalam kantong plastik dan diusahakan untuk disimpan pada suhu 4°C sebelum proses selanjutnya dilakukan. Misalnya saja kita harus mengambil sampel daun dari daerah Kalimantan atau daerah

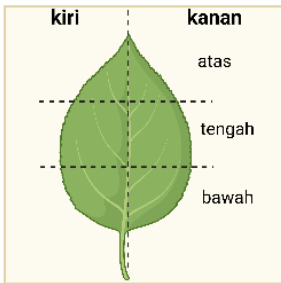
Indonesia Timur di pedalaman, bagian tanaman ditaruh di plastik dan segera diproses untuk menghindari busuknya organ tanaman. Bagian tanaman sebelumnya dibersihkan dengan aquades steril untuk membersihkan kotoran dan debu yang menempel. Bagian tanaman kemudian direndam dalam etanol 70% selama 2 menit, selanjutnya direndam dalam larutan natrium hipoklorit 1% selama 2 menit, dan direndam ke dalam larutan etanol 70% kembali selama 2 menit (Triastuti *et al.*, 2019). Terakhir, bagian tanaman dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali, masing-masing selama satu menit (proses ini dilakukan dalam LAF) (Gambar 5.1). Organ tanaman kemudian dipotong kecil-kecil (ukuran 2 mm x 2 mm) dengan pisau *scalpel* steril dan kemudian ditaruh pada media agar. Jamur akan tumbuh sekitar 1 minggu sampai 1 bulan (gambar 5.2).



Gambar 5.2. Tahapan Isolasi Jamur Endofit dari Organ Tanaman
Gambar dibuat dengan BioRender

Pemotongan organ tanaman (misalnya daun) mengikuti gambar 5.3, untuk memperoleh area representatif yang akan memaksimalkan jenis jamur endofit yang akan tumbuh.

Skema pengambilan sampel

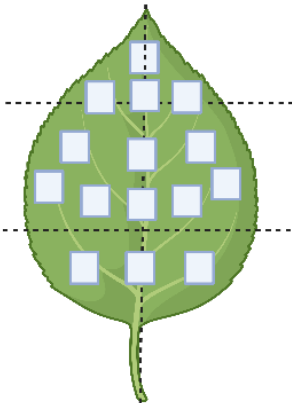


Dimensi fragmen

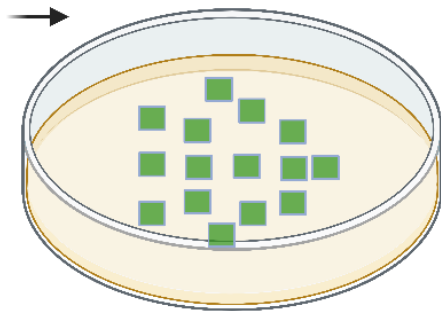
2 x 2 mm s/d 5 x 5 mm



Fragmentasi jaringan

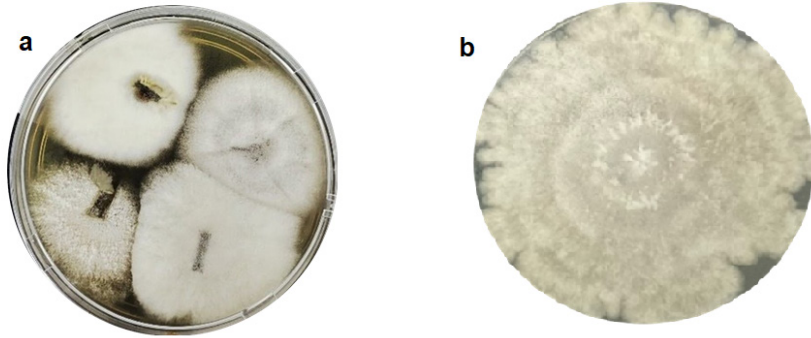


Fragmen jaringan ditaruh di media agar



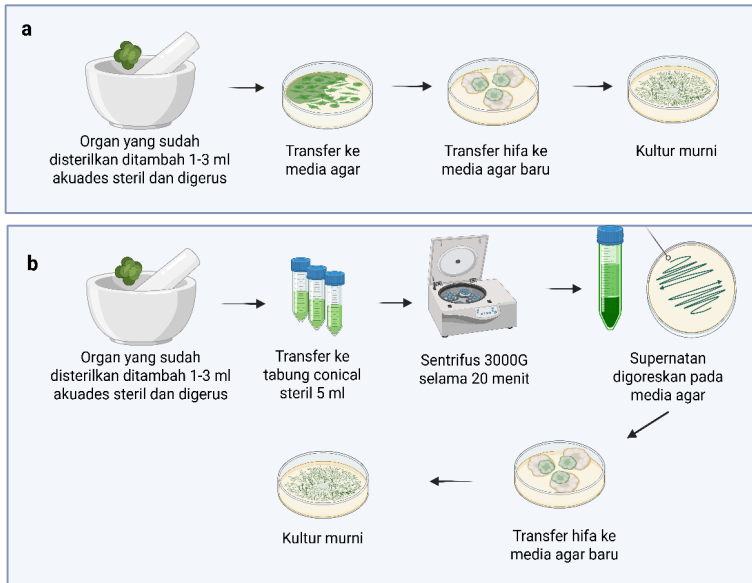
Gambar 5.3. Skema Pengambilan Jaringan Tanaman untuk Sumber Endofit
Gambar dibuat dengan BioRender

Koloni yang tumbuh kemudian diambil dan dipisahkan dari koloni yang lain untuk menghasilkan kultur tunggal (monokultur). Umumnya dari satu tanaman kita akan memperoleh banyak sekali koloni endofit sehingga dibutuhkan identifikasi dari kultur yang ditumbuhkan (Gambar 5.4). Masing-masing koloni murni kemudian bisa kita identifikasi untuk kita tentukan spesiesnya.



Gambar 5.4. Koloni Jamur dari Tanaman *Peronema canescens*
(a) Hasil kultur organ setelah 3 hari, tampak jamur tumbuh dari dalam daun/batang yang dipotong dan terlihat berbagai jenis jamur dalam satu petri. (b) kultur tunggal jamur *Phomopsis* sp. PCL-Y-48 yang berhasil dipisahkan dari campuran koloni petri a.

Selain menggunakan metode kultur jaringan tanaman (Gambar 5.3), isolasi endofit dari juga bisa dilakukan dengan metode yang berbeda yaitu metode (a) maserasi jaringan tanaman dan (b) kultur cairan antarsel tanaman (Gambar 5.5). Kedua Teknik ini lebih efektif dalam mengisolasi endofit dari tanaman namun memiliki resiko kontaminasi lebih besar dan proses lebih panjang. Metode maserasi jaringan tanaman dilakukan dengan menggerus organ tanaman yang sudah disterilkan. Aquades steril ditambahkan ke dalam mortar dan cairan selanjutnya dituang ke petri yang berisi media. Koloni jamur yang terbentuk selanjutnya dipisahkan untuk memperoleh koloni tunggal. Metode kultur cairan antarsel juga dilakukan dengan menggerus organ tanaman steril dengan aquades steril. Selanjutnya campuran disentrifus untuk memisahkan padatan dan supernatan. Supernatan selanjutnya digoreskan pada media agar hingga koloni jamur tumbuh dan siap dipisahkan menjadi koloni tunggal.



Gambar 5.5. Metode Isolasi Endofit
Gambar dibuat dengan BioRender

(a) metode maserasi jaringan tanaman, (b) metode kultur cairan antarsel tanaman

Metode isolasi endofit dengan metode maserasi jaringan ataupun kultur cairan antarsel memiliki langkah lebih panjang dan lebih rentan terhadap kontaminasi.

B. Identifikasi Endofit

Identifikasi jamur endofit sangat penting untuk memastikan bahwa galur jamur yang digunakan sudah tepat dan sesuai spesiesnya. Hal ini akan menjamin kebenaran dan validitas dalam metode dan hasil uji yang dilakukan sekaligus untuk menjamin kualitas produk jamur yang dihasilkan.

1. Identifikasi Endofit secara Makroskopik dan Mikroskopik

Pengamatan morfologi endofit bisa dilakukan secara makroskopik dengan mengamati ciri-ciri pertumbuhan pada berbagai media (berbagai jenis media untuk kultur jamur bisa

dilihat di bab 6). Pengamatan ciri-ciri mikroskopik meliputi spora, hifa (septat, aseptat), bentuk perkembangan (spora, nonspora). Metode pengamatan dengan mikroskop memiliki kelemahan karena tidak setiap tahapan pertumbuhan jamur dapat kita amati dalam satu sampel. Selain itu, karakter morfologi bisa berubah karena perubahan lingkungan di mana jamur tersebut tumbuh.

Metode awal yang digunakan untuk mengidentifikasi jamur umumnya berdasarkan morfologi pertumbuhan pada media tertentu seperti PDA, SDA, atau MEA. Efek pada agar (hemolisis, memproduksi halo, atau menghasilkan cairan); bentuk tepi dari koloni (rata, *undulate*, *crenate*, *lobate*, *erose*, *fimbriate*, seperti bulu, atau rhizoid); bau (netral, bau buah-buahan, manis, atau tengik) pigment (warna pada permukaan dan dasar atau warna yang diproduksi berdifusi ke agar); bentuk (bulat, atau tak beraturan), dan ukuran (diameter pada usia dan temperatur tertentu) bisa digunakan sebagai penciri pendukung (Maheshwari, 2017). Kekurangan dari pengamatan koloni pada media di antaranya tidak semua jamur bisa ditumbuhkan di media karena jamur seringkali membutuhkan media yang spesifik dan beberapa jamur membutuhkan waktu pertumbuhan yang lama.

Pengamatan secara mikroskopik dilakukan oleh ahli jamur yang mempelajari tentang sistematika jamur. Hal ini meliputi morfologi dan warna hypha, mycelia, spora, dan struktur reproduksi. Beberapa pengecatan dapat dilakukan untuk mengamati jamur secara mikroskopik, di antaranya:

a. *Direct Mount* (Pengamatan Basah)

Teknik ini melibatkan penempatan sampel jamur dalam setetes garam atau kalium hidroksida (KOH) pada *slide* dan mengamatinya di bawah mikroskop. KOH membantu melarutkan jaringan dan keratin, sehingga memungkinkan visualisasi hifa dan spora jamur yang lebih baik.

- b. Pewarnaan *Lactophenol Cotton Blue*
Pewarnaan ini umumnya digunakan untuk memvisualisasikan hifa dan spora jamur, karena pewarnaan ini menodai dinding sel jamur menjadi biru.
- c. Tinta India
Metode ini digunakan untuk memvisualisasikan sel ragi, yang tampak sebagai struktur gelap dengan efek seperti halo pada latar belakang gelap.
- d. Pewarnaan Tahan Asam
Pewarnaan ini berguna untuk mengidentifikasi Actinomyces. C
- e. Pewarnaan *Calcofluor White*
Pewarna ini mengikat kitin di dinding sel jamur, membuatnya berpendar di bawah sinar UV.
- f. Metode *Scotch tape* (Metode Pita Perekat)
Metode ini dilakukan dengan menempelkan sepotong pita perekat ke koloni jamur dan kemudian memeriksa pita tersebut di bawah mikroskop untuk memvisualisasikan struktur jamur.
- g. Metode Tetes Jamur (*Fungal Drops Method*)
Metode ini melibatkan inokulasi spora jamur atau miselia ke dalam tetes media kaya nutrisi, yang memungkinkan pertumbuhan dan eksplorasi hifa, yang dapat dinilai menggunakan mikroskop stereo.

Penelusuran gambar mikroskopik maupun morfologi koloni dari endofit bisa dilihat di www.studiesinmycology.org sebagai salah satu jurnal acuan tentang jamur.

2. Identifikasi Endofit Secara Molekuler

Pada awalnya proses taksonomi fungi didasarkan pada identifikasi secara morfologi dan pengecatan ataupun kultur dan beberapa keterangan mengenai sifat metabolismenya. Pada kondisi tertentu, kita tidak bisa mendapatkan data morfologi

atau mikroskopi suatu jamur karena terkendala beberapa hal seperti beberapa jamur tidak memproduksi spora, tumbuh lambat sehingga membutuhkan proses kultur yang lama, membutuhkan jumlah sampel yang banyak, ataupun karena adanya kontaminasi. Beberapa jamur patogen membutuhkan data identitas fungi dengan cepat sehingga identifikasi dengan pengamatan morfologi kadang kurang sesuai. Selain itu, pengamatan secara morfologi hanya bisa dilakukan oleh seorang mikologis (taksonomis) yang memiliki penguasaan tentang genus tertentu. Dibutuhkan suatu teknik yang memungkinkan identifikasi suatu spesies jamur menggunakan sampel dalam jumlah sedikit, proses cepat, dan lebih baik lagi apabila dapat menunjukkan hubungan kekerabatan antar spesies yang diamati (hubungan filogenetik).

Penemuan DNA (*Deoxyribonucleic acid*), dan teknik terkait telah membuka pemahaman manusia tentang material genetik. Sifat-sifat utama DNA seperti *double helix* (struktur DNA seperti tangga spiral), semikonservatif (untaian DNA terdiri dari satu untaian DNA induk dan 1 untaian DNA anakan yang saling berpasangan), dan komplementer (untaian DNA dihubungkan oleh basa yang selalu berpasangan; basa adenin (A) dengan basa timin (T), basa sitosin (C) dengan basa guanin (G)) merupakan prinsip dasar dalam pengembangan teknik molekuler bioteknologi.

Penemuan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) oleh Kary Mullis di tahun 1985 merupakan salah satu lompatan penting dalam bidang biologi molekuler. Dengan teknik ini kita dapat mengidentifikasi suatu sampel dalam jumlah sedikit dan waktu yang relatif cepat dengan hasil yang valid. Teknik PCR telah menjadi prosedur dasar dan umum dilakukan di laboratorium, terutama laboratorium taksonomi. Proses identifikasi suatu spesies menjadi lebih mudah dan cepat dengan aplikasi PCR karena kita bisa mendapatkan *amplicon*, yaitu amplifikasi (perbanyak) sekuens DNA yang kita pilih untuk dianalisa. Ampikon ini bisakita jadikan sebagai *barcode* DNA atau penanda dari suatu spesies.

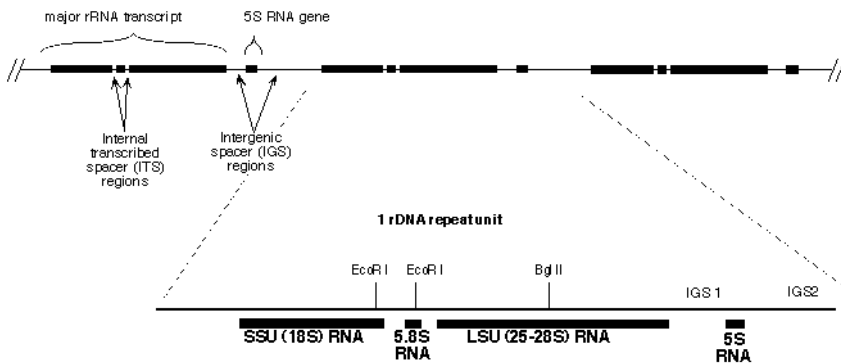
Barcode DNA adalah pola unik dari sekuens DNA dari setiap spesies. Seperti halnya *barcode* pada produk di supermarket, dengan *barcode* DNA kita bisa mengidentifikasi setiap spesies dari berbagai sampel, apakah itu sampel yang kecil, kompleks, rusak, atau produk hasil industri. *Barcode* DNA umumnya memiliki panjang sekitar 700 nukleotida yang bisa diproses dengan cepat dari ribuan sampel dan dianalisis secara cermat dengan program komputer sehingga hasilnya akurat. Dengan metode ini juga bisa ditentukan hubungan filogenetik dari suatu spesies (jamur) sehingga kita bisa melihat adanya polimorfisme antara dua spesies yang berdekatan. Untuk yang tertarik mempelajari *barcode* DNA bisa membuka website *International Barcode of Life* (IBOL) di www.ibol.org.

a. Gen ITS

Setiap organisme memiliki DNA (*deoxyribonucleic acid*) sebagai cetak biru dan instruksi genetik. Kita tidak akan mendeteksi semua DNA dari setiap spesies jamur tetapi kita harus menentukan daerah dari suatu DNA yang merupakan penciri dari suatu spesies. Daerah DNA yang dipilih haruslah universal (bisa mencakup keseluruhan takson, misalnya *barcode* untuk hewan, tanaman, atau fungi) namun di satu sisi juga harus cukup spesifik untuk menunjukkan perbedaan antarspesies terdekat. Pada jamur, *barcode* DNA yang sering dipakai adalah gen ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Gardes & Bruns, 1993; Turenne *et al.*, 1999). Untuk jamur, sampel sebaiknya berupa badan buah (bukan miselium) dan dipastikan tidak ada kontaminasi dengan jamur yang lain. Isolasi DNA dari jamur yang segar akan lebih mudah dibandingkan dengan jamur kering.

Sekuens DNA yang sering digunakan untuk *barcode* DNA jamur adalah operon DNA ribosomal (rDNA) yang terdiri atas gen subunit kecil/*small subunit* (SSU) 18S rRNA, gene 5,8 rRNA, dan gen subunit besar/*large subunit* (LSU) 28S rRNA (gambar 5.3). Operon rDNA ini terdapat dalam genom jamur dan diulang sebanyak 50-100 *copy*. *Internal transcribed Spacers* (ITS) terletak antara SSU dan 5,6S rRNA (ITS1) dan antara 5,8S rRNA dan LSU (ITS2). *Gen Intergenic Spacer*

(IGS) terletak setelah LSU dan sebelum SSU berikutnya. Beberapa daerah pemotongan enzim restriksi endonuklease juga terdapat dalam genom jamur seperti EcoRI dan BgIII. Daerah SSU dan LSU menunjukkan evolusi yang relatif lambat dan biasanya digunakan untuk mempelajari hubungan di tingkat famili dan orde sedangkan ITS dan 5,8S rRNA digunakan untuk mempelajari organisme pada tingkat spesies karena bagian ini menunjukkan kecepatan evolusi yang cukup tinggi. Meskipun gen ITS telah banyak digunakan untuk menentukan identitas spesies jamur namun beberapa genus umum diidentifikasi berdasarkan proteinnya, seperti *Fusarium* spesifik diidentifikasi dengan *translation elongation factor 1- α* , atau *Penicillium* dengan *β -tubulin*, *Cercospora* dengan *histon H3*, dan *Basidiomycotes* yang umumnya menggunakan gen IGS (Yu *et al.*, 2010).



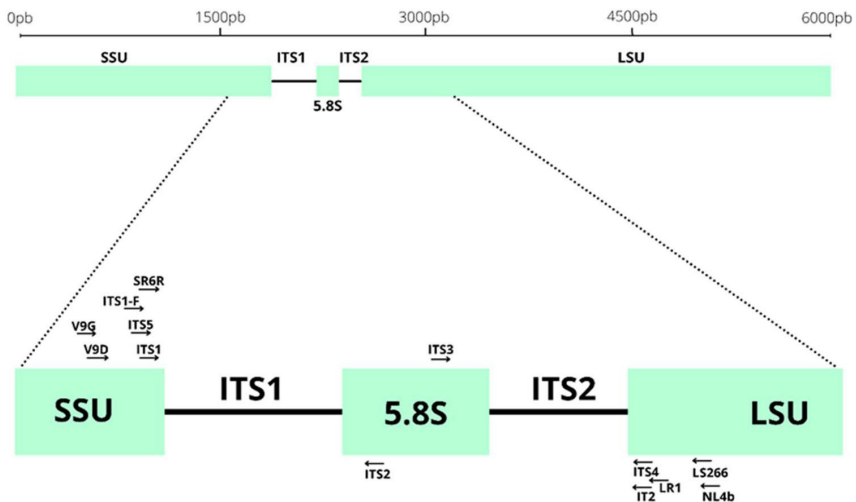
Gambar 5.6. Struktur Operon rDNA pada Jamur

Sumber: <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>

SSU: *Small Sub Unit*; LSU: *Large Sub Unit*; EcoRI: enzim endonuklease dari *Esherichia. coli*; BgIII: enzim endonuklease dari *Bacillus globigii*. Satu unit rDNA terdiri atas SSU, 5,8S rRNA, LSU, dan IGS.

Primer yang digunakan dalam *barcode* DNA harus bisa mengamplifikasi (memperbanyak) DNA target tanpa terpengaruh adanya kontaminasi ataupun DNA nontarget lainnya. Berdasarkan penelitian terdahulu, terdapat beberapa primer ITS yaitu ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, ITS1F dan ITS4B. ITS1F dan ITS4B memiliki spesifitas

yang lebih tinggi. ITS1F sering dikombinasi dengan ITS2 untuk memperbanyak region ITS1 dan ITS3 biasanya dikombinasi dengan ITS4 untuk memperbanyak region ITS2 (Lindahl *et al.*, 2013; White, *et al.*, 1990).



Gambar 5.7. Gen Inti RNA Ribosom dan Daerah ITS
Sumber: dos Reis *et al.*, 2022

Daerah ITS mencakup urutan ITS1 dan ITS2 yang dipisahkan oleh gen 5.8S rRNA, yang terletak di antara gen 18S rRNA (SSU) dan 28S rRNA (LSU). Panah kecil yang diamati dari pembesaran daerah ITS menunjukkan posisi annealing primer yang digunakan untuk amplifikasi PCR dari daerah ini.

Tabel 5.1. Sekuens Primer yang Digunakan untuk *Barcode* DNA Jamur pada Gen ITS

Primer	Sekuens (5'-3')	Tempat ikatan
ITS1F (F)	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	SSU
ITS2 (R)	GCTGCGTTCATCGATGC	5,8S
ITS3 (F)	GCATCGATGAAGAACGCAGC	5,8S
ITS4 (R)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	LSU
ITS86F (F)	GTGAATCATCGAATCTTTGAA	5,8S
ITS86R (R)	TTCAAAGATTCGATGATTCAG	5,8S

Ket: F (*forward primer*), R (*Reverse primer*)

Sekuen IGS (kadang disebut juga dengan *non-transcribed spacer/NTS*) juga memiliki variabilitas genetik yang tinggi. IGS sering digunakan untuk identifikasi species Ascomycetes dan Basidiomycetes. Ascomycetes memiliki region tunggal tak terselingi (antara akhir LSU dan awal dari sekuen SSU) yang ukurannya 2-5 kb atau lebih. Amplifikasi seluruh daerah IGS membutuhkan primer yang menempel pada gugus 3' dari gene LSU (misal LR12R) dan 5' akhir dari SSU (seperti invSR1R). Selain itu, pada beberapa Basidiomycetes IGS juga terdiri atas daerah pengkode tunggal untuk 5S RNA yang mana membagi IGS menjadi dua region lebih kecil sehingga akan lebih mudah diamplifikasi.



Gambar 5.8. Posisi IGS pada rDNA

Sumber: <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>

Tabel 5.2. Sekuens Primer untuk IGS

Primer Name	Sequence (5' -> 3')	Tempat Ikatan
LR12R	GAACGCCTCTAAGTCAGAATCC	Pada LSU
invSR1R	ACTGGCAGAATCAACCAGGTA	Terletak pada SSU RNA (posisi 21-1)
5SRNA	ATCAGACGGGATGCGGT	5S RNA positions 46-26
5SRNAR	ACQGCATCCCCTGTGAT	5S RNA positions 26-46

sumber: <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>

Pemilihan primer untuk barcode DNA harus memperhatikan spektrum dan performa dari masing-masing primer yang dipakai sehingga tidak akan menghasilkan data identifikasi yang bias.

b. Isolasi DNA Genom (gDNA)

Terdapat beberapa protokol isolasi DNA genom, mulai dari yang spesifik untuk spesies fungi tertentu sampai metode umum. Selain itu juga terdapat banyak *reagen kit* untuk isolasi DNA (harga umumnya lebih mahal) dan hasilnya bisa bervariasi tergantung jenis bahan yang digunakan. Pada bab ini akan dijelaskan mengenai prinsip dalam isolasi DNA yang meliputi:

- 1) Perusakan dinding sel/membran sel. Proses ini bisa dilakukan secara fisik (dengan perbedaan temperatur, penggerusan dengan nitrogen cair atau menggunakan spatula) dan secara kimia;
- 2) Pemisahan gDNA dari komponen seluler;
- 3) Pemisahan DNA dari protein;
- 4) Presipitasi gDNA;
- 5) Pencucian gDNA;
- 6) Penyimpanan DNA pada larutan buffer.

Sampel untuk isolasi DNA umumnya adalah miselium namun sampel dari herbarium juga bisa dilakukan meskipun dengan tingkat keberhasilan yang rendah.

Berikut salah satu metode yang diadaptasi dari Promega™ salah satu penyedia kit untuk purifikasi DNA.

- 1) Miselium diambil dari kultur dan dimasukkan ke dalam eppendorf yang berisi 300µl *nuclei lysis solution*. Miselium bisa digerus dengan bantuan pestel/spatula. Larutan ini kemudian diinkubasi selama 65°C selama 15 menit.
- 2) Miselium yang diambil harus cukup untuk pengujian, bila terlalu sedikit DNA mungkin tidak akan terekstraksi dalam jumlah yang cukup. Pemanasan yang dilakukan akan membantu merusak dinding sel.
- 3) Ke dalam larutan ditambahkan 100µl larutan *protein precipitation* dan divortex dengan kecepatan tinggi selama 10 detik. Selanjutnya campuran ini disentrifuse pada 16.000 x g selama 10 menit.

- 4) Cairan supernatan diambil secara hati-hati dan dipindah ke dalam tabung eppendorf baru yang berisi 300µl isopropanol. Campurlah dengan membolak-balikkan tabung. Larutan kemudian disentrifuge pada 16.000 x g selama 10 menit. Penambahan isopropanol bertujuan untuk mengendapkan DNA yang akan terpisahkan menjadi pellet setelah sentrifugasi.
- 5) Supernatan dibuang dan pellet ditambah dengan 300µl Etanol 70%. Tabung eppendorf dibolak-balik sehingga benang DNA akan terlihat.
- 6) Campuran ini disentrifuse pada 16.000 x g selama 10 menit.
- 7) Supernatan dibuang, kemudian tabung dikeringkan dengan cara meletakkan secara terbalik pada kertas tisu selama 15 menit.
- 8) DNA bisa disimpan dengan menambahkan 40µl *ultra-purified water* atau dengan menambahkan TE buffer pada suhu 2-8°C.

Kit seperti *nuclei lysis solution* (lisis buffer) dan *protein precipitation solution* (larutan pengendap protein) bisa dibuat sendiri untuk uji yang lebih murah. Larutan lisis buffer umumnya berisi TES (*Tris hydroxymethylaminomethane*), EDTA (*ethylenediaminetetraacetic*) dan SDS (*sodium dodecyl sulphate*). SDS membantu melisiskan sel ke dalam larutan sementara Tris menjaga PH larutan dan EDTA mengikat ion logam. Larutan pengendap protein umumnya berisi proteinase-K untuk mendegradasi protein dan menginaktivasi enzim yang ada pada larutan. TE buffer berfungsi menjaga DNA dari denaturasi selama proses penyimpanan.

c. Penentuan Kemurnian DNA

Setelah dilakukan isolasi DNA maka perlu dilakukan analisis untuk menentukan kuantitas dan kualitas DNA tersebut. Metode yang umum digunakan dalam hal ini adalah menggunakan spektrofotometri UV dan gel agaros elektroforesis. DNA bisa dilihat pada spektrofotometer UV karena mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi. Purine dan pirimidin menunjukkan adsorpsi maksimal pada panjang gelombang sekitar 260nm (dATP: 259nm; dCTP:

272nm; dTTP: 247nm). Sekarang telah tersedia Nanodrop® salah satu UV-Vis spektrofotometer dengan kapasitas pengujian 1-2µl saja sehingga sangat sesuai untuk identifikasi DNA yang ukuran sampelnya sangat kecil. Konsentrasi DNA dapat diukur dengan spektrofotometri UV pada panjang gelombang maksimum (α_{260}). Untuk A_{260} nm = 1 setara dengan 50µg/ ml DNA untai ganda. Kemurnian larutan DNA dapat dilihat bahwa larutan DNA murni mempunyai rasio A_{260}/A_{280} adalah 1,8. Jika rasio lebih dari 1,8 menunjukkan adanya RNA, oleh karena RNA juga diserap pada panjang gelombang yang sama. Sedangkan jika rasio kurang dari 1,8 menunjukkan adanya pengotor protein atau fenol, untuk itu jika diperlukan dapat dimurnikan kembali dengan melakukan ekstraksi kloroform isoamilalkohol (24:1) dan dilanjutkan dengan presipitasi menggunakan Na asetat 3M pH 4,8 (0,1 kali volume) dan etanol absolut (2 kali volume).

d. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR merupakan suatu teknik analisis dalam bidang biologi molekuler untuk mengamplifikasi (memperbanyak) sekuen DNA tertentu. Dasar dari metode PCR adalah proses replikasi DNA yang terjadi di dalam sel, yang memerlukan cetakan DNA, primer, nukleotida, dan enzim polimerase DNA.

PCR mampu mengamplifikasi daerah spesifik DNA menggunakan sistem siklus temperatur dan enzim polimerase yang termostabil serta primer DNA yang spesifik. Panjang DNA target nukleotida yang posisinya diapit oleh sepasang primer. Primer yang berada sebelum daerah target disebut *forward* dan yang berada setelah target disebut *reverse*. Dengan teknik ini, kita dapat menghasilkan DNA dalam jumlah besar dalam waktu singkat. Metode PCR tersebut sangat sensitif dan dapat dilakukan pada sampel DNA yang sangat sedikit yaitu 5 ng DNA serta dilakukan pada volume reaksi yang sangat kecil yaitu 20-100 µl.

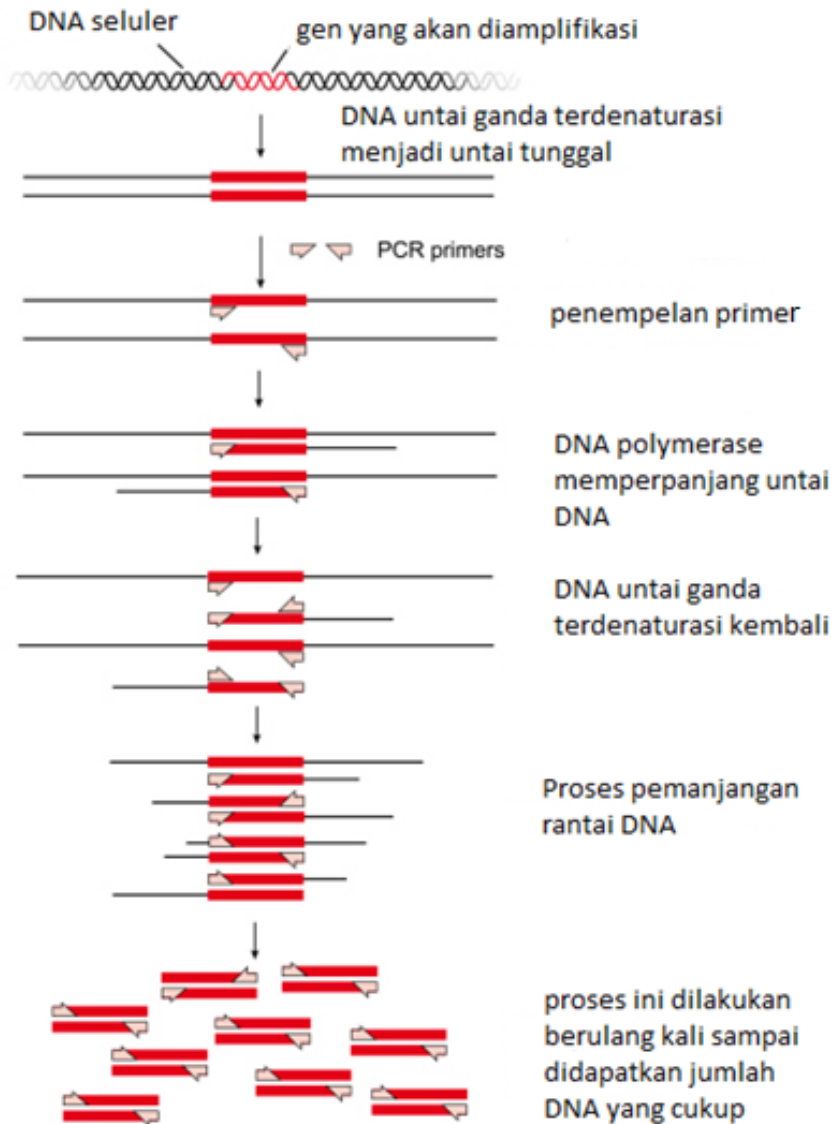
Untuk melakukan PCR ada beberapa komponen utama yang diperlukan yaitu:

- 1) DNA cetakan, yang merupakan target DNA yang akan diamplifikasi. DNA ini bisa berupa sampel dari makhluk hidup, sisa organisme, atau hasil pengolahan industri.
- 2) Primer (15-25 basa), yang digunakan untuk mengawali sintesis DNA. Primer harus identik dan harus memiliki kemiripan dengan sekuens dari nukleotida yang akan kita perbanyak. Desain primer bisa kita peroleh dari publikasi jurnal dan kemudian bisa kita pesan ke *supplier* penyedia jasa.
- 3) Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), meliputi dATP, dCTP, dTTP, dGTP sebagai substrat untuk reaksi polimerisasi DNA. dNTP dapat kita pesan dari supplier.
- 4) Polimerase DNA yang merupakan enzim yang berfungsi sebagai katalis dalam sintesis DNA. Polimerase DNA yang digunakan adalah yang thermostabil, tahan pemanasan suhu tinggi. Polimerase DNA ini diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus*, bakteri yang hidup pada sumber air panas.

Proses PCR (Gambar 5.9) diawali dengan denaturasi DNA cetakan pada suhu tinggi, sehingga DNA akan mengalami perubahan konformasi dari untai ganda menjadi untai tunggal. Proses *annealing* terjadi pada suhu tertentu yang tergantung pada panjang primer yakni 5°C di bawah T_m (*Melting Temperatur*) dan cetakan DNA. Tahapan selanjutnya adalah sintesis DNA yang dikatalisis oleh polimerase DNA. Sintesis DNA terjadi pada suhu tinggi dibandingkan tahapan sebelumnya yaitu 72°C. Reaksi-reaksi tersebut diulang sampai 20-30 siklus sehingga pada akhir reaksi akan diperoleh fragmen DNA dengan jumlah yang berlipat ganda.

Tahap yang penting pada metode PCR ini adalah penentuan primer dan penentuan temperatur *annealing*. Primer yang digunakan harus komplemen secara spesifik pada DNA target, jika tidak spesifik maka akan diperoleh hasil amplifikasi yang tidak spesifik (lebih dari satu produk). Untuk *temperatur annealing*, jika *temperatur annealing* tidak terlalu tinggi, primer tidak bisa komplemen dengan target maka sintesis tidak akan terjadi, sebaliknya jika temperatur *annealing* terlalu rendah, maka primer akan menempel di beberapa

tempat secara tidak spesifik. Protokol untuk PCR bisa dilihat secara lebih detail di website: www.protocol-online.org.



Gambar 5.9. Tahapan Proses dalam PCR
Gambar dimodifikasi dari <http://www.goatbiology.com/caetestpccr.html>.

Primer harus spesifik sehingga dapat menempel pada target nukleotida.

e. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu teknik pemisahan molekul dalam suatu campuran di bawah pengaruh medan listrik berdasarkan ukuran molekulnya. Molekul terlarut dalam medan listrik bergerak dengan kecepatan yang ditentukan oleh rasio muatan dan massa. Sebagai contoh, jika dua molekul dengan muatan lebih besar akan bergerak lebih cepat ke elektrode. Elektroforesis gel agarose adalah metode untuk memisahkan dan memvisualisasikan fragmen DNA atau RNA. DNA yang bermuatan negatif dipisahkan berdasarkan ukurannya, dengan melewati DNA melalui matriks pori-pori gel agarosa yang diletakkan pada medan listrik. DNA akan bergerak ke arah anoda (positif) (Gambar 5.10).

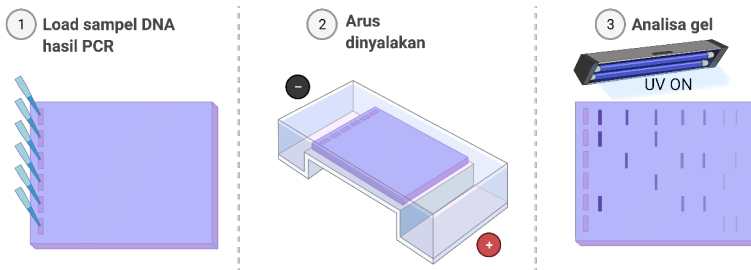
Agarosa yang disari dari ganggang laut, merupakan polimer dengan dasar struktur D-galaktosa dan 3,6-anhidro L-galaktosa yang tidak larut dalam, air (atau buffer) pada suhu ruang tetapi larut dalam air panas (atau buffer). Ketika dipanaskan dalam air/ buffer, agarosa akan melarut kemudian ketika didinginkan akan berpolimerisasi dan membentuk masa setengah padat (berbeda dengan media agar pada cawan petri). Semakin besar konsentrasi agarosa yang digunakan maka akan semakin keras konsistensinya dan akan semakin bagus untuk memisahkan nukleotida yang perbedaan ukuran molekulnya kecil (lihat tabel 5.3). Gel agarosa mempunyai daya pemisahan lebih rendah jika dibandingkan dengan gel poliakrilamid, tetapi mempunyai rentang pemisahan lebih besar. DNA dari 200 basa sampai 50 kilobasa dapat dipisahkan dengan gel agarosa dengan berbagai konsentrasi agarosa.

Tabel 5.3. Kemampuan Pemisahan Agarosa dalam Berbagai Konsentrasi

Agarosa % (w/v)	Kisaran Pemisahan Nukleotida
0.3	5-60 kb
0.6	1-20 kb

Agarosa % (w/v)	Kisaran Pemisahan Nukleotida
0.7	0.8-10 kb
0.9	0.5-7 kb
1.2	0.4-6 kb
1.5	0.2-4 kb
2.0	0.1-3 kb

Karena DNA tidak berwarna, maka untuk visualisasi yang paling mudah untuk mendeteksi adanya DNA dengan menggunakan etidium bromida, suatu senyawa berfluoresensi yang biasanya digunakan untuk mendeteksi DNA pada gel agarosa atau poliakrilamid. Senyawa ini bersifat karsinogenik sehingga harus diperlakukan dengan sangat hati-hati. Senyawa ini terinterkalasi di antara untai sepanjang molekul DNA. Radiasi ultraviolet pada 254nm diabsorpsi oleh DNA dan ditransmisikan pada etidium bromid; radiasi pada 302 nm 366 nm diserap oleh etidium bromid. Pada kedua keadaan ini energinya dipancarkan pada 590nm pada daerah jingga-merah. Etidium bromida dapat digunakan untuk deteksi baik asam nukleat untai tunggal maupun untai ganda (RNA dan DNA), akan tetapi afinitas etidium bromida pada asam nukleat untai tunggal relatif rendah dan hasil fluoresensinya kurang jika dibandingkan dengan untai ganda. Senyawa lain yang bisa digunakan untuk visualisasi DNA adalah MegaFluor, SYBR Safe, GelRed, dan GelGreen yang relatif aman dan mudah dalam penanganan limbahnya.



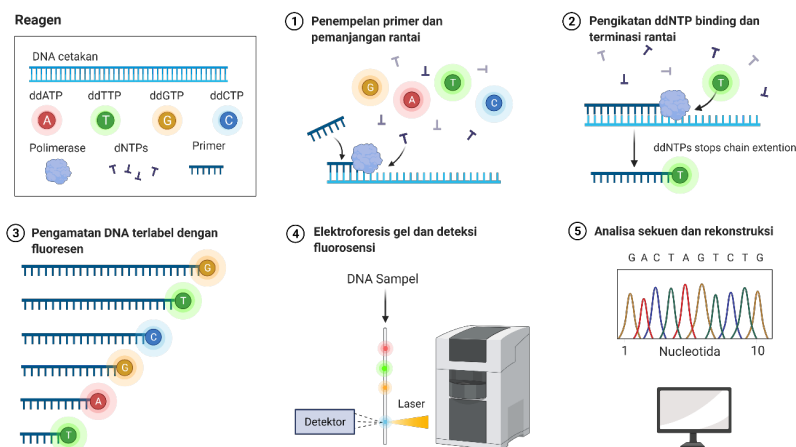
Gambar 5.10. Proses Elektroforesis
Gambar dibuat dengan BioRender

(1) Penyiapan sampel (ditambahkan dengan *loading buffer*), (2) Aplikasi elektroforesis. Nukleotida akan bergerak ke arah anoda yang bermuatan positif yang mana kecepatan bermigrasi dipengaruhi oleh ukuran nukleotida. Nukleotida yang panjang (ukurannya besar) akan bermigrasi lebih lambat dibandingkan yang ukurannya lebih kecil, (3) Untuk melihat hasil elektroforesis (elektrogram) diamati di bawah sinar UV. Adanya DNA penanda atau *DNA ladder* berguna untuk mengetahui ukuran nukleotida yang bermigrasi.

f. Sekuensing Nukleotida

Sekuensing DNA merupakan proses pembacaan urutan basa pada DNA (hasil fragmen PCR). Proses sekuensing mirip dengan teknik PCR di mana memiliki tiga tahapan yaitu 1; denaturasi pada suhu 94°C , 2; *annealing* pada suhu 50°C , dan 3; elongasi pada suhu 60°C . Perbedaan utama antara PCR dan sekuensing adalah proses *annealing* (penempelan primer) hanya menggunakan salah satu primer (*forward* atau *reverse primer* saja) sehingga apabila ingin melakukan sekuensing produk PCR maka reaksinya harus dipilah menjadi dua, yaitu reaksi untuk *forward primer* dan reaksi untuk *reverse primer*. Selain itu, pada elongasi terjadi pada suhu 60°C (bukan 72°C seperti pada PCR). Hal ini dikarenakan DNA polymerase harus menambahkan ddNTPs (*dideoxynucleotide triphosphates*-suatu DNTP yang kehilangan gugus OH pada posisi atom 3' dan berlabel fluoresen) di mana posisi OH diganti dengan H sehingga tidak ada perpanjangan rantai DNA sehingga proses elongasi terhenti. Karena ddNTP berlabel maka bisa diketahui jenis basa pada saat proses elongasi terhenti. Karena hanya satu primer

yang digunakan untuk proses sekuensing dan proses penempelan ddNTP terjadi secara acak maka dibutuhkan cetakan DNA dalam jumlah banyak. Setelah proses sekuensing berhenti, hasil reaksi yang berupa campuran nukleotida dalam berbagai ukuran harus dipisahkan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida yang bisa memisahkan nukleotida dengan perbedaannya satu basa. Adanya label fluoresens memungkinkan deteksinya bisa dihubungkan dengan sinar laser yang akan merangsang munculnya warna apabila label dideteksi dengan spektrograf dan dihasilkan elektro-spektrogram yang berisi urutan basa nukleotida yang dianalisis. Tahapan sekuensing bisa dilihat pada gambar 5.11 atau bisa juga dipelajari melalui website <https://universe-review.ca/R11-16-DNAsequencing.htm>. Di Indonesia, tidak semua institusi penelitian memiliki alat DNA sekuensing (*DNA sequencer*) seperti Ion Torrent PGM) namun kita masih bisa melakukannya uji tersebut dengan mengirimkan sampel ke vendor penyedia sekuensing. Kita akan menerima data *electropherogram* dan format FASTA, yaitu teks yang berisi urutan basa atau asam amino yang direpresentasikan dalam bentuk satu huruf.



Gambar 5.11. Proses Sekuensing DNA

Gambar dibuat dengan BioRender

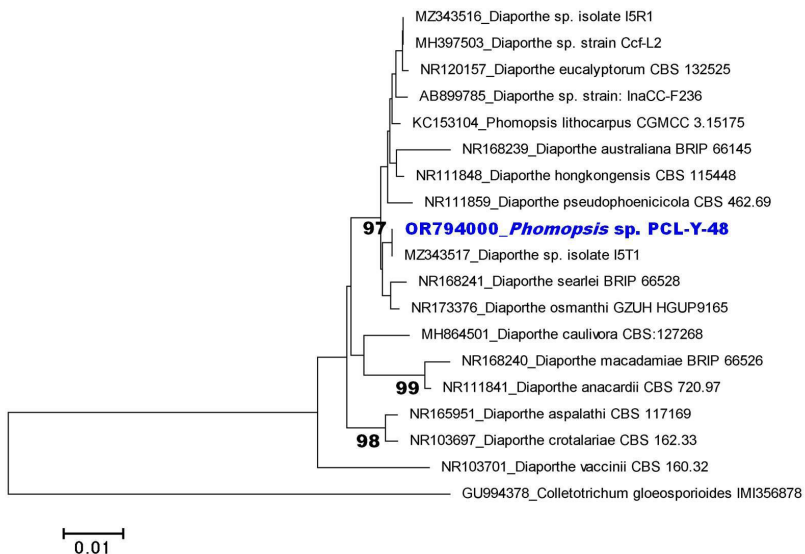
(1) Campuran reaksi terdiri atas DNA cetakan (produk PCR), primer, enzim polymerase, dNTP dan ddNTP; (2) Reaksi acak yang terjadi selama *annealing* dan elongasi; (3) Elektroforesis dengan gel poliakrilamid; (4) Deteksi sinar laser yang akan menghasilkan *electropherogram*.

g. Pencarian Nukleotida dengan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)

Setelah kita mendapatkan urutan basa nukleotida DNA maka kita akan menentukan kesamaan sekuens (homologi) yang kita peroleh dengan data di bank gen (*Genbank*) NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) menggunakan BLAST. BLAST akan mencari daerah (*region*) yang mirip dengan sekuens yang kita miliki (*query sequences*) dengan sekuens (*Subjects*) pada database NCBI (termasuk *GenBank*, *EMBL (European Molecular Biology Laboratory)*) dengan menghitung signifikansi statistik antarkesesuaian urutan. BLAST juga bisa digunakan untuk menyimpulkan hubungan fungsional dan evolusi antarsekuens dan membantu mengidentifikasi anggota dari famili gen.

h. Pohon Filogenetik Fungi

Salah satu cara untuk mengklasifikasikan organisme yang menunjukkan filogeni adalah dengan menggunakan yang disebut dengan klade. Klade adalah sekelompok organisme yang meliputi leluhur dan semua keturunannya. Klade didasarkan pada kladistika yang merupakan metode membandingkan ciri-ciri spesies terkait untuk menentukan hubungan leluhur dan keturunannya. Klades diwakili oleh kladogram, seperti pada gambar 5.12.



Gambar 5.12. Contoh Pohon Filogenetik Jamur Endofit *Phomopsis* sp. Galur PCL-Y-48 yang Diisolasi dari *Peronema canescens*
Sumber: Triastuti *et al.*, 2025

C. Preservasi Endofit

Untuk menghindari hilangnya koloni yang terisolasi akibat kontaminasi, isolasi ulang pada tabung kriogenik miring yang disiapkan PDA dan penyimpanan selanjutnya direkomendasikan di ruang dingin pada suhu 4° C dan freezer -80°C. Untuk pengawetan kultur jangka panjang, miselia dan spora harus dipindahkan ke

dalam 20-30% gliserol dalam aquabides steril dan disimpan pada suhu -80°C . Alternatif lain untuk pengawetan monokultur jangka panjang adalah memindahkan potongan kecil media kultur yang telah diinokulasi sebelumnya ke tabung mikro steril yang berisi 30% gliserol (v/v) dan media beras steril, diikuti dengan inkubasi pada suhu 25°C . Setelah pertumbuhan jamur diamati, tabung mikro harus dipindahkan ke ruangan dingin (4°C) dan disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C (Liao *et al.*, 2022).

Jamur endofit yang telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi harus disimpan dengan baik karena merupakan salah satu kekayaan hayati nusantara. Selain menyimpan di koleksi kultur endofit kampus, *cryo* jamur endofit dapat dikirim dan disimpan ke Indonesian Culture Collection (InaCC) BRIN.

6

FERMENTASI ENDOFIT

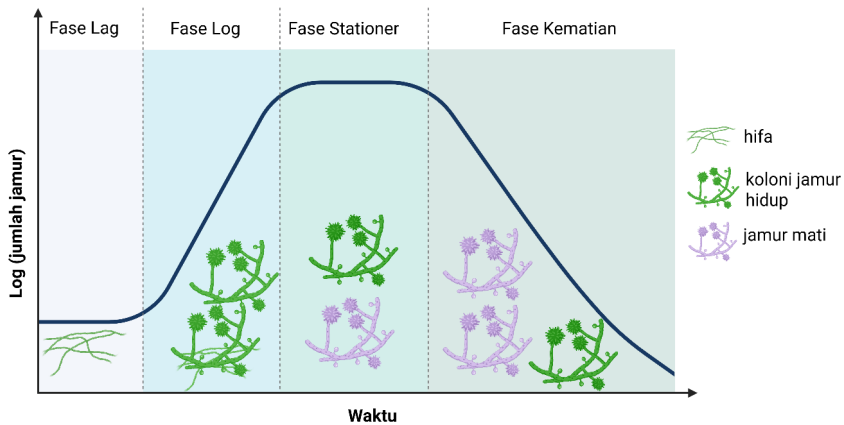
Fermentasi jamur endofit melibatkan pertumbuhan jamur dalam lingkungan yang terkendali untuk menghasilkan senyawa yang berharga, seperti metabolit dengan khasiat obat atau enzim. Proses ini dapat dilakukan melalui fermentasi cair atau padat, menggunakan media dan kondisi tertentu untuk mengoptimalkan produksi metabolit yang diinginkan.

A. Tujuan Fermentasi

Proses fermentasi dilakukan untuk mendapatkan senyawa dari jamur. Proses ini harus didahului dengan uji skala pilot di laboratorium untuk memastikan semua proses akan berjalan dengan baik sesuai dengan parameter pertumbuhan yang telah ditetapkan dan divalidasi.

B. Fase Pertumbuhan Jamur

Secara umum, terdapat lima fase dalam pertumbuhan jamur: fase *lag*, fase *log*, fase stasioner, dan fase kematian (Gambar 6.1).



Gambar 6.1. Fase Pertumbuhan Jamur
Gambar dibuat dengan BioRender

Fase *Lag* atau disebut sebagai fase adaptasi ditandai dengan jumlah reproduksi selnya sedikit atau tidak ada sama sekali karena jamur menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru. Fase *Log* (eksponensial) ditandai dengan pertumbuhan sel, hifa, dan micelia sel dengan cepat. Pada fase ini jamur memiliki jumlah sumber makanan yang sangat melimpah sehingga jamur dapat bereproduksi dengan kecepatan yang konstan. Pada fase *log* juga dihasilkan metabolit primer yang berfungsi mendukung pertumbuhan dan reproduksi jamur. Fase stasioner ditandai dengan jumlah sel baru sama dengan jumlah sel yang mati karena jumlah sumber makanan mulai menipis. Jamur mempertahankan ekosistemnya agar bisa bertahan pada kondisi tersebut dengan cara memproduksi metabolit (sekunder). Fase yang terakhir adalah fase kematian, disebut demikian karena tingkat kematian sel lebih cepat daripada regenerasinya. Pada fase ini sumber makan mulai habis, senyawa toksik mulai dilepaskan ke media, dan jamur tidak bisa mempertahankan kelangsungan hidupnya karena sifat saprofitnya.

Fase *lag* bisa berlangsung 1-2 hari, tergantung sifat jamurnya dan ketersediaan sumber makanan/komposisi media. Fase *log* bisa berlangsung antara hari ke 3-14, dan fase stasioner antara

hari 14-21, diikuti dengan fase kematian. Lamanya waktu tiap fase pertumbuhan sangat bergantung pada sifat genetik jamur. Ada jamur yang dikategorikan *fast growth* (cepat tumbuh) ataupun *slow growth* (pertumbuhannya lambat). Karakteristik pertumbuhan jamur harus diamati dengan baik agar kita dapat memaksimalkan pertumbuhan dan produksi metabolit sekundernya.

C. Media Pertumbuhan Jamur

Seperi organisme lain, endofit membutuhkan media untuk kelangsungan hidupnya. Jenis media bermacam-macam berdasarkan jenis jamur yang ingin dikulturkan atau diisolasi dan yang terpenting berdasarkan optimasi yang telah dilakukan sebelumnya. Meskipun suatu media satu dengan yang lainnya kadang hanya memiliki perbedaan sedikit tetapi dapat memberikan hasil kultur yang jauh berbeda. Media dapat dibuat sendiri di laboratorium atau dibeli dari *supplier* seperti Oxoid, HiMedia, BBL atau GIBCO. Tabel 6.1 menjelaskan beberapa jenis media yang sering digunakan dalam kultur endofit.

1. Jenis Media

Media bisa dibedakan berdasarkan komposisinya, konsistensinya, ataupun tujuan penggunaannya (isolasi, identifikasi, fermentasi). Media berdasarkan konsistensinya bisa dibedakan menjadi: (a) media cair, contohnya adalah media sukrosa, *broth medium*, dan media peptone; (b) media semi padat, contohnya media semisolid *sucrose* (SSS, Cony and Blair medium, ataupun Fletcher's medium); (c) media padat, contohnya adalah media agar; *Potato dextrose agar*, *Malt Extract Agar*, *Yeast extract agar*.

Media juga dapat diklasifikasikan berdasarkan tujuan penggunaannya yang meliputi:

a. Media Isolasi/Kultur

Media isolasi digunakan sebagai sarana menumbuhkan jamur, misalnya PDA, MEA, dan media agar lain. Media untuk memacu sporulasi jamur juga termasuk golongan ini seperti McClary's

medium untuk memacu askospora pada beberapa *yeast*, atau Leonian's agar untuk memacu sporulasi *Ascomycetes*.

b. Media Identifikasi

Media ini digunakan sebagai salah satu cara mengidentifikasi jenis jamur karena jamur akan membentuk koloni yang berbeda pada media yang berbeda pula. Contohnya genus *Penicillium* dan *Aspergillus* memiliki koloni khas pada Czapek, media untuk *Candida albicans*. Beberapa morfologi fungi berdasarkan media yang digunakan untuk kultur bisa dilihat pada web berikut: <http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/accueil.php?lang=eng>

c. Media Fermentasi

Media ini digunakan untuk memacu produksi metabolit sekunder pada endofit. Media ini dipilih berdasarkan optimasi terhadap media yang paling mendukung terbentuknya metabolit dalam jumlah besar. Contoh media fermentasi adalah *Yeast Malt agar*.

2. Komposisi Media

Karena jamur adalah organisme heterotroph, maka jamur membutuhkan nutrisi yang harus ada dalam media dalam jumlah yang cukup. Beberapa jenis nutrisi yang dibutuhkan jamur adalah sebagai berikut:

a. Sumber Karbon

Sumber karbon bisa berupa karbohidrat seperti glukosa atau senyawa organik lain seperti protein, molase, atau ekstrak malt. Oatmeal dan kentang rebus atau roti juga bisa digunakan sebagai sumber karbon.

b. Sumber Nitrogen

Nitrogen biasanya berupa protein, pepton, *corn steep liquor*, atau ekstrak *yeast*.

c. Fosfat dan Logam

Magnesium dan besi juga dibutuhkan untuk pertumbuhan jamur. Fosfat berfungsi sebagai buffer untuk menjaga pH media

sementara magnesium dan besi berfungsi sebagai kofaktor dalam reaksi enzimatik.

Beberapa jamur tumbuh dengan baik pada media alami seperti pada media wortel, ekstrak cherry, atau media yang ditambahkan dengan rebusan beras.

Tabel 6.1. Komposisi Beberapa Media untuk Kultur Jamur Endofit

Komposisi (g/L)	Sabouraud (SA)	Czapek yeast extract agar (CYA)	Potato Dextrose Agar (PDA)	Dextrose Casein Agar (DCA)	Malt Extract Agar (MEA)	Yeast Extract Sucrose Agar (YES)	Yeast Malt (YM)	Kohlmeyer Solid medium (KMS)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	0.005	0.005	-	0.005	0.005	-	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	0.01	-	-	-	-	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	0.5	-	-	-	0.5	-	2.4
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-	0.01	0.01	-	0.01	0.01	-	-
KCl	-	0.5	-	-	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	-	1	-	-	-	-	-	-
NaNO ₃	-	3	-	-	-	-	-	-
NH ₄ NO ₃	-	-	-	-	-	-	-	2.4
Tris buffer (R-NH ₂)	-	-	-	-	-	-	-	1.21
<i>Peptone</i>	10	-	-	-	1	-	-	-
<i>Casein enzymatic digest</i>	-	-	-	10	-	-	-	-
<i>Yeast extract</i>	-	5	-	-	-	20	2	-
<i>Malt extract</i>	-	-	-	-	20	-	10	-
<i>Potato extract</i>	-	-	4	-	-	-	-	-
Glukosa	10	-	20	40	20	-	10	5
Sukrosa	-	30	-	-	-	150	-	-
Agar	15	15	15	15	20	20	20	20
Aquades	1	1	1	1	1	1	1	1

D. Prosedur Umum Penyiapan Media

Metode penyiapan media untuk jamur secara umum adalah sama. Media agar 15–20 g (tergantung komposisi media) bersama dengan bahan-bahan lain ditimbang dan dilarutkan dalam 1 L aquabidest, dalam erlenmeyer atau botol Duran©, diaduk sampai

larut kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf (121°C selama 15 menit). Dalam kondisi agar masih cair (tetapi tidak terlalu panas setelah diambil dari autoklaf), media kemudian dituang ke dalam cawan petri atau tabung reaksi.

Media agar yang mengandung dekstrosa bisa ditambahkan asam tartrat 10% untuk mencapai keasaman pH 3.5 tetapi tidak boleh dipanasi ulang karena agar tidak bisa mengeras kembali disebabkan dengan adanya asam mengubah struktur dari agar. Antibiotik bisa ditambahkan ke dalam media untuk mencegah kontaminasi bakteri. Hanya kloramfenikol yang tahan terhadap pemanasan (autoklaf) sehingga bisa dicampur langsung dengan larutan media sebelum disterilisasi. Antibiotik lainnya (penicillin-G, Streptomycin, neomycin) dapat ditambahkan pada saat kondisi agar masih hangat sebelum dituang (dilakukan secara steril). Penambahan antibiotik untuk studi metabolomik jamur sebaiknya dihindari karena dapat mempengaruhi hasil deteksi senyawa kimia yang dihasilkan jamur sehingga hasil analisis menjadi bias.

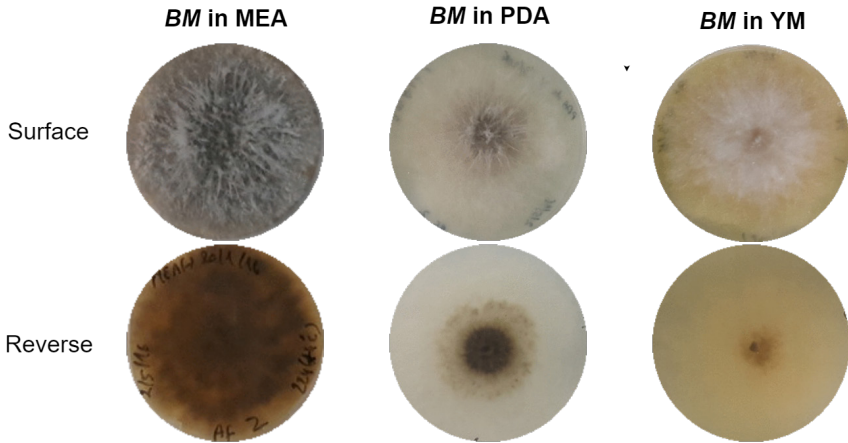
Tanggal pembuatan media dan nama ditulis pada kemasan pembungkus cawan petri/tabung reaksi untuk memudahkan identifikasi dan mengetahui lamanya media tersebut disimpan. Media yang sudah jadi kemudian disimpan pada suhu ruang selama 24 jam untuk melihat apakah ada kontaminasi. Apabila tidak ada kontaminasi maka media kemudian disimpan pada ruang penyimpanan bersuhu 4°C sampai waktu digunakan.

E. Optimasi Kultur Endofit dengan Penggunaan Media yang Berbeda

Tujuan kultur endofit adalah untuk memaksimalkan pertumbuhan sehingga (basionim *Botryosphaeria mamane*) diperoleh metabolit sekunder yang maksimal. Kesesuaian media untuk kultur atau fermentasi harus ditentukan dalam skala kecil sebelum dilakukan kultur dalam volume besar. Penggunaan media yang keliru mengakibatkan produksi metabolit yang rendah atau bahkan mengakibatkan jamur tidak tumbuh. Kesesuaian jamur

dengan medianya dapat kita lihat dari morfologi pertumbuhannya. Untuk optimasi biasanya digunakan cawan petri diameter 5–9 cm atau erlenmeyer kapasitas <100 ml. Waktu kultur untuk cawan petri 5 cm dilakukan maksimal 7 hari dan 14 hari untuk cawan petri diameter 9 cm. Penggunaan media cair pada erlenmeyer bisa dilakukan 7–14 hari inkubasi. Contoh metode pemilihan media untuk pertumbuhan jamur endofit ditampilkan pada gambar 6.2.

Endofit *Cophiniforma mamane* merupakan salah satu jamur yang berpotensi dikembangkan sebagai antimalaria. Metabolit sekunder dari jamur ini di antaranya adalah botryosulphuranol A – C, siklopeptida, dan derivat mellein. Dari gambar 6.2 dapat dilihat gambaran morfologi dari jamur *C. mamane* pada tiga media yang berbeda, yaitu MEA, PDA, dan YM dengan pengamatan permukaan atas dan bawah. Pada pengamatan permukaan bagian atas, terlihat *C. mamane* tumbuh merata menutupi media agar pada MEA dan PDA, dan hanya tumbuh sedikit pada YM. Selain itu, *C. mamane* akan menghasilkan warna hitam kecoklatan ketika dewasa dan ini tampak pada media MEA. Warna media yang berubah menjadi coklat menandakan dilepaskannya metabolit sekunder pada agar yang dapat dilihat dengan jelas pada MEA dibandingkan pada PDA dan YM. Secara morfologi, kita dapat mengasumsikan bahwa media MEA merupakan media yang paling sesuai untuk kultur *C. mamane* (Barakat *et al.*, 2019). Untuk lebih memastikan bahwa morfologi pertumbuhan berkorelasi dengan kandungan metabolit, dilakukan pemastian kandungan metabolit dengan Teknik KLT atau LC-MS.



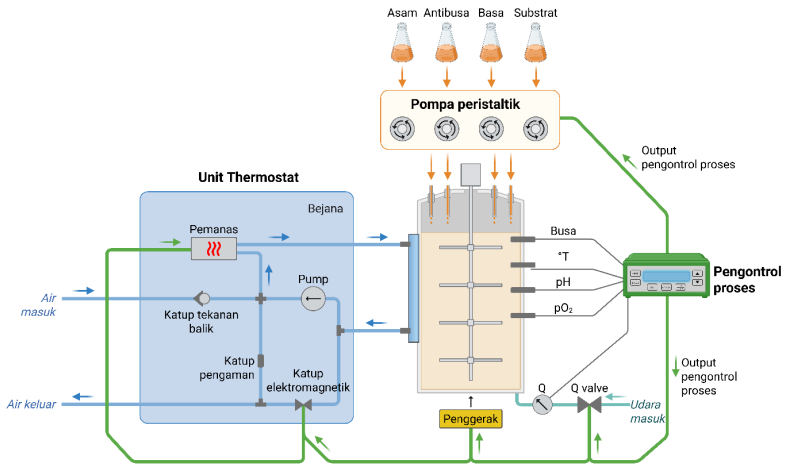
Gambar 6.2. Morfologi Pertumbuhan Jamur Endofit *Cophinforma mamane* Setelah 7 Hari Inkubasi. Pada MEA (kiri), PDA (tengah), dan YM (kanan) dengan pengamatan tampak atas dan bawah.

Sumber: Foto Koleksi Pribadi

Setelah ditentukan media yang mendukung pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder secara maksimal, kultur endofit dalam skala besar dapat dilanjutkan. Hal ini dilakukan menggunakan media yang lebih besar, misalnya dengan cawan petri berdiameter 15 cm atau dengan media cair pada erlenmeyer ukuran 500 mL atau 1 L. Tentunya perlu dilakukan beberapa replikasi agar didapatkan jumlah metabolit yang cukup.

F. Fermentasi Cair

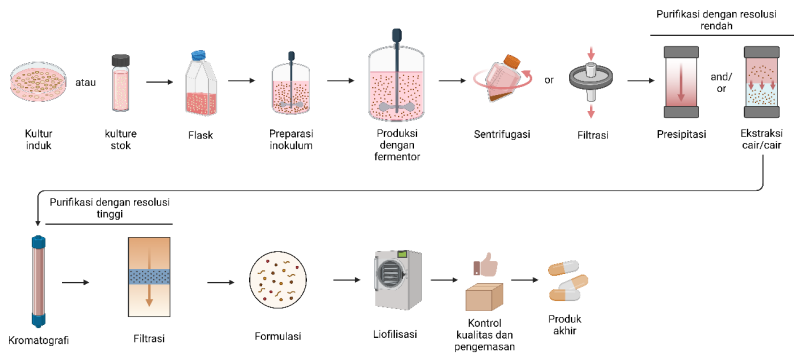
Dalam fermentasi cair digunakan sistem tertutup. Fermentasi sederhana bisa dilakukan menggunakan Erlenmeyer 250 ml s.d. 1 L untuk skala laboratorium dan bisa dilakukan secara statik atau dengan penggojokan (*shaking*). Di industri, proses fermentasi berlangsung lebih kompleks menggunakan alar fermentor/bioreaktor. Media, pH, suhu, dan aerasi dikontrol secara otomatis (Gambar 6.3).



Gambar 6.3. Proses dalam Fermentasi dan Teknologi Kontrolnya
Gambar dibuat dengan BioRender

Fermentasi dilakukan apabila sudah ditemukan metode fermentasi yang optimal pada skala pilot di laboratorium. Selain itu, metabolit sekunder yang akan diekstraksi juga harus sudah lengkap karakteristiknya, baik fisika maupun kimia.

Setelah fermentasi selesai, selanjutnya diperlukan proses pemisahan target metabolit dari mediana. Hal ini biasanya melibatkan beberapa teknik kromatografi dan filtrasi (Gambar 6.4).



Gambar 6.4. Alur Proses Produk Fermentasi
Gambar dibuat dengan BioRender

Proses purifikasi produk fermentasi dilakukan beberapa kali untuk menghasilkan target senyawa yang murni, bebas kontaminan. Senyawa kemudian dapat diformulasikan menjadi bentuk sediaan yang diinginkan dan dipasarkan sebagai produk akhir.

7

EKSTRAKSI DAN IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER DARI JAMUR ENDOFIT

Metabolit dari jamur seperti halnya metabolit yang dihasilkan oleh tanaman dapat kita ekstraksi dan kita tentukan jenis atau struktur senyawanya. Metode yang digunakan dalam ekstraksi dan identifikasi metabolit tentunya sangat bergantung pada tujuan penelitian dan ketersediaan instrumen di laboratorium. Untuk teknik ekstraksi yang digunakan umumnya mirip antara metode konvensional dan metode modern. Ekstraksi biasanya dilakukan dengan alat-alat standar seperti Soxhlet, maserator, perkolator, atau ekstraksi dengan bantuan sonikator. Sementara untuk teknik identifikasi senyawa pada metode konvensional biasanya mengandalkan teknik KLT atau HPLC. Teknik modern umumnya menggunakan instrumen yang lebih canggih seperti HPLC-MS, GC-MS, dan NMR.

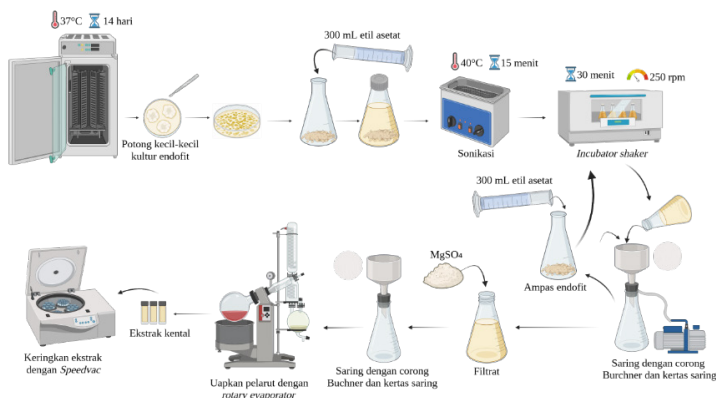
A. Metode Ekstraksi Konvensional

Metode konvensional dalam ekstraksi dan identifikasi metabolit sekunder meliputi ekstraksi dengan berbagai metode. Untuk endofit yang dikulturkan pada media semi padat dapat dilakukan pemotongan agar menjadi ukuran 0,5 cm–1 cm x 0,5 cm–1 cm. Potongan agar ini lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer, dan ditambahkan dengan pelarut. Umumnya perbandingan sampel dan pelarut adalah 1:5 atau 1:10 (b/v). Selanjutnya, dilakukan ekstraksi dengan sonikator selama 30 menit–1 jam. Larutan disaring dengan kertas saring atau miracloth®. Kultur jamur dapat diekstrak ulang untuk memaksimalkan tersarinya metabolit.

Metode lain yang digunakan dalam ekstraksi endofit pada media semi padat adalah menghilangkan air yang ada pada media

terlebih dahulu menggunakan *freeze dryer*. Teknik ini sangat efektif apabila kita memiliki sampel dengan berbagai seri pertumbuhan atau sampel dengan jumlah yang banyak yang tidak memungkinkan untuk dilakukan dalam satu kali proses ekstraksi. Setelah kultur jamur dalam agar kering dalam *freeze dryer*, selanjutnya dapat ditaruh di erlenmeyer dan ditambahkan pelarut untuk selanjutnya diekstraksi menggunakan sonikator atau maserasi biasa.

Teknik ini bisa untuk ekstraksi jamur yang ditumbuhkan dalam media cair seperti PDB (*Potato Dextrose Broth*), tergantung dari tujuan pengujian yang dilakukan. Beberapa endofit melepaskan senyawa metabolitnya ke dalam media dan ada yang memang menyimpannya dalam massa sel (biomassa). Apabila ingin mempelajari metabolit total yang diproduksi oleh endofit, dapat dilakukan penambahan langsung pelarut sama banyak ke dalam media cair yang berisi endofit. Selanjutnya dapat dilakukan ekstraksi dengan sonikator secara berulang. Namun, apabila ingin mempelajari apakah jenis senyawa yang disimpan di dalam sel atau yang dikeluarkan ke media, maka dapat dilakukan ekstraksi pada media cair dan pada biomassa. Caranya, kultur jamur disaring dengan miracloth® atau kain kasa untuk memisahkan endofit dan media cairnya. Penggunaan kertas saring tidak efektif karena biasanya biomassa akan menyumbat kertas saring saat filtrasi dan mengakibatkan kertas saring robek. Penggunaan miracloth®, yaitu sejenis kain filter cukup lentur dan kuat menahan biomassa selama proses filtrasi. Setelah biomassa dan media terpisah, dapat dilakukan maserasi dengan sonikator pada biomassa, sementara untuk media dilakukan ekstraksi cair-cair dengan pelarut yang digunakan (biasanya etil asetat) (Gambar 7.1).



Gambar 7.1. Teknik Ekstraksi Jamur Endofit
Gambar dibuat dengan BioRender

Setelah sari diperoleh, baik itu sari total (endofit dan media), atau sari terpisah (endofit atau media saja), dapat dilakukan penguapan pelarut menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak kental selanjutnya dapat dikeringkan dengan Speedvac atau dikeringkan di dalam *fume hood* dan selanjutnya dianalisis menggunakan KLT atau HPLC.

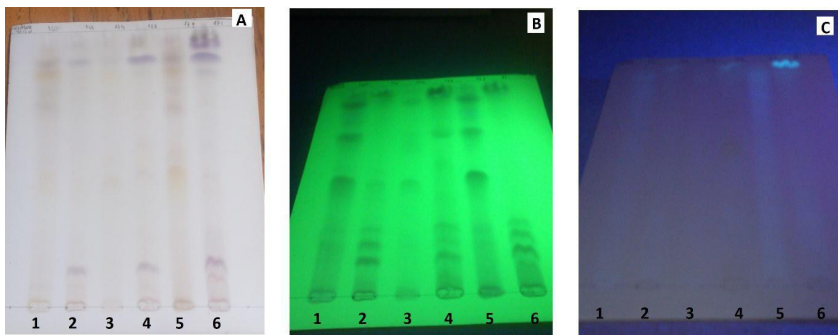
B. Metode Ekstraksi Modern

Pada metode ini, untuk teknik ekstraksi mirip dengan teknik konvensional. Hanya saja, untuk beberapa uji kualitatif, seperti pengujian pertumbuhan endofit dengan seri waktu, atau pengujian yang membutuhkan sampel dalam volume kecil tetapi kuantitas sampel yang besar dapat dilakukan metode ekstraksi yang lebih cepat. Beberapa jenis media volume kecil seperti media plat 6 sumuran, atau 12 sumuran dapat digunakan untuk pengujian kualitatif. Kultur jamur dalam media sumuran dihilangkan kandungannya menggunakan *freeze dryer*. Selanjutnya, kultur jamur yang sudah kering dipotong-potong kecil, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan pelarut yang dimaksud. Satu set perlakuan sampel kemudian ditambahkan pelarut dan diekstraksi menggunakan bantuan sonikator selama 1 jam. Sesudah larutan disaring ke tabung reaksi lain, ekstrak dapat diuapkan secara simultan menggunakan

speed vacuum evaporator, salah satu instrumen yang digunakan untuk menguapkan pelarut dalam volume kecil. Di akhir ekstraksi, akan diperoleh ekstrak kental per sampel dalam jumlah yang sangat kecil. ekstrak dapat disimpan dalam vial 1,5–2 ml.

C. Identifikasi Metabolit dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak jamur endofit selanjutnya bisa dianalisis kandungan kimianya. Metode skrining yang umum digunakan adalah KLT. Sebagai contoh, perbandingan ekstrak etil asetat dari jamur *C. mamane* yang ditumbuhkan pada media MEA, PDA, dan YM (Gambar 7.2). Dalam analisis kandungan kimia, media juga perlu diekstraksi selanjutnya dianalisis bersama dengan ekstrak jamur. Hal ini disebabkan karena media juga mengandung senyawa kimia yang merupakan substrat bagi jamur. Apabila media tidak digunakan sebagai kontrol, senyawa kimia yang terdeteksi bisa jadi bukan metabolit yang dihasilkan jamur melainkan senyawa yang berasal dari media.



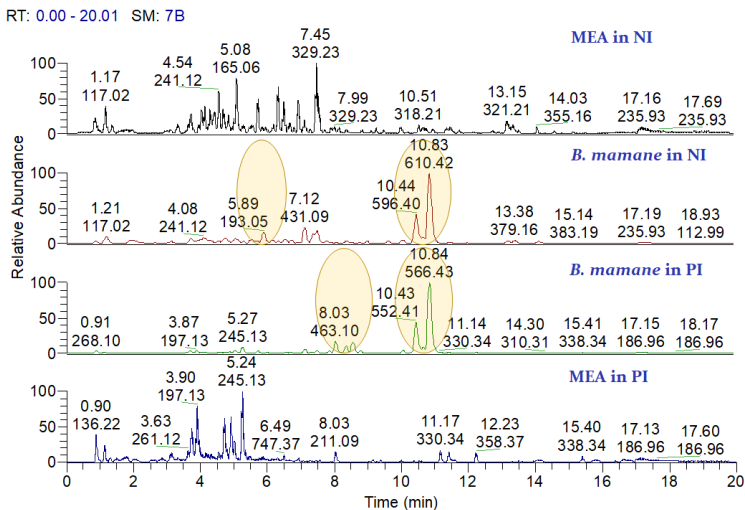
Gambar 7.2. Hasil Pengamatan Ekstrak Etil Asetat *C. mamane* dengan KLT

A. Dengan penyemprotan anilin-asam sulfat; B. di bawah sinar UV 254 nm; C. di bawah sinar UV 366 nm. 1, 3, dan 5 berturut-turut adalah ekstrak etil asetat media MEA, PDA, dan YM. Bercak 2, 4, dan 6 berturut-turut adalah ekstrak etil asetat *C. mamane* pada media MEA, PDA, dan YM.

D. Identifikasi Metabolit dengan LC-MS/MS dalam Optimasi Fermentasi

Untuk identifikasi metabolit endofit dalam ekstrak, dianjurkan menggunakan HPLC-MS atau GC-MS. Hal ini sangat sesuai karena umumnya sampel hasil ekstraksi endofit hanya sedikit (sekitar 0,5 g dari 60 petri dish ukuran diameter 9 cm). Jumlah sampel yang dibutuhkan untuk injeksi pada HPLC-MS atau GC-MS hanya sekitar 2–5 μ l saja. Selain itu, untuk pengujian sampel menggunakan HPLC-MS atau GC-MS dapat dilakukan secara otomatis. Setelah setting sampel dilakukan, kita dapat menganalisis puluhan sampel dalam satu malam, dengan waktu pengujian rata-rata 15 menit per sampel.

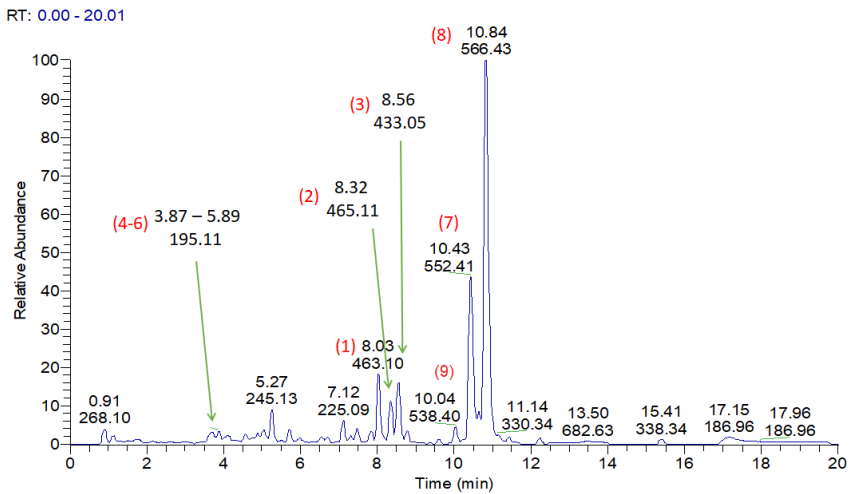
Instrumen LC-MS/MS sangat membantu dalam mengembangkan metode fermentasi terbaik. Dengan teknik ini dapat diidentifikasi metabolit yang diinginkan yang dihasilkan dalam periode tertentu menggunakan sampel yang jumlahnya sedikit; hal yang tidak mungkin dilakukan dengan KLT. Sebagai contoh, Teknik LC-MS/MS digunakan untuk mendeteksi keberadaan senyawa Botryosulfuranol dari jamur *C. mamane* yang dikulturkan pada MEA (Gambar 7.3).



Gambar 7.3. Perbandingan Ionisasi Puncak Dasar (*Base Peak*) (m/z 100-1500) UHPLC-HRMS dari Ekstrak Kasar *B. mamane*. *B. mamane* ditumbuhkan dalam MEA pada ionisasi negatif (NI) dan positif (PI).

Profil kimiawi yang berbeda dari ekstrak yang terdeteksi melalui UHPLC-HRMS dalam kondisi ionisasi negatif (NI) dan positif (PI) menunjukkan bahwa pemilihan media (nutrisi) memengaruhi produksi metabolit pada *B. mamane*. Berdasarkan fenotipe kultur, terlihat bahwa koloni *B. mamane* yang tumbuh pada MEA menunjukkan morfologi yang seragam, dibandingkan koloni yang dikultur pada YM atau PDA (Gambar 6.2).

Kromatogram UHPLC-HRMS dalam kondisi PI dari *B. mamane* yang dikultur pada MEA dapat dilihat pada gambar 7.4. Beberapa puncak terdeteksi dengan intensitas tinggi pada m/z 245,13, m/z 463,10, m/z 465,11, m/z 566,43, m/z 433,05, m/z 433,05, m/z 538,40, m/z 552,41, dan m/z 566,43.

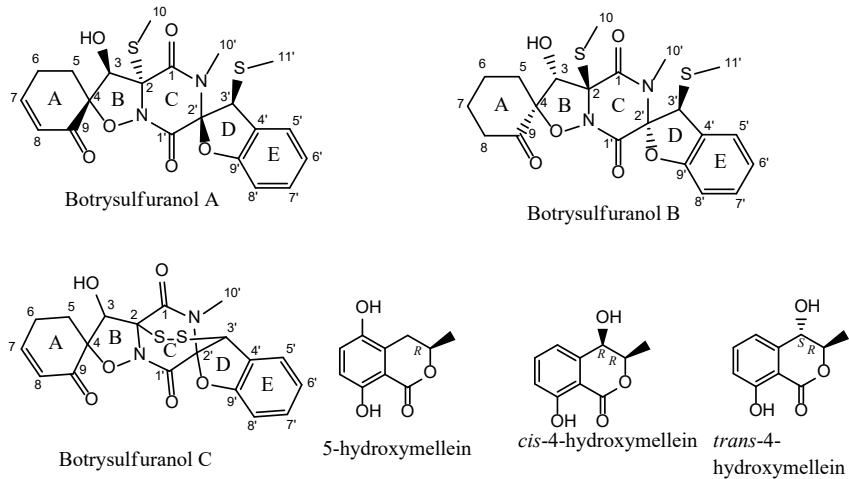


Gambar 7.4. Kromatogram UHPLC-HRMS pada Ionisasi Positif dari Ekstrak Etil Asetat *B. mamane* yang Dikultur pada MEA

Senyawa 1-3 adalah golongan Botryosulfuranols (A-C), senyawa 4-6 berturut-turut adalah derivat mellein; trans-4-hydroxymellein, 4-hydroxymellein, dan 5-hydroxymellein. Senyawa (7-9) dideteksi sebagai Cyclopeptide.

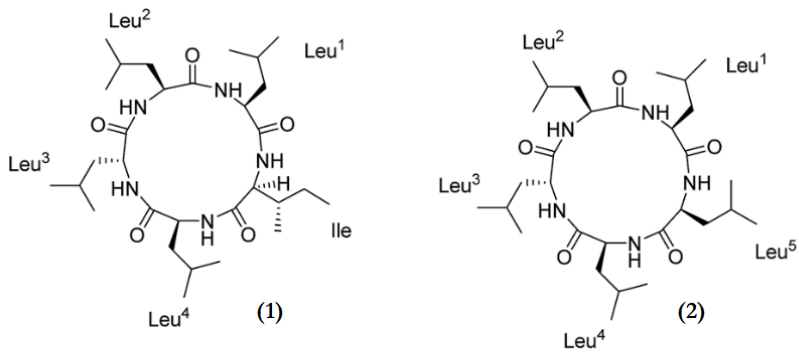
Tiga siklopeptida berhasil dideteksi dari *B. mamane* pada kultur dengan MEA. Yang pertama, dengan m/z 566,424 [M+H]⁺;

$C_{30}H_{55}N_5O_5$ diidentifikasi sebagai siklo-(L-Leu-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Ile) atau siklo-(L-Leu-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Leu). Yang kedua, dengan m/z 552,4100 $[M+H]^+$; $C_{29}H_{53}O_5N_5$, diidentifikasi sebagai siklo-(L-Leu-L-Leu-D-Leu-L-Leu-L-Val), dan yang ketiga, dengan m/z 538,40 $[M+H]^+$; $C_{28}H_{51}N_5O_5$ (Gambar 7.5).

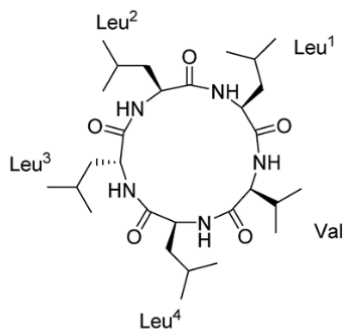


Gambar 7.5. Struktur Senyawa Botryosulfuranol A-C dan Turunan Mellein dari Jamur *C. mamane*

Senyawa dengan m/z 566,424 dan m/z 552,41 sebelumnya telah diisolasi dari jamur endofit *Fusarium decemcellulare* LG₅₃ (Li *et al.*, 2016). Siklopeptida diketahui diproduksi oleh beberapa jenis jamur dan berperan dalam komunikasi antarspesies (Huang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2015) (gambar 7.6).



m/z 566.424 $[M+H]^+$ $C_{30}H_{55}N_5O_5$



m/z 552.4100 $[M+H]^+$; $C_{29}H_{53}O_5N_5$

Gambar 7.6. Siklopeptida yang Berhasil Dideteksi dari *C. mamane* dan *F. decemcellulare*

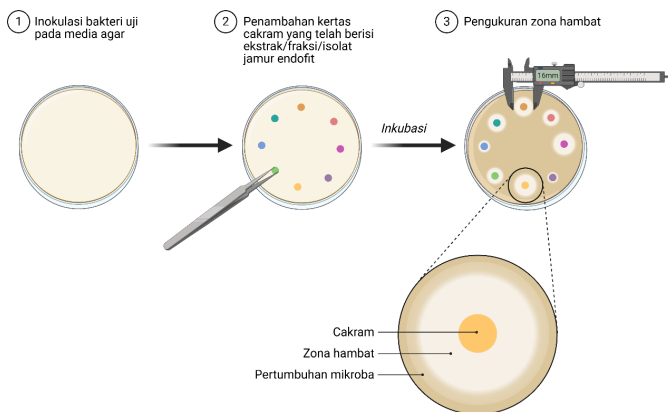
8

MODEL PENELITIAN PADA KULTUR ENDOFIT PADA MEDIA CAIR

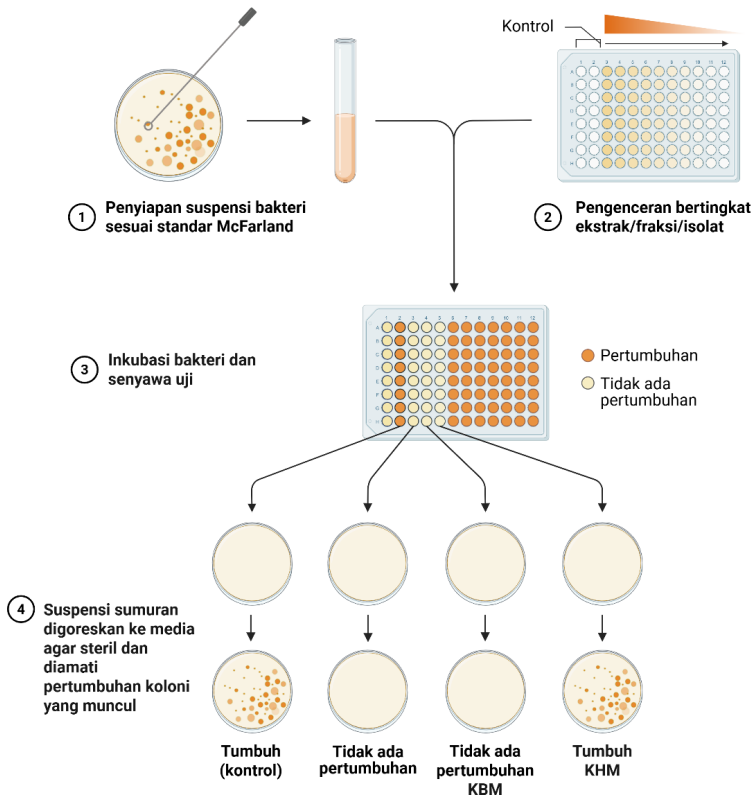
Jamur dapat dikultur pada media cair atau media padat tergantung dari tujuan penelitian. Beberapa desain penelitian yang ingin mengetahui pengaruh kondisi kultur atau jenis media pada pertumbuhan jamur dan produksi metabolitnya dapat membandingkan antara media padat dan media cair. Berikut dijelaskan metode menggunakan media cair (*broth*).

A. Uji Aktivitas Antimikroba dengan Pendekatan Konvensional

Metode konvensional yang digunakan untuk menguji suatu senyawa antibakteri adalah metode difusi/dilusi dengan mengukur zona hambat (gambar 8.1) atau menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) (gambar 8.2) dengan metode dilusi. Senyawa yang diujikan biasanya berupa ekstrak atau fraksi/isolat.



Gambar 8.1. Skema Uji Antibakteri dengan Pengukuran Zona Hambat
Gambar dibuat dengan BioRender



Gambar 8.2. Uji Antibakteri dengan Teknik Mikrodilusi untuk Menentukan KHM dan KBM
Gambar dibuat dengan BioRender

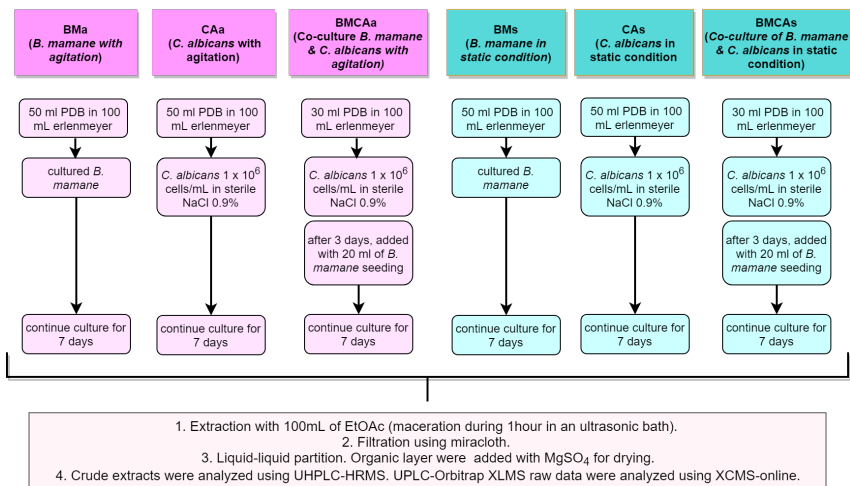
B. Uji Aktivitas Antimikroba dengan Pendekatan Metabolomik

Metode ini memungkinkan menguji aktivitas antimikroba suatu jamur endofit secara langsung dengan mengkultur bersamaan jamur endofit dengan mikroba uji dalam satu media. Setelah itu akan dibandingkan komposisi metabolit dari jamur endofit, mikroba uji, dan campuran (ko-kultur) antara jamur endofit dan media uji. Metode ini memberikan keuntungan diperolehnya senyawa putativ mikroba yang diproduksi/tidak diproduksi selama proses interaksi dengan jamur endofit berlangsung. Dengan analisis sistem biologi menggunakan aplikasi metabolomik, kita juga bisa memprediksi

mekanisme penghambatan jamur endofit terhadap pertumbuhan mikroba uji.

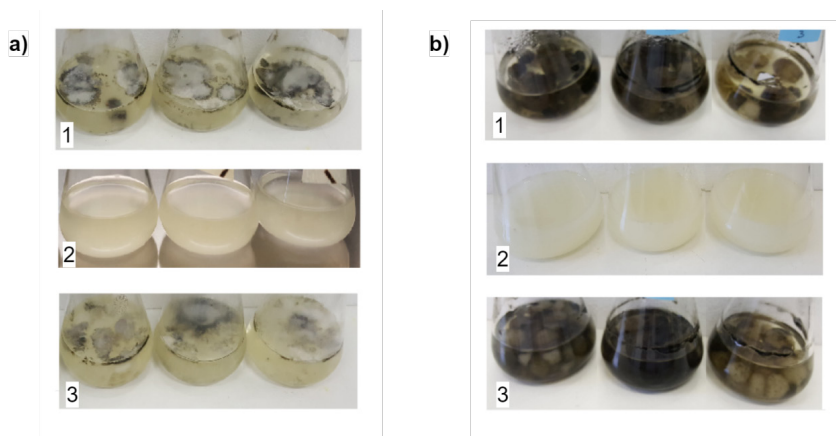
Berikut adalah contoh penelusuran mekanisme antimikroba jamur endofit *B. mamane* terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Desain penelitian ditampilkan pada gambar 8.3.

Dalam pembahasan ini, enam set kultur: (1) kultur tunggal *B. mamane* dengan agitasi (BMa); (2) kultur tunggal *C. albicans* dengan agitasi (CAa); (3) ko-kultur *B. mamane* dan *C. albicans* di mana *C. albicans* ditumbuhkan terlebih dahulu dalam PDB, dan 3 hari kemudian ditambahkan dengan *B. mamane* dengan agitasi (BMCAa); (4) kultur tunggal *B. mamane* dalam kondisi statis (BMs); (5) kultur mono *C. albicans* dalam kondisi statis (CAs); dan (6) ko-kultur *B. mamane* dan *C. albicans* di mana *C. albicans* ditumbuhkan terlebih dahulu dalam PDB, dan 3 hari kemudian ditambahkan dengan *B. mamane* dalam kondisi statis (BMCA). Kondisi agitasi dijaga pada 150 rpm. Semua kultur ditumbuhkan pada suhu 27°C selama 7 hari dalam Erlenmeyer 100 ml yang berisi 50 ml PDB. Seluruh cairan kultur diekstraksi menggunakan etil asetat dengan bantuan ultrasonikasi pada 20 kHz selama 1 jam. Miselia dipisahkan dari supernatan kultur menggunakan Miracloth®, dan ekstraksi cair-cair dilakukan untuk memperoleh ekstrak organik. Ekstrak ditambahkan dengan MgSO₄, didisaring menggunakan kertas saring, dan kemudian dikonsentrasikan di bawah tekanan rendah dengan rotavapor. Satu set kultur PDB diproses seperti halnya kelompok perlakuan sebagai media kontrol. Desain kultur untuk ko-kultur *B. mamane* dan *C. albicans* dapat dilihat pada gambar 8.3.



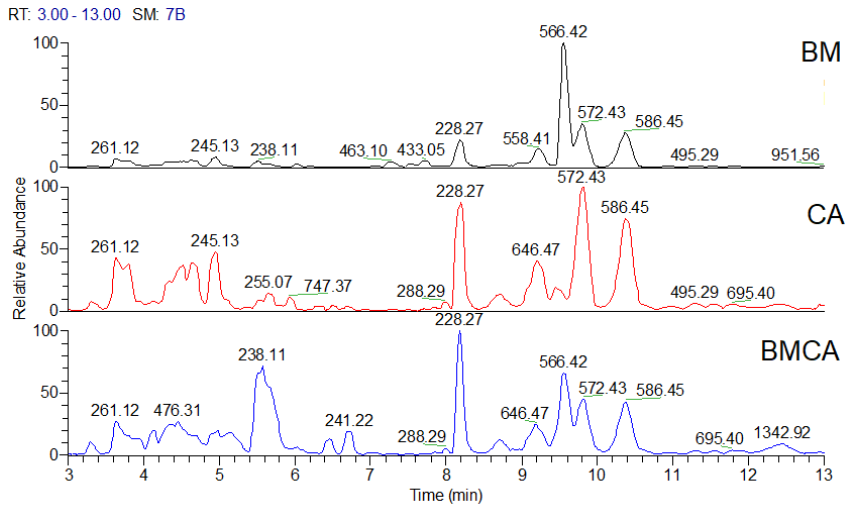
Gambar 8.3. Desain Penelitian untuk Menelusuri Mekanisme Penghambatan *C. mamane* Terhadap Pertumbuhan *C. albicans*
 Sumber: Triastuti, 2018

Morfologi kultur jamur ditampilkan pada gambar 8.4.



Gambar 8.4. Morfologi Kultur *B. mamane* dan *C. albicans*
 (a) kondisi statis, (b) pada agitasi/shaking. 1. *B. mamane*; 2. *C. albicans*; 3. Ko-kultur *B. mamane* dan *C. albicans* setelah 7 hari inkubasi.

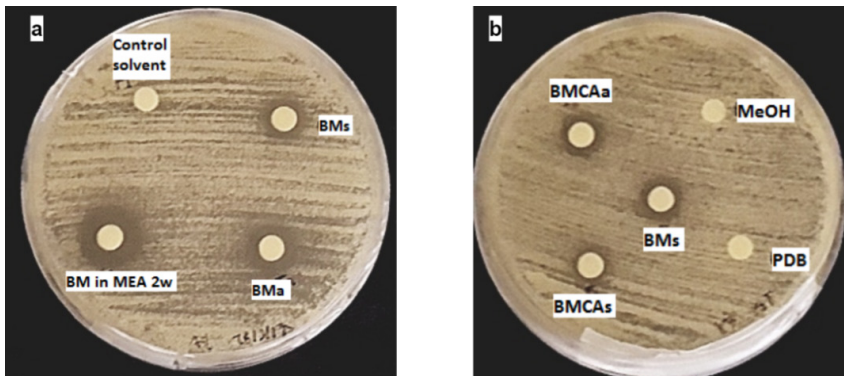
Hasil ekstrak masing-masing kultur kemudian dianalisis dengan UHPLC-HRMS. Profil kromatogram MS ekstrak *B. mamane*, *C. albicans*, dan ko-kultur *B. mamane*-*C. albicans* pada kondisi statis ditampilkan pada gambar 8.5.



Gambar 8.5. Kromatogram-MS Ko-Kultur *B. mamane* dan *C. albicans* pada Kondisi Statis

BM: *B. mamane*, CA: *C. albicans*, dan BMCA: ko-kultur *B. mamane*-*C. albicans*

Selanjutnya ekstrak etil asetat dari semua kultur diuji pada *C. albicans* (gambar 8.6). Zona penghambatan jamur diukur setelah 24 jam inkubasi pada 37°C.



Gambar 8.6. Hasil Uji Antijamur Ekstrak *B. mamane* pada *C. albicans*

(a) kultur pada kondisi statik *B. mamane* (BMs) dan kondisi agitasi (BMa) dibandingkan dengan kultur *B. mamane* pada MEA. (b) Aktivitas antijamur Ko-kultur pada kondisi agitasi (BMCAa) dan kondisi statik (BMCAa) terhadap *C. albicans* dengan zona penghambatan BMs 9.13 ± 0.35 mm; BMa 11.0 ± 0.87 mm^{*}; BMCAa 6.53 ± 0.1 ^{**}; BMCAa 7.9 ± 0.445 ^{**}, BM in MEA 13.8 ± 0.26 (diameter disk 6 mm). * berbeda signifikan dengan kondisi statis; ** berbeda signifikan dengan kultur tunggal.

Dengan pendekatan metabolomik, senyawa yang diproduksi oleh *C. albicans* maupun senyawa yang hilang selama kultur dengan *B. mamane* dapat dideteksi. Pada tabel 8.1 terlihat dengan ko-kultur *B. mamane*, beberapa senyawa esensial bagi *C. albicans* tidak diproduksi yang mengakibatkan kematian sel.

Tabel 8.1. Metabolit *C. albicans* yang Terdeteksi Selama Ko-Kultur dengan *B. mamane*

m/z; RT	Senyawa yang Terdeteksi	Ekspresi pada Kondisi Statis		Ekspresi pada Kondisi Agitasi	
		CA	BMCA	CA	BMCA
474.1902/4.37	Folinic acid	+	+	--	--
635.2379/5.09	$C_{24}H_{42}O_{19}$	+	+	+	--
821.4412/5.21	$C_{40}H_{68}O_{17}$	+	--	+	--
254.1173/6.02	L-Threoneopterin	+	+	+	--

<i>m/z</i> ; RT	Senyawa yang Terdeteksi	Ekspresi pada Kondisi Statis		Ekspresi pada Kondisi Agitasi	
		CA	BMCA	CA	BMCA
650.3183/5.85	C ₃₅ H ₄₇ N ₅ O ₇	+	+	+	--
351.1705/6.92	8-iso-15-keto-PGE2	+	+	+	--
538.1848/4.98	6-O-(2-amino-2-deoxy-alpha-D-glucosyl)-1D-Myo-inositol 1-(6-mercaptohexyl) phosphate	+	+	+	--
223.2056/7.98	Farnesol	+	--	+	--
137.1321/8.3	7-Methyl-3-methylene-1,6-octadiene	+	--	+	--
275.2215/5.91	MG(12:0/0:0/0:0)	+	+	+	--
249.1484/7.48	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	--	--	+	--
410.3048/11.73	C ₂₀ sphinganine 1-phosphate	--	--	+	--
255.1954/8.85	Palmitoleic acid	--	+	+	--
203.1794/6.45	Gamma-Undecalactone	+	+	+	--
259.2267/6.72	Tetradecanedioic acid	+	+	+	--

+ terdeteksi pada kultur

-- tidak terdeteksi pada kultur

Selama ko-kultur dengan *B. mamane*, beberapa metabolit termasuk C₂₀ sphinganine 1-fosfat, myo-inositol, farnesol, gamma-undekalaktan, dan MG(12:0/0:0/0:0) tidak diproduksi oleh *C. albicans*. Metabolit-metabolit ini penting untuk kelangsungan hidup dan virulensi *C. albicans*. Sphinganine adalah prekursor sederhana sphingolipid dalam sintesis sphingolipid kompleks (Cowart & Obeid,

2007). Hilangnya C₂₀ sphinganine 1-fosfat dapat memengaruhi jalur biosintesis sphingolipid yang mengakibatkan sensitivitas terhadap *B. mamane*. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa peningkatan ekspresi (1-)fitosfingosin-1-P, salah satu jenis sphingolipid, dapat meningkatkan keluaran obat miconazole untuk mengurangi sensitivitas pada *C. albicans* (Li *et al.*, 2018). Karena *C. albicans* kehilangan sphinganine selama ko-kultur dengan *B. mamane*, penurunan regulasi ini dapat meningkatkan sensitivitasnya terhadap aktivitas antijamur dari *B. mamane*.

Myo-Inositol (inositol) adalah nutrisi esensial yang digunakan untuk membentuk fosfatidilinositol (PI), yang berfungsi sebagai komponen struktural membran, serta sebagai prekursor untuk beberapa molekul lipid penting lainnya, termasuk sphingolipid, ceramide, dan glikosilfosfatidilinositol (GPI) (Michell, 2008). Pada *C. albicans*, myo-inositol sangat penting untuk pertumbuhan dan virulensi. *C. albicans* dapat memenuhi kebutuhan ini melalui pengimporan myo-inositol atau melalui biosintesis *de novo* (Reynolds, 2009). Penurunan atau hilangnya myo-inositol dalam ko-kultur dapat mengindikasikan mekanisme *B. mamane* mengganggu membran pada *C. albicans* dengan membatasi produksi myo-inositol.

Farnesol, sebagai molekul *quorum sensing* pada *C. albicans*, mengalami penurunan selama ko-kultur. Selain pengaruhnya terhadap transisi dari ragi ke hifa dan hifa ke ragi, farnesol memengaruhi gen-gen yang terlibat dalam resistensi obat, pemeliharaan dinding sel, respons fagositik, hidrofobisitas permukaan, dan transportasi zat besi (Polke *et al.*, 2015). Hilangnya farnesol dapat menyebabkan *C. albicans* kehilangan kemampuan untuk mempertahankan sifat hidrofilik permukaan sel dan merespons mekanisme stres sel akibat keberadaan *B. mamane* dalam media yang sama (Alem *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2011).

Selain itu, gamma-undekalaktan dan MG(12:0/0:0/0:0) juga hilang selama ko-kultur dengan *B. mamane*. Gamma-undekalaktan dan MG(12:0/0:0/0:0) terdapat dalam membran sel dan berperan

dalam metabolisme asam lemak serta metabolisme membran. Studi ini menunjukkan bahwa analisis metabolom dapat memberikan penjelasan tentang mekanisme antijamur *B. mamane* terhadap *C. albicans*.

9

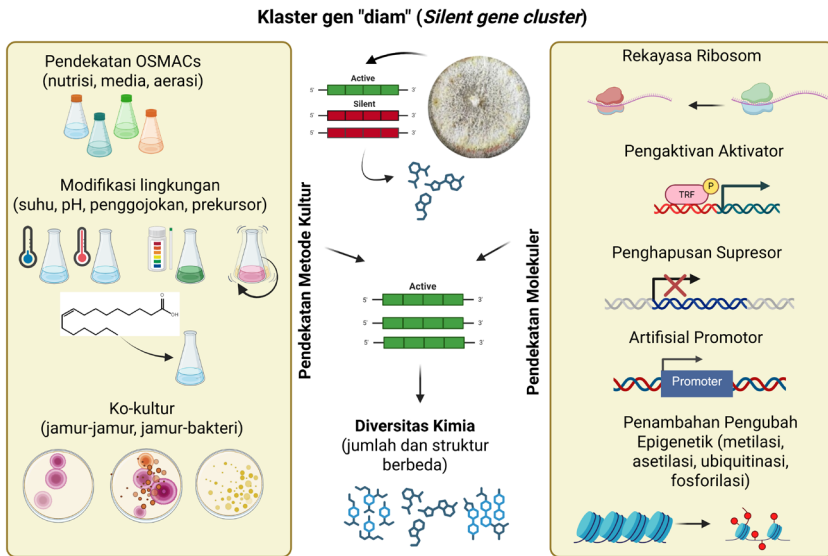
METODE UNTUK MENINGKATKAN JENIS DAN JUMLAH METABOLIT JAMUR ENDOFIT

A. Permasalahan dalam Kultur Jamur Endofit

Gen penyandi biosintetik metabolit sekunder, baik pada jamur maupun mikroorganisme lain seperti bakteri, biasanya terletak dalam klaster yang membentang lebih dari 10 kb. Sebagian besar klaster gen biosintetik mengandung satu atau lebih enzim kondensasi multidomain berberat molekul tinggi yang membangun kerangka struktur sebagian besar metabolit sekunder (Reen *et al.*, 2015). Banyak dari gen biosintetik ini tampaknya tidak ditranskripsi dalam kondisi laboratorium standar, namun tetap diam (*silent gene*). Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, termasuk hilangnya komunikasi mikroba antar endofit atau antara mikroorganisme dengan sel tanaman, karena biasanya jamur dibudidayakan di laboratorium dalam kondisi monokultur aseptik (Nützmann *et al.*, 2012) serta adanya perbedaan rangsangan seperti sumber karbon/nitrogen, pH, suhu, kondisi osmotik, atau cahaya (Prado *et al.*, 2012).

Akibat dari ketidakhadiran rangsangan ini, hanya sebagian kecil dari keragaman biosintetik jamur endofit yang diperoleh. Bahkan, jamur bisa kehilangan kemampuan mensintesis metabolit sekundernya apabila terlalu sering disimpan-kulturkan. Pengurangan produksi metabolit sekunder pada sub-kultur berulang dalam kondisi monokultur aseptik merupakan salah satu tantangan utama yang perlu diatasi untuk membangun, memulihkan, dan mempertahankan potensi biosintetik *in vitro* dari endofit (Triastuti, 2020). Beberapa metode telah dilakukan untuk mengaktifkan jalur biosintetik yang diam ini, yang juga disebut “jalur kriptik” (Gambar 9.1). Menariknya, pendekatan ini tidak hanya mengarah

pada penemuan metabolit sekunder baru, tetapi juga akumulasi senyawa yang sudah dikenal (Triastuti *et al.*, 2019).



Gambar 9.1. Metode untuk Mengaktivasi "Silent Gene" pada Jamur Endofit
Gambar dimodifikasi dari Reen *et al.*, 2015 dan dibuat dengan BioRender

B. Metode Mengaktifkan Jalur Kriptik pada Jamur Endofit

1. Optimasi Parameter Fermentasi dengan Pendekatan OSMACs
Optimasi parameter yang memengaruhi produksi metabolit pada isolat jamur terdiri dari penggunaan berbagai media kultur dan melakukan kultur dalam berbagai kondisi untuk memaksimalkan keragaman senyawa yang diproduksi. Bode *et al.*, (2002) mengenalkan istilah "One Strain Many Compounds" (OSMACs) untuk menggambarkan bagaimana satu isolat mikroba dapat diinduksi untuk menghasilkan banyak senyawa hanya dengan mengubah parameter kultur. Penting untuk menganalisis spektrum metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur di bawah kondisi pertumbuhan yang berbeda seperti komposisi medium pertumbuhan, aerasi, pH, dan

keberadaan inhibitor enzim tertentu. Kondisi yang berbeda ini dapat secara dramatis mengubah profil metabolit sekunder dan bahkan menginduksi sintesis beberapa metabolit baru (Triastuti *et al.*, 2019). Analisis untuk mengidentifikasi berubahnya metabolit tersebut direkomendasikan dilakukan dengan teknik metabolomik. Skrining dan evaluasi aktivitas antiparasit dan antikanker *in vitro* dari jamur endofit Panama mengungkapkan bahwa ekstrak dengan aktivitas lebih besar secara konsisten diperoleh ketika jamur ditumbuhkan pada medium miskin nutrisi dibandingkan dengan medium kaya nutrisi (Martínez-luis *et al.*, 2011). Namun, metode ini menunjukkan beberapa keterbatasan terkait variasi spesifik isolat dalam jumlah metabolit sekunder yang dihasilkan, serta kemampuan jamur untuk mengubah profil metabolit setelah dilakukan re-kultur.

2. Ko-Kultur

Ko-kultur merupakan teknik menumbuhkan dua atau lebih jamur-jamur atau jamur-bakteri yang berbeda dalam satu media. Ko-kultur jamur telah terbukti menjadi cara yang efisien untuk menginduksi interaksi sel-sel yang dapat mendorong aktivasi jalur kriptik, yang sering kali diam ketika isolat jamur ditumbuhkan pada kondisi laboratorium. Ko-kultur bakteri-bakteri, jamur-jamur, atau bakteri-jamur merupakan pendekatan yang didorong secara alami yang meniru kondisi fisiologis, melibatkan kompetisi dan komunikasi (Netzker *et al.*, 2015). Beberapa tinjauan terbaru tentang kultur mikroba campuran dan metabolit sekunder telah dipublikasikan. Misalnya, ko-kultur *Alternaria tenuissima* secara signifikan meningkatkan produksi beberapa poliketida, termasuk senyawa antijamur stemphyperylenol sebagai respons terhadap endofit *Nigrospora sphaerica* (Chagas *et al.*, 2013); kultur pasangan *Botrytis cinerea* dengan *Colletotrichum acutatum*, *F. proliferatum*, dan *Magnaporthe grisea* menginduksi keragaman kimia dan aktivitas antifungal terhadap *C. albicans* dan *A. fumigatus* (Serrano *et al.*, 2017); ko-kultur *Chaetomium* sp. dengan *Bacillus subtilis* pada

media beras menginduksi lima produk alami baru termasuk shikimeran A dan chorismeron (Kurt *et al.*, 2016); dan ko-kultur *C. mamane* dengan *F. solani* yang menginduksi tiga senyawa baru termasuk altenuene dan pestalotin (Triastuti *et al.*, 2021). Metode ko-kultur dibahas pada bab 10.

3. Pemberian Prekursor/Ekstrak Tanaman

Senyawa prekursor adalah senyawa yang berpartisipasi dalam reaksi kimia dalam pembentukan senyawa lain. Pemberian prekursor adalah strategi untuk memberikan prekursor biosintetik atau perantara lain dalam jalur biosintetik ke dalam medium kultur untuk meningkatkan senyawa target yang diinginkan. Lingkungan *in vitro* sangat berbeda dengan ekosistem di dalam jaringan tanaman, dan penambahan ekstrak tanaman dari spesies inang dapat membantu mengoptimalkan kondisi kultur karena kesamaan kimia yang lebih dekat dengan lingkungan inang. Hal ini dibuktikan di antaranya melalui penelitian penambahan ekstrak *Torreya taxifolia* meningkatkan produksi taksol dalam kultur *Periconia* sp., dan penambahan asam benzoat juga menyebabkan peningkatan produksi taksol hingga 8 kali lipat (Li *et al.*, 1998).

4. Penambahan Senyawa Pengubah Epigenetik

Kultur jamur dengan penambahan inhibitor DNA metiltransferase (DNMT) dan/atau *histone deacetylase inhibitor* (HDACi) merupakan metode yang menjanjikan untuk mengaktifkan jalur biosintetik metabolit sekunder (Triastuti *et al.*, 2019). Senyawa tersebut dapat mengakibatkan terjadinya metilasi, asetilasi, ubiquitinasi, atau fosforilasi DNA. Beberapa laporan telah menggambarkan efek pemberian inhibitor HDAC dan DNMT, seperti peningkatan keragaman kimia dan/atau induksi molekul baru yang sebelumnya tidak diketahui diproduksi oleh jamur tersebut (González-Menéndez *et al.*, 2016). Penambahan *Suberoylanilide hydroxamic acid* (SAHA), sebuah HDACi, dalam medium kultur jamur endofit yang diisolasi dari tanaman obat *Datura stramonium* L. menginduksi produksi

turunan asam fusarat (Chen *et al.*, 2013). Dalam studi lain, SAHA dilaporkan menginduksi produksi tiga siklodepsipeptida baru, desmethylisaridin E, desmethylisaridin C2, dan isaridin F dalam kultur jamur *k felina* (Chung *et al.*, 2013). Sementara itu, penambahan DNMTi 500mM 5-azacytidine ke dalam medium kultur jamur endofit tanaman, *Pestalotiopsis crassiuscula*, secara dramatis mengubah profil metabolitnya dan menghasilkan isolasi satu coumarin baru (Yang *et al.*, 2014). Metode ini dibahas pada bab 11.

5. Manipulasi Genetik

Manipulasi genetik umumnya dilakukan dengan rekayasa ribosom, mengaktifkan aktivator, menekan/menghapus supresor, dan pembuatan promotor buatan. Penghapusan (delesi) dan *overekspresi* gen yang mengkode protein regulasi serta integrasi gen yang mengkode protein aktif konstitutif dapat mengubah profil metabolom (Nützmann *et al.*, 2012). Penghapusan gen terarah (*knockout gen*) dapat digunakan untuk menghilangkan ekspresi dan penggantian promotor dapat digunakan untuk memodifikasi ekspresi gen yang diinginkan. Teknik ini dapat diterapkan pada jamur yang telah dipetakan gen utuhnya (*Whole Genome Sequencing*) dan telah dipelajari dengan baik, seperti *Aspergillus nidulans* (Brakhage dan Schroeckh, 2011). Teknik ini membutuhkan pemahaman bioteknologi molekuler yang kompleks dan fasilitas laboratorium yang memadai.

10

METODE KO-KULTUR JAMUR ENDOFIT

Beberapa permasalahan muncul dalam kultur jamur endofit di laboratorium. Monokultur jamur endofit secara perlahan akan kehilangan kemampuan memproduksi metabolit sekunder potensial diakibatkan tidak adanya sinyal yang memacu gen penyandi metabolit sekunder. Pada kondisi alami, jamur endofit hidup berdampingan dengan mikroorganisme lain membentuk suatu koloni dan ekosistem mikroba di dalam tanaman. Begitu kita mengisolasi jamur endofit dan mengkulturkannya di laboratorium dalam kultur tunggal maka jamur endofit akan kehilangan interaksi tersebut.

Beberapa penelitian mencoba mengaktifkan gen penyandi metabolit sekunder yang tidak aktif ini (*silent gene*) dengan mengkulturkan suatu jalur endofit dengan jamur lain (ko-kultur). Ko-kultur umumnya dilakukan pada media padat menggunakan *petri dish* atau *multi-well plate*. Jamur yang dipilih merupakan hasil *trial and error* dan optimasi. Induksi metabolit jamur untuk menghasilkan metabolit baru yang tidak diproduksi oleh kultur tunggal jamur atau untuk meningkatkan produksi metabolit dalam kultur jamur telah banyak dieksplorasi dalam berbagai penelitian, termasuk: ko-kultur *T. versicolor* dan *G. applanatum* yang menginduksi dua senyawa baru, yaitu N-(4-methoxyphenyl)formamide 2-O- β -D-xyloside dan N-(4-methoxyphenyl)formamide 2-O- β -D-xylobioside (Yao *et al.*, 2016); ko-kultur *Trichophyton rubrum* dan *Bionectria ochroleuca* yang menginduksi lima senyawa *de novo*, termasuk 4"-hydroxysulfoxy-2,2"-dimethylthielavin (Bertrand *et al.*, 2013); ko-kultur dua jamur endofit *Alternaria tenuissima* dan *Nigrospora sphaerica* yang secara signifikan meningkatkan produksi beberapa poliketida, termasuk antifungal stemphyteryleneol (Chagas *et al.*, 2013); metabolit pada

Stereum hirsutum yang mengalami peningkatan regulasi setelah ko-kultur dengan *Coprinus disseminates* (Peiris *et al.*, 2008); dan ko-kultur jamur *C. mamane* dan *F. solani* yang menginduksi diproduksinya senyawa baru yaitu Pestalotin (Triastuti *et al.*, 2019).

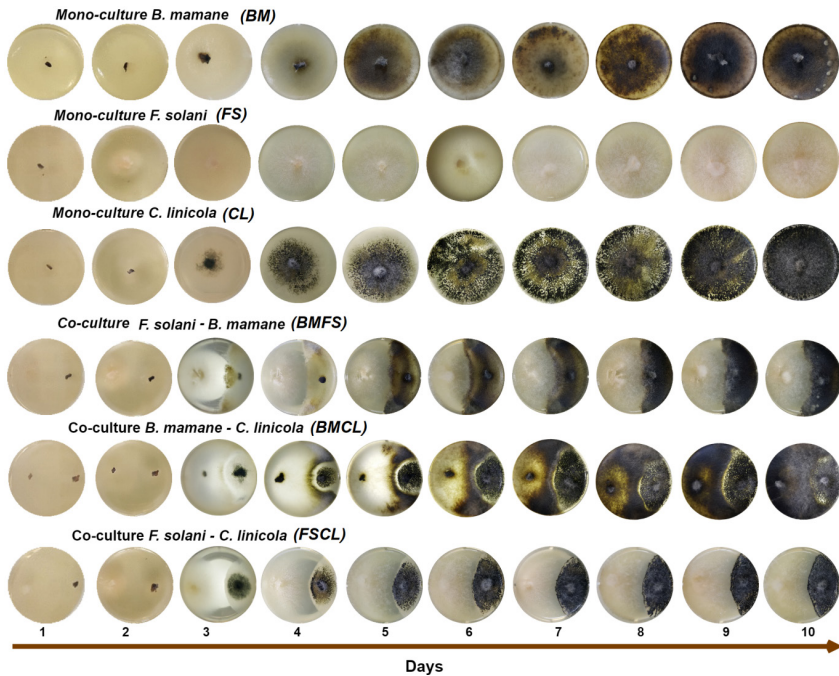
A. Desain Penelitian Ko-Kultur Jamur

Berikut disampaikan contoh model penelitian yang mengadopsi ko-kultur. Mono kultur *B. mamane* (BM), *F. solani* (FS), dan *C. linicola* (CL) ditumbuhkan pada 6 *well plates* yang berisi 2 ml media MEA alih-alih menggunakan petri berdiameter 9 cm. Dengan cara yang sama, ko-kultur (BMFS, BMCL, dan FSCL) juga dikulturkan secara berdampingan pada media MEA lalu dikulturkan pada 27°C dan setiap hari selama 10 hari, satu plate berisi 6 replikasi diambil, disimpan pada -80°C dan menunggu liofilisasi untuk selanjutnya diekstraksi. Media juga diperlakukan yang sama untuk mengontrol metabolit yang ada pada media tersebut.

Prosedur ekstraksi dilakukan dengan mengambil monokultur, ko-kultur jamur, atau sampel agar tanpa inokulasi lalu dikeringkan beku (*freeze-dried*) menggunakan Labconco Lyph-Lock 6, kemudian dipindahkan ke tabung reaksi. Campuran pelarut ekstraksi, diklorometana:metanol:air dengan perbandingan 64:36:8 (v/v), ditambahkan sebanyak 20 mL per 30 mg bahan kering. Ekstraksi dilakukan dengan sonikasi langsung di dalam tabung menggunakan sonikator pada suhu ruang selama 1 jam. Sampel disaring menggunakan kertas saring, dan ekstraknya dikeringkan menggunakan *rotary evaporator*, kemudian ditimbang.

B. Morfologi Ko-Kultur Jamur

Morfologi kultur tiga jamur endofit ditampilkan pada gambar 10.1.



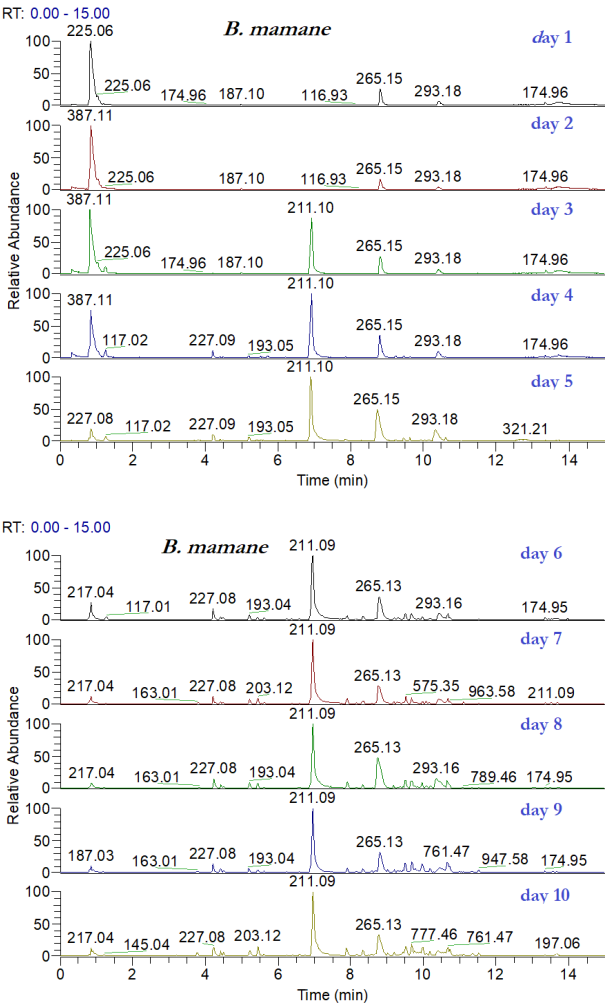
Gambar 10.1. Morfologi Mono dan Ko-Kultur *B. mamane*, *F. solani*, dan *C. linicola* Selama 10 Hari Inkubasi

Berbagai pola interaksi jamur ditemukan di antara jamur endofit. Secara umum, pertumbuhan awal terdeteksi pada hari pertama hingga hari ketiga pada kultur monokultur. Dibutuhkan waktu 4 hari bagi jamur untuk sepenuhnya menutupi permukaan agar, sementara pada kultur ko-kultur BMFS, BMCL, dan FSCL, membutuhkan waktu 6 hari. BM dan CL menghasilkan miselium gelap yang dimulai pada hari ketiga dan berlanjut hingga hari kesepuluh, sementara monokultur FS menghasilkan miselium putih. Pada kultur ko-kultur, interaksi jamur awal terdeteksi sejak hari ketiga. Secara morfologis, kapasitas jamur untuk bersaing satu sama lain tampaknya mengikuti urutan FS>BM>CL. FS tumbuh paling cepat dibandingkan dengan dua jamur lainnya, sementara CL memiliki pola pertumbuhan paling lambat di antara ketiganya. Selain itu, BM dan FS terlihat menghambat pertumbuhan CL. BM

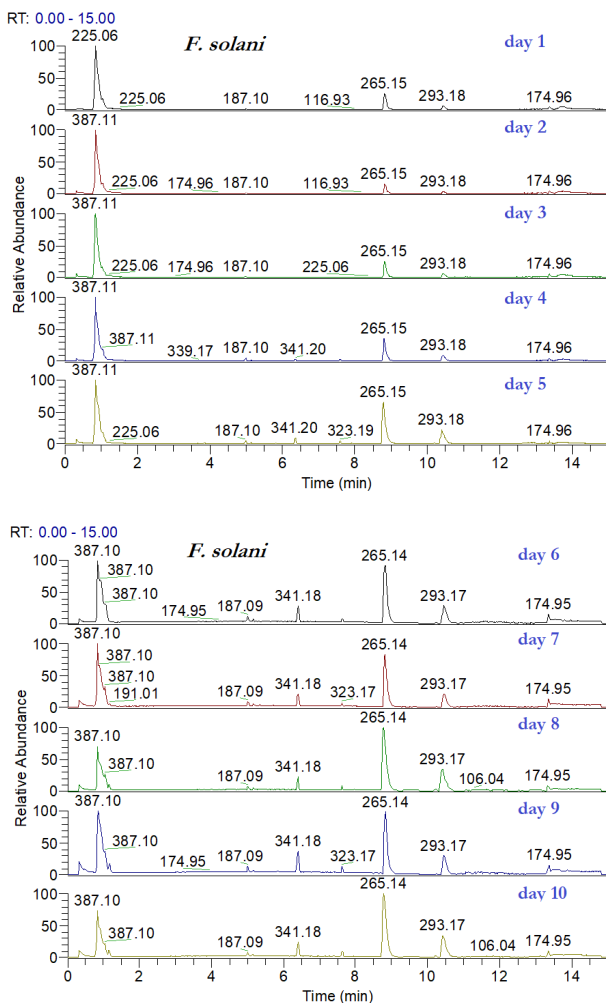
dan FS yang tumbuh berlebihan di atas CL dapat menunjukkan interaksi eksploitasi terhadap CL.

C. Analisis Senyawa dengan UHPLC-HRMS

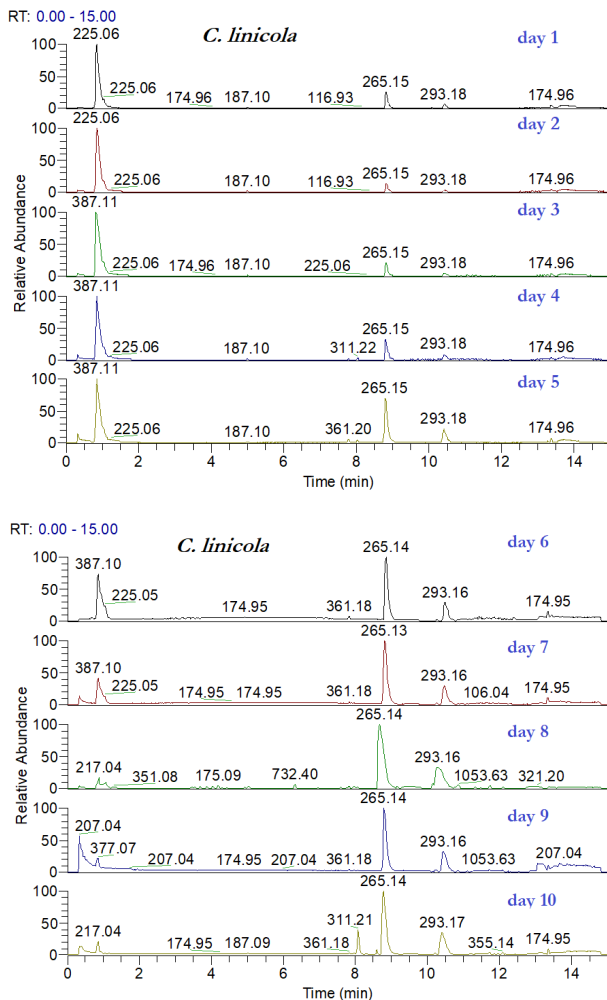
Ekstrak monokultur dan ko-kultur selanjutnya dianalisis dengan UHPLC-HRMS dan hasilnya ditampilkan pada gambar 10.2–10.4.



Gambar 10.2. Kromatogram UHPLC-HRMS pada Ionisasi Positif dari Ekstrak Etil Asetat *B. mamane* Hari ke 1–10

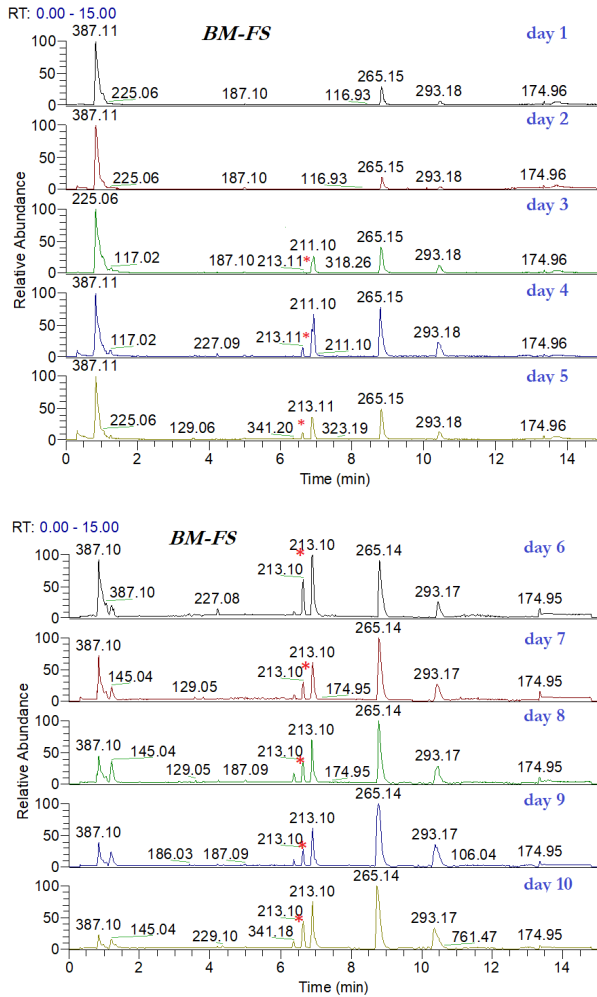


Gambar 10.3. Kromatogram UHPLC-HRMS pada Ionisasi Positif dari Ekstrak Etil Asetat *F. solani* Hari ke 1–10

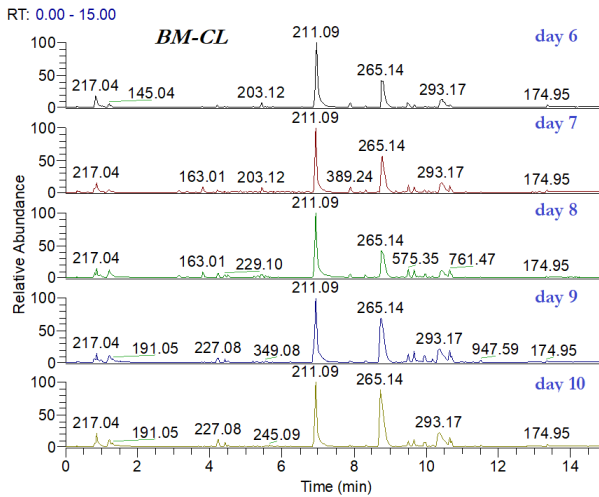
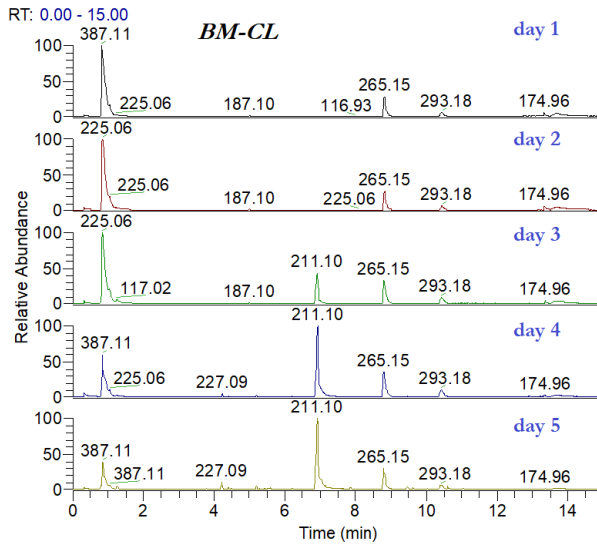


Gambar 10.4. Kromatogram UHPLC-HRMS pada Ionisasi Positif dari Ekstrak Etil Asetat *C. linicola* pada Hari ke 1–10

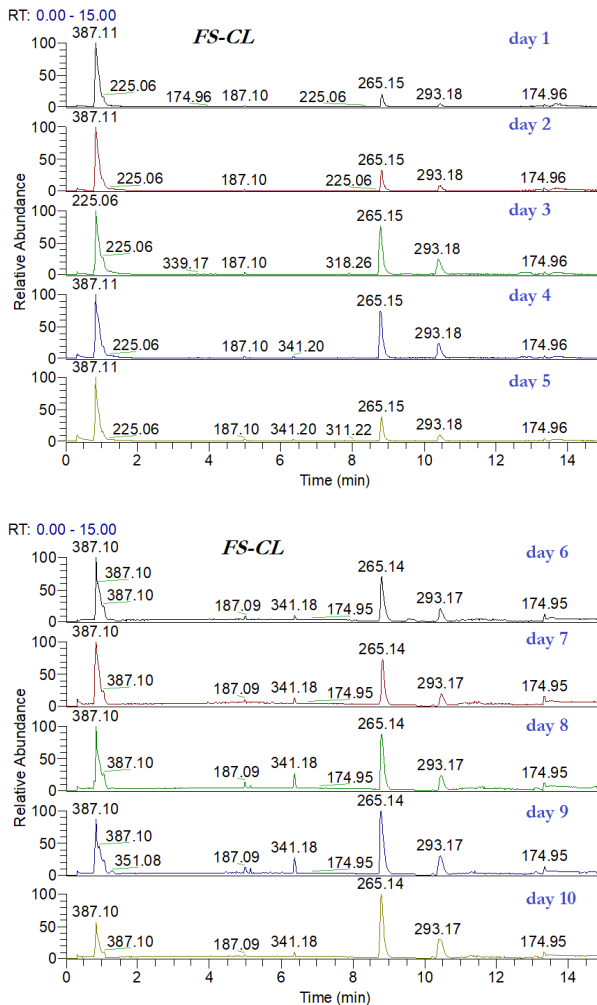
Kita bisa membandingkan kromatogram monokultur dengan kromatogram kokultur (gambar 10.5–10.7) untuk melihat apakah muncul metabolit baru selama proses ko-kultur.



Gambar 10.5. Kromatogram UHPLC-HRMS Ko-Kultur BMFS pada Hari ke 1-10



Gambar 10.6. Kromatogram UHPLC-HRMS Ko-Kultur BMCL pada Hari ke 1-10

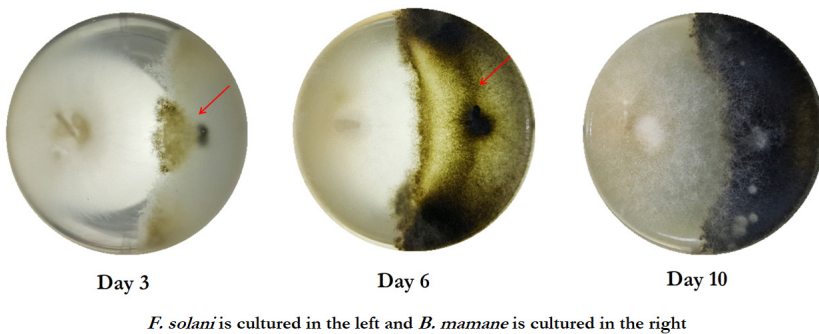


Gambar 10.7. Kromatogram UHPLC-HRMS Ko-Kultur FSCL pada Hari ke 1-10

Profil UHPLC-HRMS dari hari 1 hingga hari 10 (gambar 10.2-10.7) menunjukkan bahwa metabolit dalam jamur terdeteksi umumnya setelah hari ketiga inkubasi. Senyawa *de novo* (baru) terdeteksi pada ko-kultur BMFS tetapi tidak ditemukan pada ko-kultur BMCL dan FSCL. Zona penghambatan yang menarik muncul dalam pengamatan morfologi pada ko-kultur BMCL yang tidak berkorelasi

dengan produksi metabolit *de novo* (lihat gambar 10.6). Seperti yang dilaporkan sebelumnya, induksi *de novo* tidak selalu terdeteksi pada ko-kultur (Bertrand *et al.*, 2014) dan hal ini menekankan pentingnya analisis dengan UHPLC-HRMS setelah analisis fitur morfologi. Karena hanya ko-kultur BMFS yang menunjukkan senyawa *de novo* yang menjanjikan yang tidak diproduksi pada korespondensi jamur monokultur, interaksi antara BM dan FS kemudian dianalisis lebih lanjut.

Lebih detail, morfologi jamur yang menggambarkan interaksi antara BM-FS ditampilkan pada gambar 10.8.



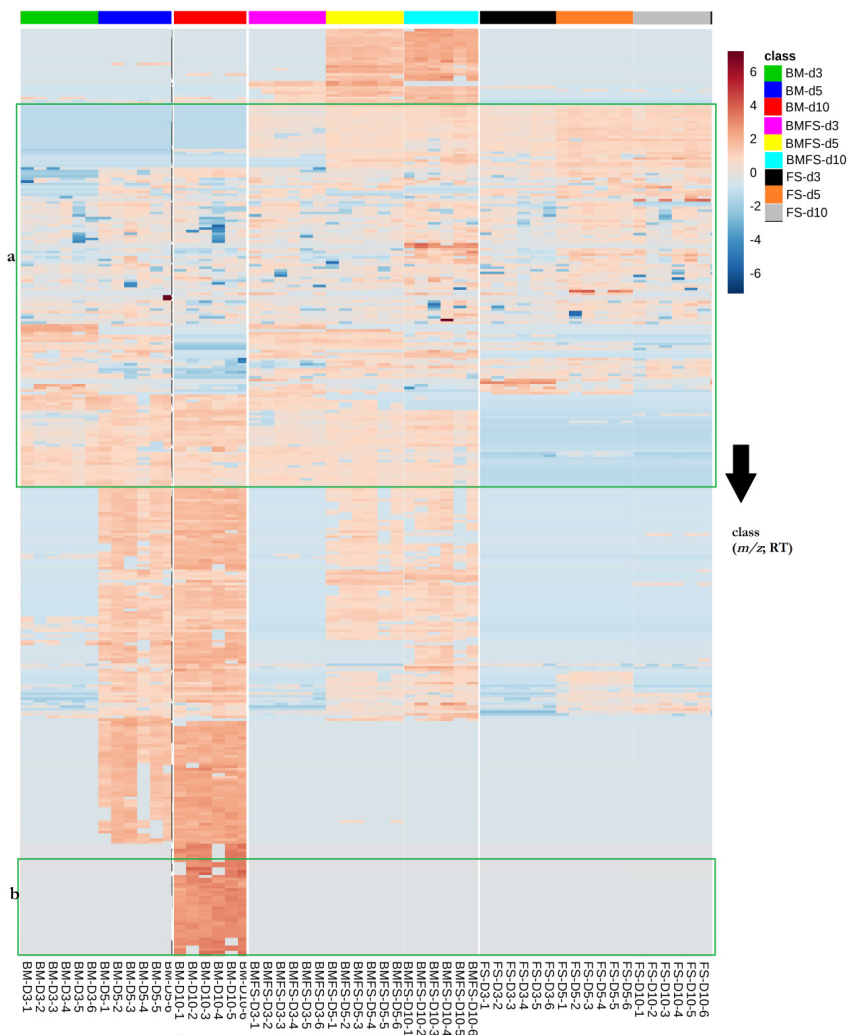
Gambar 10.8. Ko-Kultur BMFS pada Hari ke 3, 6, dan 10

Hifa pada koloni BM yang mengarah ke zona interaksi terdeteksi pada hari ketiga. Tampaknya jamur membutuhkan waktu 2 hari untuk beradaptasi dengan media baru setelah dipindahkan dari sumber inoculum asli. Setelah periode adaptasi, kedua jamur mencapai zona interaksi dan masing-masing miselium bertemu satu sama lain serta kontak kimia mulai terjadi. Hal ini didukung oleh gambar 10.5 yang menunjukkan munculnya metabolit baru pada hari ketiga. Kedua, pembentukan garis demarkasi/garis batas dan kolonisasi yang lebih banyak diamati pada hari keenam. Garis demarkasi adalah garis atau zona pembatas yang dapat berkembang di *interface* tempat dua jamur yang genetiknya berbeda bertemu. Sistem ketidakcocokan vegetatif ini dapat berfungsi sebelum, selama, atau setelah fusi

hifa untuk mencegah transmisi, dan melindungi individu dari invasi elemen genetik parasitik (Micali & Smith, 2003). Pembentukan zona demarkasi terlihat sebagai reaksi “menghindar” yang terjadi di, atau dekat, titik kontak antara dua miselium yang tidak kompatibel. Reaksi demarkasi dapat terlihat sebagai garis gelap, zona pembersihan, atau bentuk lain dari pembatasan. Pembentukan zona demarkasi pada BM mungkin menunjukkan mekanisme perlindungan BM dari FS yang kompetitif. Ketiga, FS tumbuh lebih besar dari BM setelah hari ke-10. Miselium dari FS melampaui batas BMFS, menunjukkan bahwa FS mungkin mengeksploitasi BM untuk bertahan hidup di satu media yang sama.

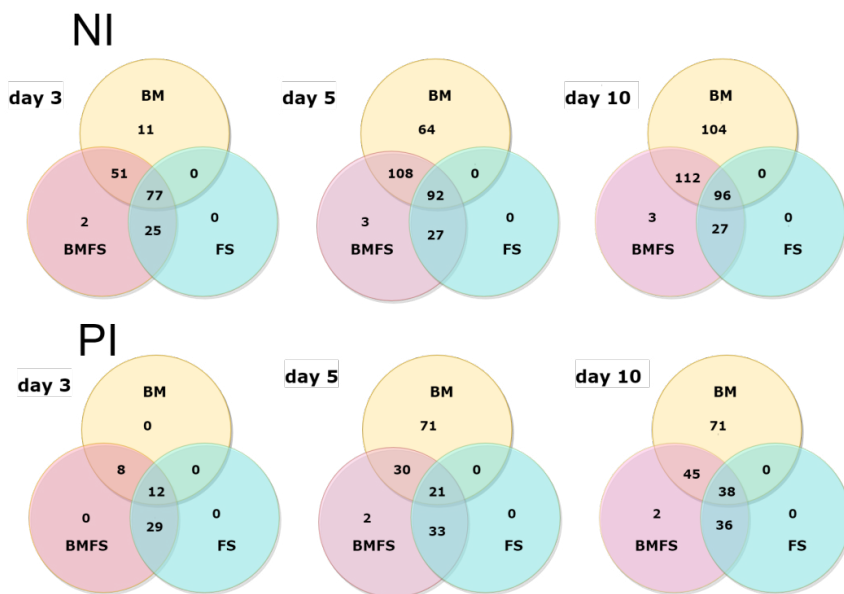
D. Analisis Diferensial dan Analisis Multivariat Metabolit dari Jamur

Metabolit yang diproduksi oleh BM, FS, dan BMFS yang dideteksi dengan UHPLC-HRMS menunjukkan biodiversitas kimia yang sangat tinggi (Gambar 10.9). Dengan analisis multivariat, metabolom pada ketiga jenis kultur tersebut dapat ditampilkan pada bagan *heat map*. Produksi metabolit meningkat seiring dengan waktu inkubasi jamur. Beberapa metabolit diproduksi dalam monokultur dan ko-kultur (a) atau diekspresikan hanya dalam monokultur (b).



Gambar 10.9. *Heat Map* Kluster BM, FS, dan BMFS pada Hari ke 3, 5, dan 10

Dengan analisis multivariat kita juga dapat menganalisis kelompok metabolit yang diproduksi oleh, BM, FS, dan BMFS pada hari ke 3, 5, dan 10 dengan diagram Venn (gambar 10.10). Dengan diagram Venn kita dapat melihat irisan kelompok metabolit lebih jelas. Struktur kimia metabolit yang dihasilkan oleh kedua jamur dapat dilihat pada gambar 10.11–10.13.

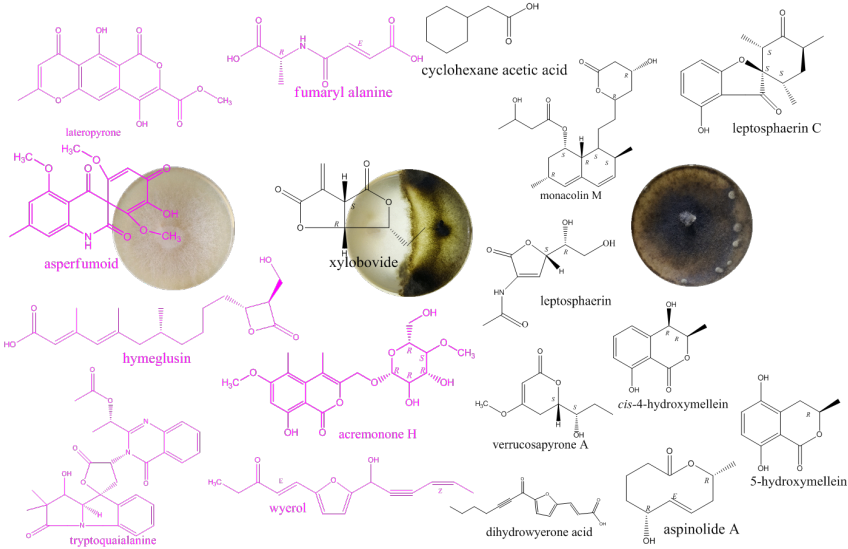


Gambar 10.10. Diagram Venn yang Menggambarkan Distribusi Metabolit pada BM, FS, dan BMFS

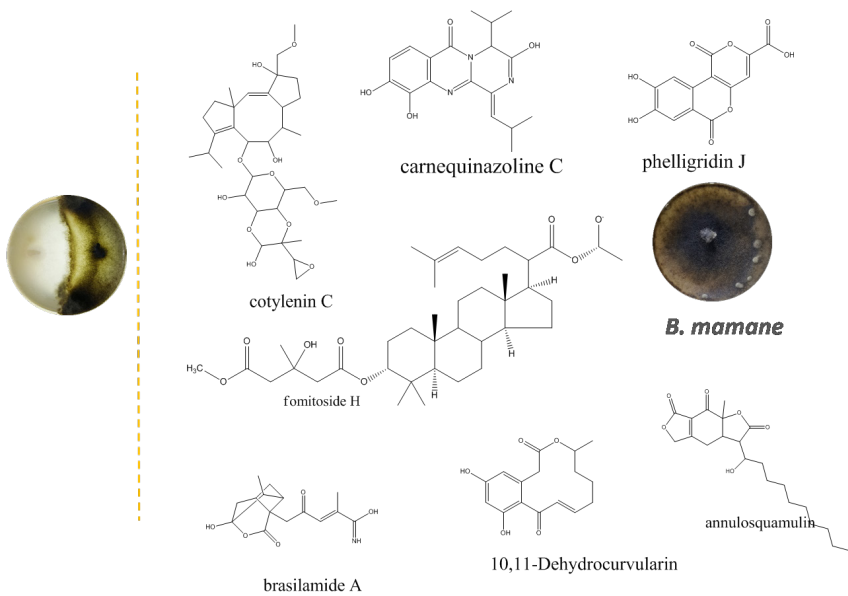
Senyawa baru yang ditemukan pada ko-kultur ditemukan dengan analisis metabolomik dan diidentifikasi sebagai senyawa pestalotin dengan m/z 213.10, altenuen, dan N-palmitoyl proline (Gambar 10.14).

Pestalotin dianggap memiliki aktivitas herbisida (Frisvad, *et al.*, 2004) dan bersifat sinergis dengan gibberellin yang kuat pada bibit padi (Kirihata, *et al.*, 1996). Giberelin adalah hormon tumbuhan yang mengatur pertumbuhan dan mempengaruhi perpanjangan batang serta perkecambahan biji. Dalam sebuah penelitian oleh Yasuo & Saburo 1971, terbukti bahwa efek promotif dari giberelin terhadap pelepasan gula pereduksi diperkuat dengan penambahan pestalotin secara bersamaan, yang mempromosikan pertumbuhan tunas *Oryza sativa* (padi). Selain itu, dalam sebuah penelitian oleh Luo, *et al.*, 2012, pestalotin terdeteksi dalam kaldu fermentasi jamur endofit *Pestalotiopsis karstenii* yang diisolasi dari batang *Camellia sasanqua*. Senyawa ini menunjukkan aktivitas yang kuat terhadap

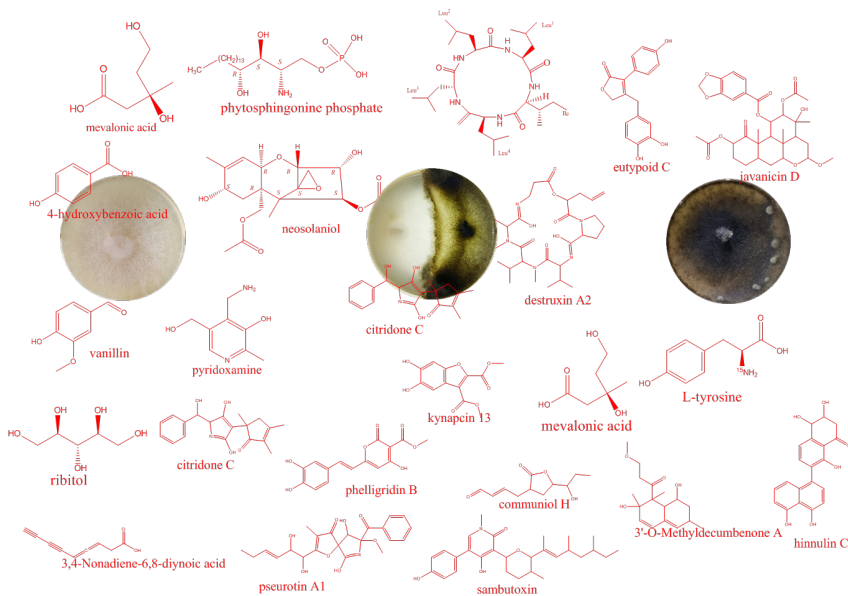
sel U-251 (sel glioma manusia), dengan nilai IC50 sebesar 2,5 µg/mL, tetapi tidak menunjukkan aktivitas terhadap sel HeLa, A549, HepG2, dan MCF-7.



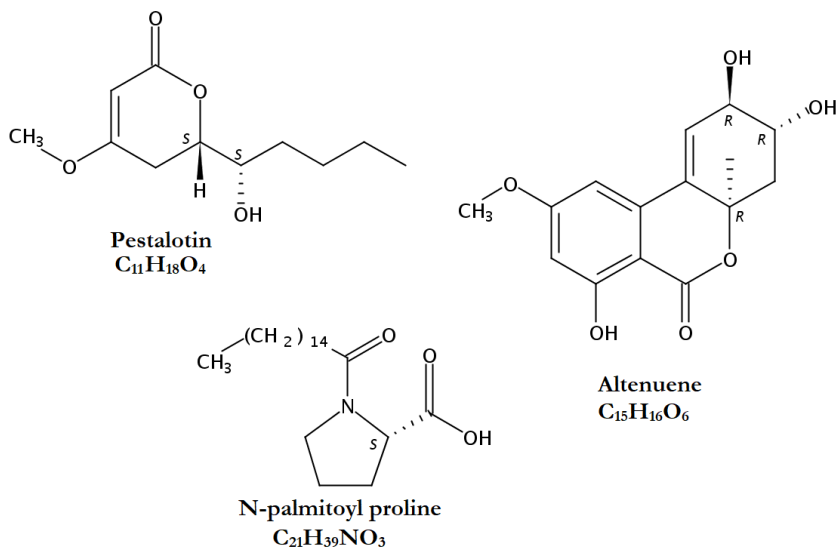
Gambar 10.11. Metabolit Sekunder yang Dihasilkan oleh *B. mamane* dan *F. solani*



Gambar 10.12. Metabolit yang Diproduksi oleh *B. mamane* dan Tidak Ditemukan pada Ko-Kultur



Gambar 10.13. Metabolit yang Diproduksi Baik oleh *B. mamane* dan *F. solani*



Gambar 10.14. Metabolit Sekunder yang Diproduksi oleh Ko-Kultur BMFS

Altenuene telah diketahui diproduksi oleh *Botryosphaeria dothidea* yang diisolasi dari *Melia azedarach* (Wu *et al.*, 2014) dan menunjukkan sitotoksitas terhadap sel kanker HCT116 dengan nilai konsentrasi penghambatan IC50 sebesar 3,13 μ M dibandingkan dengan kontrol positif etoposid (IC50 = 2,13 μ M). Selain itu, altenuene juga telah dilaporkan dari genera *Alternaria* (Bradburn *et al.*, 1994) (Tian *et al.*, 2017), *Nigrospora*, dan *Phialophora* (He *et al.*, 2012). Dalam penelitian ini, altenuene diproduksi pada hari ke-5 hingga hari ke-10, sementara senyawa dengan m/z 517,14 terdeteksi pada hari ke-3 hingga akhir inkubasi. Fenomena ini menunjukkan dinamika produksi metabolit jamur pada ko-kultur.

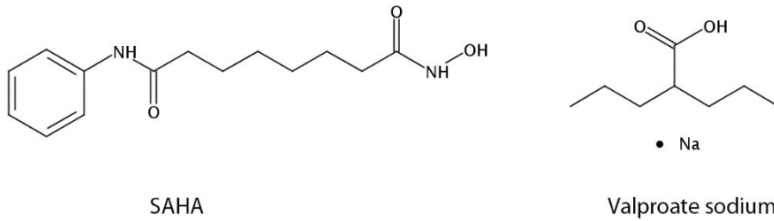
11

PENAMBAHAN SENYAWA PENGUBAH EPIGENETIK UNTUK MENINGKATKAN METABOLIT JAMUR ENDOFIT

Senyawa epigenetik adalah senyawa yang mengatur ekspresi gen tanpa mengubah urutan DNA itu sendiri, seperti modifikasi DNA dan histon, yang dapat mempengaruhi bagaimana gen dibaca dan diinterpretasikan oleh sel. Penambahan pengubah epigenetik menggunakan inhibitor kimia seperti *Histone deacetylase Inhibitors* (HDACis) terbukti efektif dalam menstimulasi transkripsi gugus gen tersembunyi, sehingga menghasilkan produksi berbagai metabolit sekunder *de novo* (baru) yang sebelumnya tidak diketahui diproduksi oleh strain tersebut atau peningkatan produksi metabolit sekunder jamur (Triastuti *et al.*, 2019).

Beberapa penelitian melaporkan efek pengubah epigenetik pada produksi metabolit jamur. Penambahan suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), ke dalam media kultur jamur endofit yang diisolasi dari tanaman obat *Datura stramonium* L. mampu menginduksi produksi turunan asam fusarat (Chen *et al.*, 2013). Dalam penelitian lain, SAHA dilaporkan menginduksi produksi tiga siklodepsipeptida baru, desmethylisaridin E, desmethylisaridin C2 dan isaridin F dalam kultur jamur berfilamen *Beauveria feline* (Chung *et al.*, 2013) dan dilaporkan menginduksi produksi beberapa metabolit sekunder, seperti kladokrom baru dan kalfostin B dalam *Cladosporium cladosporioides*, dan produksi nygerone A dalam kultur *A. niger* (Zabala *et al.*, 2012) serta empat asam tetramik baru, kladosin H-K dari jamur yang berasal dari sedimen *Cladosporium sphaerospermum* L3P3 (Zhang *et al.*, 2018). Sementara itu, penggunaan HDACi lain, asam valproat (gambar 11.1), mengakibatkan perubahan profil

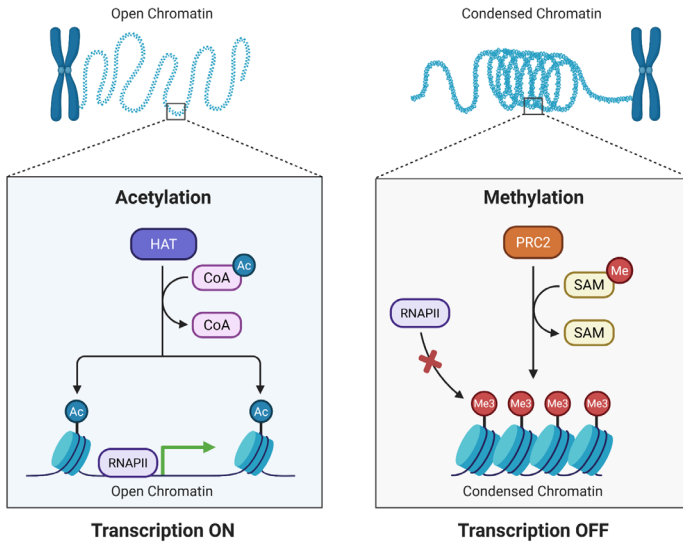
metabolik sekunder *Aspergillus fumigatus* dengan peningkatan produksi senyawa antibakteri dan antijamur fumiquinazoline C (Magotra *et al.*, 2017). Berdasarkan penulisan ini, adalah rasional untuk menerapkan molekul kecil kromatin seperti HDACi untuk mengakses jalur produk alami yang tidak aktif dan untuk meningkatkan produksi asli metabolit sekunder jamur.



Gambar 11.1. Struktur Kimia SAHA dan Asam Valproat

A. Mekanisme Kerja Pengubah Epigenetik

Senyawa pengubah epigenetik dapat mempengaruhi regulasi ekspresi gen melalui pengendapan berbagai tanda histon. Asetilasi histon, yang dilakukan oleh Histon Asetil Transferase (HAT) dengan menggunakan Asetil-CoA sebagai donor, menyebabkan pembukaan kromatin yang memungkinkan RNAPII untuk mengikat promotor guna menginduksi ekspresi gen target. Sebaliknya, metilasi histon, yang dilakukan oleh *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2) dengan menggunakan SAM sebagai donor, menyebabkan penutupan kromatin dan menekan transkripsi dengan mencegah pengikatan RNAPII (gambar 11.2).



Gambar 11.2. Proses Aktivasi Gen oleh Pengubah Epigenetik Melalui Mekanisme Asetilasi dan Mekanisme Penghambatannya dengan Metilasi
Gambar dibuat dengan BioRender

Penambahan gugus metil (metilasi) pada DNA dapat menyebabkan gen terkondensasi, dan menjadi “diam” atau tidak diekspresikan. Sementara itu, histon dapat dimodifikasi dengan penambahan atau pengangkatan gugus kimiawi (seperti asetil atau fosfat), yang dapat memengaruhi bagaimana DNA terikat pada histon dan karenanya, bagaimana gen diatur.

B. Model Penambahan Senyawa Epigenetik pada Kultur Jamur Endofit

Pengubah epigenetik biasanya ditambahkan ke media pertumbuhan pada konsentrasi 10 μM –300 μM untuk SAHA, dan 60 μM hingga 500 μM untuk asam valproat. Konsentrasi epigenetik harus tidak beracun bagi sel, namun mampu memungkinkan terjadinya gangguan dalam biosintesis metabolit. Untuk membandingkan efek SAHA dan VS, digunakan konsentrasi yang sama, 100 μM .

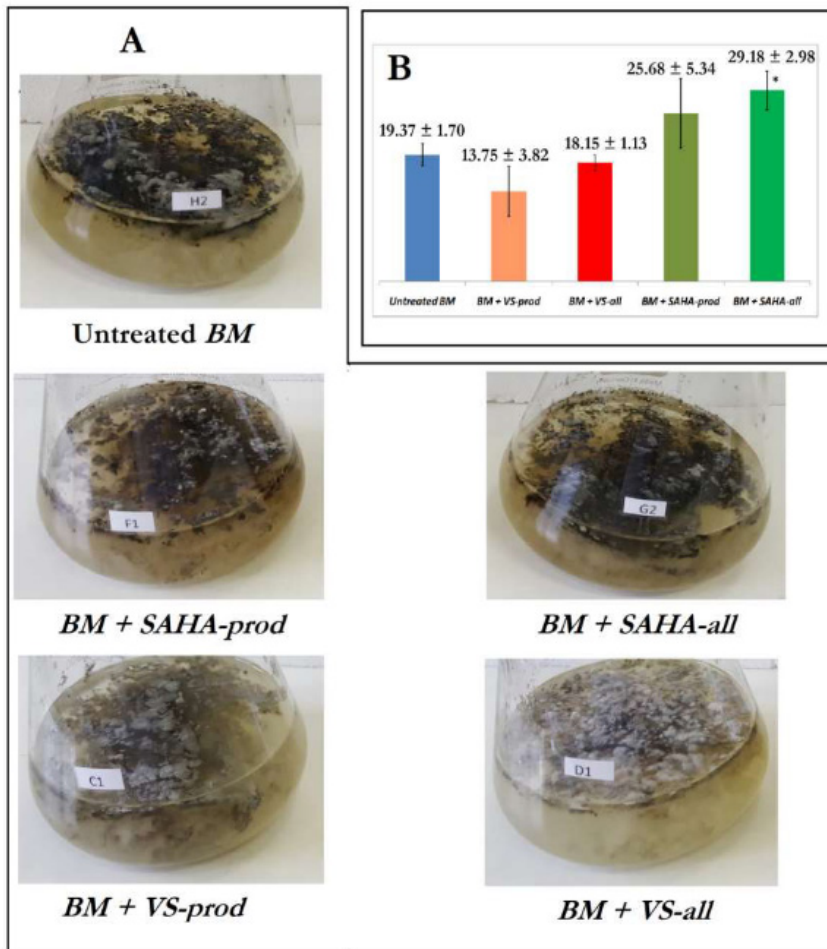
Efek dari dua HDAC yang berbeda, SAHA dan VS dalam dua tahap pertumbuhan jamur yang berbeda dipelajari untuk melihat manakah metode pemberian HDACi yang lebih efektif. Efisiensi pengubah epigenetik terhadap gangguan metabolit jamur tergantung pada waktu dan durasi penambahan epigenetik.

Dalam pembahasan ini, kami menggunakan kelompok kultur pertama dengan HDAC yang ditambahkan ke tahap produksi saja dan kelompok kultur kedua dengan HDAC yang ditambahkan ke tahap benih (inokulasi) dan produksi. Teknik metabolomik diterapkan untuk menilai efek SAHA dan VS pada profil metabolit sekunder *B. mamane*, menggunakan platform terintegrasi MS-DIAL dan MS-FINDER (Tsugawa *et al.*, 2015; Vaniya *et al.*, 2017) dan MetaboAnalyst (Pang *et al.*, 2022; Xia & Wishart, 2016). Teknik jaringan molekuler GNPS untuk mendukung proses dereplikasi untuk memberi anotasi senyawa yang mungkin berkorelasi dengan analog SAHA dan VS juga diaplikasikan pada penelitian ini (Wang *et al.*, 2016).

Tidak ada perbedaan morfologi koloni yang dapat dikaitkan dengan keberadaan SAHA atau VS jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pigmentasi relatif tidak berubah dibandingkan dengan kelompok kontrol. Tidak ada perbedaan yang jelas antara kelompok, meskipun warna kelompok yang diobati dengan VS tampak lebih terang daripada kelompok SAHA dan kelompok kontrol (gambar 11.3).

Berat ekstrak yang dihasilkan oleh jamur di setiap kelompok, menunjukkan bahwa kelompok SAHA-all dan SAHA-prod meningkatkan hasil ekstrak masing-masing sebesar 50% dan 32%, dengan SAHA-all menginduksi berat ekstrak secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil ini konsisten dengan laporan sebelumnya, misalnya SAHA meningkatkan hasil ekstrak kasar etil asetat dalam jamur yang berasal dari sedimen laut *Microascus* sp. dan juga menginduksi produksi siklodepsipeptida antiinflamasi dari siklodepsipeptida inflamasi dari *Beauveria*. Di sisi lain, VS tampaknya menurunkan hasil produksi metabolit, karena

kelompok VS-all dan VS-prod menunjukkan pengurangan berat ekstrak kasar masing-masing sebesar 6% dan 19%.



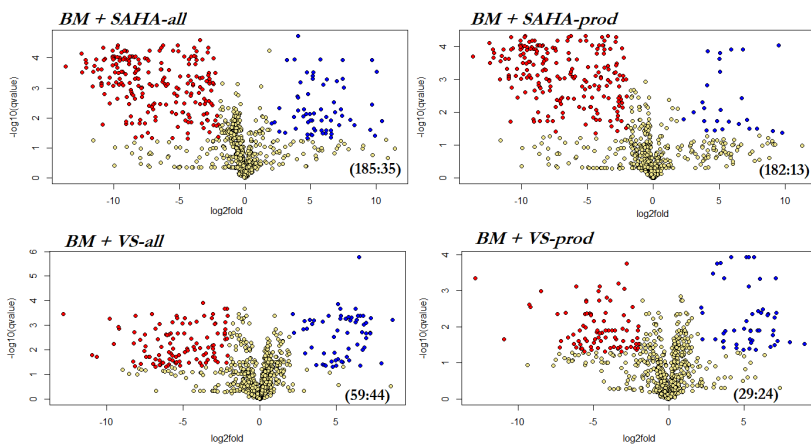
Gambar 11.3. Morfologi dan Rendemen Ekstrak dengan Penambahan Pengubah Epigenetik

(A) *B. mamane* ditumbuhkan dalam medium (PDB) tanpa pengubah epigenetik dan kultur BM dengan penambahan SAHA atau valproat natrium (VS) (100 μ M) melalui dua kondisi berbeda: hanya selama tahap produksi (SAHA-prod atau VS-prod) atau selama tahap inokulasi dan tahap produksi (SAHA-all atau VS-all). Setelah 28 hari inkubasi, morfologi diamati dan berat total ekstrak dibandingkan. (B) Berat ekstrak (mg) yang

diproduksi *B. mamane* yang diberi SAHA dan VS setelah 28 hari inkubasi. *berbeda secara signifikan dengan kelompok BM kontrol.

C. Analisis Diferensial untuk Mengetahui Efek Penambahan SAHA dan VS

Dengan menggabungkan semua kelompok (termasuk kontrol media dan kontrol epigenetik), 2.127 fitur unik dideteksi oleh UHPLC-HRMS. Analisis menggunakan MS-DIAL memungkinkan deteksi berbagai puncak *adduct* dan spesies yang ditemukan di media kontrol/dan epigenetika untuk dihilangkan dari matriks sehingga menghasilkan 913 spesies yang mewakili senyawa individual dalam kelompok *B. mamane* kontrol dan yang diberi perlakuan dengan pengubah epigenetika. Untuk memvisualisasikan perbedaan metabolit antara kelompok kontrol dan kelompok yang ditambah dengan pengubah epigenetika, kami melakukan analisis diferensial dan memvisualisasikan metabolit jamur dalam *volcano plot*. *Volcano plot* dibangun menggunakan R dengan memanfaatkan matriks data yang sebelumnya dianalisis dengan MetaboAnalyst (gambar 11.4).



Gambar 11.4. *Volcano Plot* Perubahan Metabolit pada *B. mamane* sebagai Respon Terhadap Penambahan Pengubah Epigenetik pada Kondisi Pertumbuhan yang Berbeda

Angka $n_1:n_2$ dalam tanda kurung berturut-turut adalah angka yang signifikan secara statistik ($p < 0,01$) dengan rasio perubahan kelipatan < -2 dan rasio perubahan lipatan > 2 . Senyawa yang diamati di bagian kanan setiap plot hadir pada tingkat yang lebih tinggi dalam kelompok epigenetik dan senyawa yang diamati di bagian kiri diagram hadir lebih tinggi dalam kelompok kontrol. Setiap titik mewakili ion m/z positif individu dengan titik biru mewakili fitur dengan nilai $q < 0,05$ & log perubahan 2 kali lipat < -2 dan titik merah mewakili fitur dengan nilai $q < 0,05$ & log perubahan 2 kali lipat > 2 .

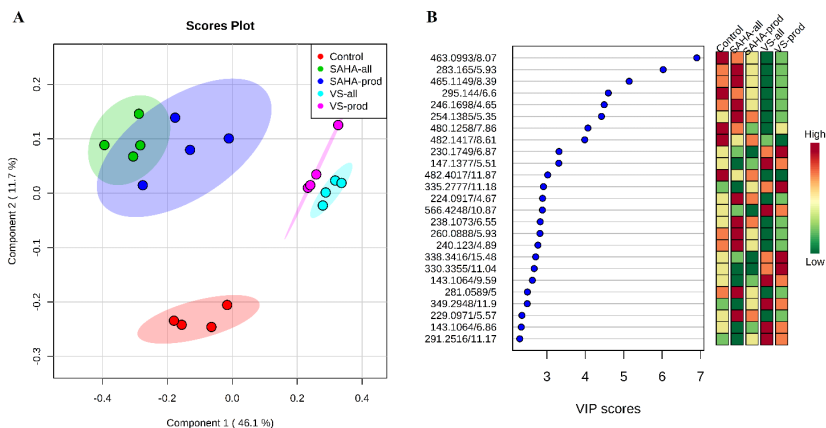
Dalam *volcano plot*, sumbu x menunjukkan perubahan kelipatan rata-rata (diplot pada skala log 2) dari kelimpahan relatif setiap metabolit sedangkan sumbu y menunjukkan nilai- q dari uji-t statistik. Untuk mengoreksi hasil positif palsu, nilai- q Benjamin-Hochberg diterapkan sebagai ganti nilai- p . Dalam *volcano plot*, metabolit yang memiliki perubahan kelipatan yang relatif rendah antara kedua kelompok muncul di dekat bagian tengah dan metabolit yang memiliki nilai- q yang signifikan ditemukan di kanan atas atau kiri atas. *Volcano plot* yang digambarkan pada gambar 11.4 menunjukkan bahwa penambahan epigenetika menyebabkan perubahan global dalam metabolom *B. mamane*. Plot menunjukkan bahwa banyak senyawa yang melimpah yang ada dalam ekstrak kontrol menurun dalam sampel kelompok yang diberi perlakuan SAHA, sementara banyak senyawa dengan kelimpahan rendah meningkat secara signifikan setelah penambahan SAHA (dengan perubahan kelipatan log2 hingga 11,41 atau perubahan kelipatan $> 2000x$). Sementara itu, kelompok yang diberi VS menunjukkan lebih sedikit perubahan produksi metabolit (dengan perubahan log 2 kali lipat hingga 8,65 atau perubahan lipat 400x). Penjelasan potensial untuk penurunan produksi senyawa yang melimpah pada kelompok yang diberi HDACis dibandingkan dengan kelompok kontrol mungkin karena ketika gugus gen metabolisme sekunder tambahan diaktifkan saat stres HDACis, blok penyusun yang diperlukan untuk produksi senyawa yang sebelumnya melimpah dikonsumsi oleh jalur lain yang baru diaktifkan (Albright *et al.*, 2015).

Lebih jauh, kita dapat melihat efektivitas pengubah epigenetika dalam gangguan metabolom dengan membandingkan angka yang signifikan secara statistik ($p < 0,01$) dengan rasio perubahan kelipatan < -2 dan rasio perubahan kelipatan > 2 (angka n1:n2 dalam tanda kurung di setiap plot). BM + SAHA-all memiliki angka 185:35 dan BM + SAHA-prod memiliki angka 182:13 sementara BM + VS-all memiliki angka 59:44 dan BM + VS-prod memiliki angka 29:24. Data ini menunjukkan bahwa SAHA menurunkan produksi metabolit lebih banyak daripada VS karena n1 jauh lebih tinggi daripada n2. Lebih jauh lagi, penambahan pengubah epigenetik dalam inokula dan fermentasi menginduksi produksi metabolit yang lebih tinggi dibandingkan dengan penambahan dalam tahapan fermentasi saja.

D. Analisis Multivariat untuk Mengetahui Perbedaan Antarkelompok dengan Penambahan SAHA dan VS

Untuk membedakan antarkelompok dan untuk menemukan variasi intrinsik dalam set data, *partial least square discriminant analysis* (PLS-DA) dapat diaplikasikan. Data spektrum mentah diproses terlebih dahulu dengan MS-DIAL untuk menghasilkan puncak yang dinormalisasi sebelum diekspor ke MetaboAnalyst. Diferensiasi kelompok dapat dilihat terpisah dengan baik menggunakan PLS-DA (Gambar 11.5 A). *Variable Importance in Projection* (VIP) menampilkan 25 fitur teratas yang diberi peringkat yang berkontribusi pada diskriminasi kelompok berdasarkan skor variabel dan analisis varians (ANOVA, $p < 0,05$) (gambar 11.5 B). Dua puluh lima senyawa teratas yang dideteksi oleh skor VIP kemudian diverifikasi menggunakan basis data jamur yang dijelaskan di atas.

Analisis PLS-DA menampilkan keberadaan 4 kelompok berbeda: kontrol, VS-all, VS-prod, dan SAHA (prod+all). Penambahan SAHA hanya pada tahap produksi atau pada kedua tahap tidak menyebabkan perubahan signifikan pada metabolom global kedua kelompok ini, sementara penambahan VS pada kondisi yang berbeda menyebabkan perbedaan profil kimia yang signifikan, karena dua kelompok VS-all dan VS-prod terpisah jelas.



Gambar 11.5. Analisis PLS-DA dan 25 Senyawa Dialalisis Berdasarkan *Variable Importance in Projection* (VIP)

(A) Analisis PLS-DA LC-MS ekstrak dari kelompok kontrol *B. mamane* dan yang ditambah dengan SAHA dan VS (zona berwarna menunjukkan tingkat kepercayaan 95%) (B) 25 senyawa teratas diberi peringkat berdasarkan skor VIP. Kotak berwarna di sebelah kanan menunjukkan konsentrasi relatif metabolit terkait di setiap kelompok.

E. Identifikasi Senyawa *De novo* dengan Penambahan SAHA dan VS

Seperti yang diharapkan, penambahan SAHA dan VS juga menginduksi senyawa *de novo* (tidak terdeteksi pada kontrol *B. mamane*). BM yang dikultur dengan SAHA menghasilkan produksi delapan metabolit termasuk satu senyawa yang juga diinduksi oleh VS (tabel 11.1).

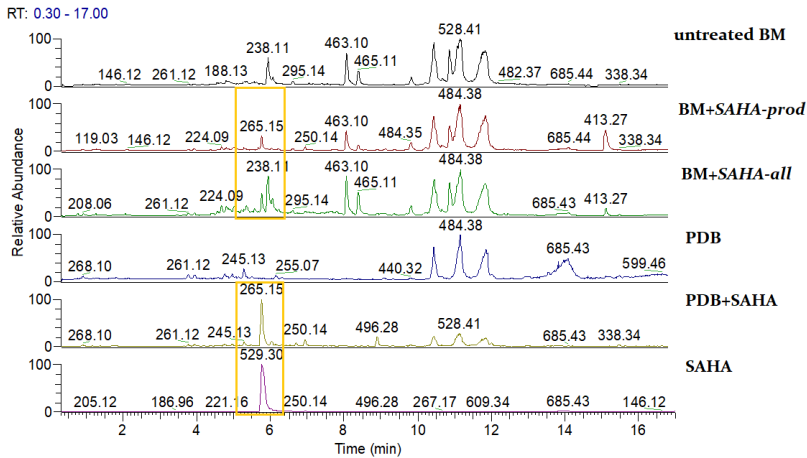
Tabel 11.1. Analisis Senyawa *De novo* yang Dihasilkan pada Penambahan SAHA dan VS

No	m/z; RT (min)	Formula	Senyawa putativ	Ekspresi pada			
				SAHA-all	SAHA-prod	VS-all	VS-prod
1	321.2173/7.19	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	12-HETE	+	+	+	+
2	371.1757/6.83	C ₁₄ H ₂₂ N ₆ O ₆	FR 900490	+	+	+	+

No	m/z; RT (min)	Formula	Senyawa putativ	Ekspresi pada			
				SAHA-all	SAHA-prod	VS-all	VS-prod
3	375.1689/10.24	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₃	Tidak diketahui	+	+	-	-
4	410.2437/7.81	C ₂₄ H ₃₁ N ₃ O ₃	Tidak diketahui	+	+	-	-
5	522.2961/8.18	C ₃₀ H ₃₉ N ₃ O ₅	Tidak diketahui	+	+	-	-
6	640.1241/10.56	C ₃₀ H ₂₉ N ₃ O ₇ S ₃	Tidak diketahui	-	+	-	-
7	670.3604/7.62	C ₃₇ H ₅₁ NO ₁₀	Tidak diketahui	+	+	-	-
8	723.1728/4.67	C ₄₁ H ₃₈ O ₄ S ₄	Tidak diketahui	+	+	-	-

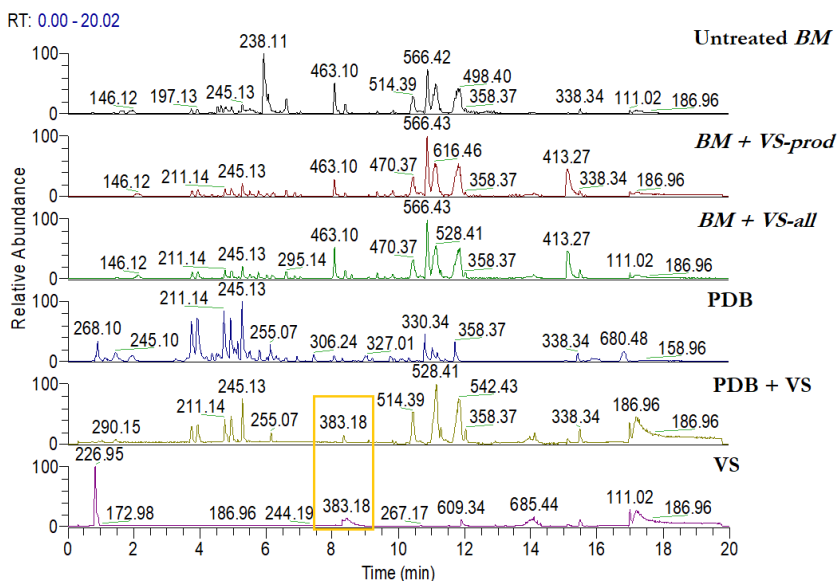
F. Permasalahan dalam Kultur dengan Pengubah Epigenetik

Studi terbaru memberikan bukti kuat bahwa penambahan SAHA dalam kultur jamur dapat menginduksi biotransformasi metabolit jamur yang tidak diharapkan (Adpressa *et al.*, 2017; Allard *et al.*, 2016). Penambahan SAHA pada kultur jamur *Chalara* sp. 6661 menghasilkan temuan produk alami "tidak alami" chalanilines A dan B. Lebih jauh, sebuah studi oleh Allard *et al.*, (2016) menggunakan SAHA dalam kultur *Penicillium* sp. menunjukkan reaktivitas senyawa pengubah epigenetik dalam media. Di sini, berdasarkan kromatogram UHPLC-HRMS, puncak yang terkait dengan SAHA dideteksi dalam kelompok yang diberikan dengan SAHA (gambar 11.6). Dari profil kromatogram-MS kita dapat melihat bahwa SAHA dapat ditemukan dalam dua bentuk terionisasi, [M+H]⁺ m/z 265,15 dan [2M+H]⁺ m/z 529,30 dalam DMSO.



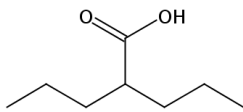
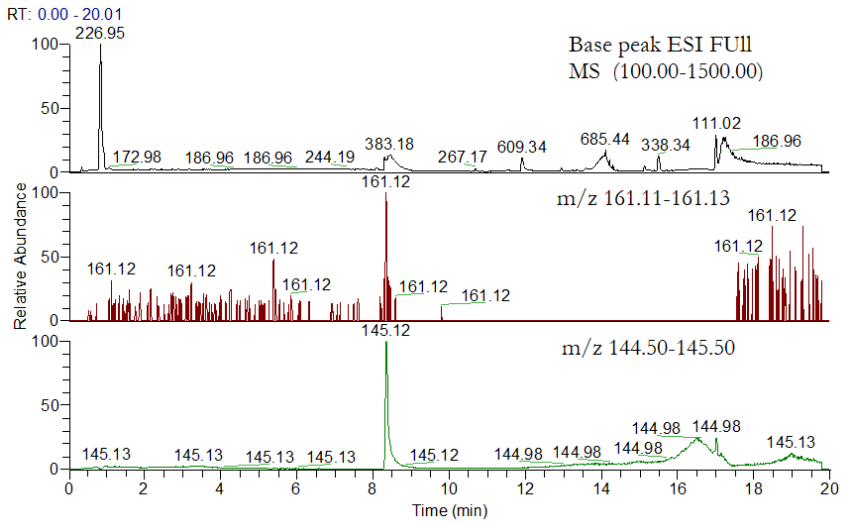
Gambar 11.6. Deteksi Metabolit Turunan SAHA pada Kultur *B. mamane* dengan UHPLC-HRMS

Lebih jauh, publikasi melaporkan bahwa dua senyawa yang berasal dari VS terdeteksi dalam kultur endofit jamur *Drechslera* sp. yang diobati dengan 500 μ M natrium valproat (Siless *et al.*, 2018). Senyawa-senyawa ini diidentifikasi sebagai asam 3-hidroksivalproat dan asam 4-hidroksivalproat dengan rumus molekul yang sama, $C_8H_{16}O_3$ dan m/z 161,1160 dan m/z 161,1171. Dalam penelitian kami (gambar 10.7), terdeteksi ion pada m/z 161,12, yang mungkin berkorelasi dengan asam 3-hidroksivalproat atau asam 4-hidroksivalproat dan m/z 145,12, yang mungkin berkorelasi dengan $[M+H]^+$ dari asam valproat ($C_8H_{16}O_2$, MW 144,2). Natrium valproat dalam larutan terionisasi untuk membentuk $[M+H]^+$ m/z 167,01 dan $[2M+H]^+$ m/z 383,18.



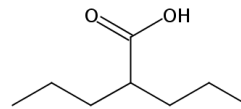
Gambar 11.7. Deteksi Metabolit Turunan Natrium Valproat pada Kultur *B. mamane* dengan UHPLC-HRMS

Untuk mengecualikan metabolit yang berkorelasi dengan transformasi SAHA dan VS, modul MS-DIAL dan GNPS diaplikasikan (gambar 11.8) untuk membuat jaringan molekuler berdasarkan kesamaan spektra, yang kemudian divisualisasikan menggunakan Cytoscape. Untuk meningkatkan kualitas jaringan molekuler dan meminimalkan kluster palsu antara senyawa yang tidak terkait secara struktural, pertama-tama spektrum MS dianalisis menggunakan MS-DIAL alih-alih langsung mengunggah format mzXML ke platform GNPS. Dengan menetapkan parameter analisis dalam MS-DIAL, metode dekonvolusi sejati untuk data MS/MS diperoleh dan diunggah ke GNPS sebagai file *mgf*. Semua nodul yang terdeteksi dalam jaringan selanjutnya ditetapkan dari dereplikasi *in-silico* menggunakan MS-FINDER.

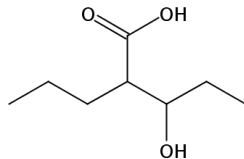


• Na

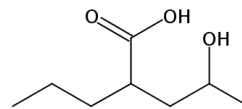
Valproate sodium
MW 166.19



Valproic acid
MW 144.2



3-Hydroxyvalproic acid
MW 160.21



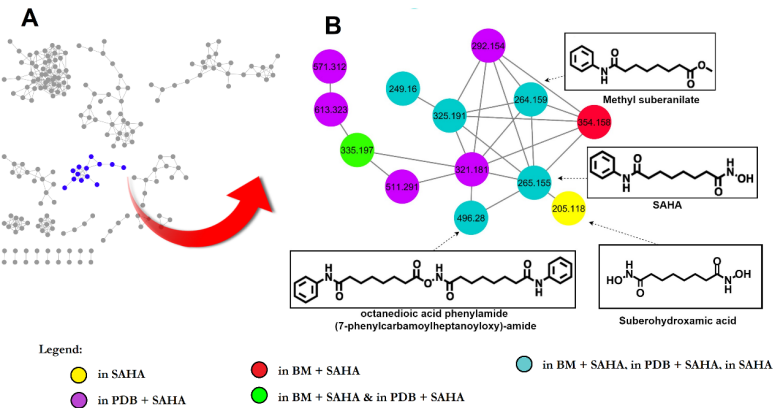
4-Hydroxy valproic acid
MW 160.21

Gambar 11.8. Kromatogram-MS Asam Valproat dan Turunannya Beserta Struktur Kimianya

Dalam jaringan molekuler dengan Cytoscape, satu spesies kimia tunggal direpresentasikan sebagai simpul (*node*), dan keterkaitan antara senyawa direpresentasikan oleh tepi (*edge*). Penting untuk dicatat bahwa jumlah simpul dalam jaringan tidak sama persis dengan jumlah metabolit, karena aduksi yang berbeda atau

status muatan yang berbeda dari spesies kimia yang sama dapat menghasilkan simpul yang berbeda (Crüsemann *et al.*, 2017). Selain itu, senyawa *self-loop*, yaitu senyawa yang tidak memiliki korelasi dengan senyawa lain, dapat dilihat dan kemudian disertakan atau dikecualikan dari jaringan ini.

Jaringan metabolit dari semua ekstrak dari kultur jamur dan media kontrol terdiri dari 263 simpul yang dibangun di Cytoscape 3.5.1 (gambar 11.9) serta jaringan yang terdiri dari 13 puncak yang berkorelasi dengan m/z SAHA dan senyawa yang secara spektral mirip dengannya. Selain itu, tidak ada kluster yang sesuai dengan analog VS yang diamati dalam jaringan metabolit ini. Metabolit yang berkorelasi dengan VS diidentifikasi secara manual menggunakan Xcalibur dan dihapus dari data matriks. Untuk mendapatkan wawasan apakah 13 senyawa tersebut berasal dari reaktivitas SAHA dengan media, atau berasal dari aktivitas jamur (misalnya degradasi SAHA oleh BM), senyawa ini dianalisis dalam matriks data MS-DIAL diikuti dengan deteksi manual menggunakan Xcalibur dari semua ekstrak SAHA, PDB, PDB+DMSO, dan PDB+SAHA.



Gambar 11.9. Jaringan Molekuler Berdasarkan Kesamaan Spektral Hasil Penyelarasan dari Kelompok Kontrol dan Kelompok yang Diberi SAHA dan VS

(A). Node biru didereplikasi sebagai kluster yang terkait dengan SAHA. (B). Kluster yang sesuai dengan analog SAHA yang diamati dalam jaringan molekuler *B. mamane* setelah penambahan SAHA

Penambahan HDACis dalam kultur *B. mamane* mengakibatkan perubahan signifikan dalam produksi metabolit sekunder, yang mendukung fakta bahwa perombakan epigenetik merupakan cara yang kuat untuk mengaktifkan jalur biosintesis kriptik. Di sisi lain, pengubah epigenetik sendiri dapat memiliki reaktivitas intrinsik dengan media dan metabolit jamur yang menyebabkan kondensasi tak terduga yang mungkin disalahartikan sebagai senyawa *de novo* yang diproduksi oleh jamur. Oleh karena itu, platform metabolomik integratif yang menggabungkan hubungan struktural antara metabolit dan fragmentasi *in silico* merupakan alat yang ampuh untuk melakukan proses dereplikasi campuran kompleks.

Perlu dicatat, penambahan pengubah epigenetik tidak hanya menginduksi produksi metabolit tetapi juga mengurangi dan dapat menonaktifkan produksi metabolit pada jamur. Analisis diferensial menggunakan HRMS dan visualisasi plot Volcano dapat menawarkan pendekatan metabolomik yang cepat dan kuat yang mampu memvisualisasikan metabolit global.

12 PENUTUP

Jamur endofit merupakan organisme yang sangat bermanfaat dalam kehidupan kita, baik dalam bidang kesehatan, lingkungan, pertanian, dan industri. Potensinya dalam mensintesis metabolit tergantung pada aktivasi gen modular yang dapat diaktif-diamkan dengan berbagai metode guna memaksimalkan produksi metabolit. Metabolit yang diproduksi oleh endofit sangat bervariasi dan melimpah dalam hal jenis senyawa maupun strukturnya.

Penguasaan teknologi terutama dalam metabolomik baik menggunakan LC-MS/MS atau HNMR berikut analisis diferensial dan multivariat sangat perlu dikuasai untuk menginterpretasikan hasil studi biologi jamur endofit. Teknik jaringan molekuler juga mendukung dalam pengembangan studi endofit. Metode fermentasi, ekstraksi, fraksinasi, dan isolasi endofit juga menarik untuk dikembangkan guna memaksimalkan produk/isolate metabolit aktif.

Seiring dengan adanya perubahan iklim dunia hal ini berpengaruh pada keberlangsungan endofit pada tanaman. Ketika tanaman inang mulai berkurang, rusak, dan punah, begitu pula dengan jamur endofit. Menjaga alam dan lingkungan merupakan salah satu cara mempertahankan biodiversitas endofit apalagi di negara kita yang merupakan negara tropis. Upaya eksplorasi untuk pemanfaatan endofit juga perlu ditingkatkan dengan melibatkan beberapa pihak/pusat studi. Transfer teknologi dan kolaborasi antar pusat riset atau akademisi diharapkan dapat mempercepat tujuan eksplorasi dan pemanfaatan endofit bagi manusia.

Akhir kata, semoga buku ini dapat memberikan tambahan sudut pandang baru dalam penemuan dan pengembangan obat.

Teori dasar tentang jamur endofit, fermentasi, modifikasi genetik, ekstraksi dan isolasi senyawa dari jamur endofit diharapkan mampu menambah pengetahuan dalam pengembangan jamur endofit sebagai sumber bahan baku obat alam.

DAFTAR PUSTAKA

- Adeleke, B. S., & Babalola, O. O. (2021). Pharmacological Potential of Fungal Endophytes Associated With Medicinal Plants: A Review. *Journal of Fungi*. <https://doi.org/10.3390/jof7020147>
- Adressa, D. A., Stalheim, K. J., Proteau, P. J., & Loesgen, S. (2017). Unexpected Biotransformation of the HDAC Inhibitor Vorinostat Yields Aniline-Containing Fungal Metabolites. *ACS Chemical Biology*, *12*(7), 1842–1847. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00268>
- Albright, J. C., Henke, M. T., Soukup, A. A., McClure, R. A., Thomson, R. J., Keller, N. P., & Kelleher, N. L. (2015). Large-Scale Metabolomics Reveals a Complex Response of *Aspergillus nidulans* to Epigenetic Perturbation. *ACS Chemical Biology*, *10*(6), 1535–1541. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00025>
- Alem, M. A. S., Oteef, M. D. Y., Flowers, T. H., & Douglas, L. J. (2006). Production of Tyrosol by *Candida Albicans* Biofilms and Its Role in Quorum Sensing and Biofilm Development. *Eukaryotic Cell*, *5*(10), 1770–1779. <https://doi.org/10.1128/EC.00219-06>
- Allard, P. M., Péresse, T., Bisson, J., Gindro, K., Marcourt, L., Pham, V. C., ... Wolfender, J. L. (2016). Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. *Analytical Chemistry*, *88*(6), 3317–3323. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04804>
- Arnold, A. E. (2007). Understanding the Diversity of Foliar Endophytic Fungi: Progress, Challenges, and Frontiers. *Fungal Biology Reviews*, *21*(2–3), 51–66. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.003>
- Arnold, A. E., & Lutzoni, F. (2007). Diversity and Host Range of Foliar Fungal Endophytes : *Ecology*, *88*(3), 541–549. <https://doi.org/10.1890/05-1459>
- Ayik, I., M, A., P, C. W., Wahyu, W., & Mahfuzun, B. (2019). Isolation and Characterization Endophytic Fungal Isolate from *Peronema canescens* Jack leaf and *Coptosapelta tomentosa* Val. K. Heyne Root... *Trop. Pharm. Chem.*, *4*(5), 215–225.

- Barakat, F., Vansteelandt, M., Triastuti, A., Jargeat, P., Jacquemin, D., Graton, J., ... Fabre, N. (2019). Thiodiketopiperazines with two Spirocyclic Centers Extracted from *Botryosphaeria mamane*, an Endophytic Fungus Isolated from *Bixa orellana* L. *Phytochemistry*, *158*, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.11.007>
- Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K., & Wolfender, J. L. (2014). Metabolite Induction via Microorganism Co-Culture: A Potential Way to Enhance Chemical Diversity for Drug Discovery. *Biotechnology Advances*, *32*(6), 1180–1204. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.03.001>
- Bertrand, S., Schumpp, O., Bohni, N., Monod, M., Gindro, K., & Wolfender, J.-L. (2013). De Novo Production of Metabolites by Fungal Co-Culture of *Trichopyton rubrum* and *Bionetrica ochroleuca*. *J. Nat. Prod.*, *76*(6), 1157–1165. <https://doi.org/10.1021/np400258f>
- Bradburn, N., Coker, R. D., Blunden, G., Turner, C. H., & Crabby, T. A. (1994). 5'-Epialtenuene and Neoaltenuene, Dibenzo-Alpha-Pyrones from *Alternaria Alternata* Cultured on Rice. *Phytochemistry*, *35*(3), 665–669.
- Chagas, F. O., Dias, L. G., & Pupo, M. T. (2013). A Mixed Culture of Endophytic Fungi Increases Production of Antifungal Polyketides. *J Chem Ecol*, *39*(10), 1335–1342. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0351-7>
- Chen, H.-J., Awakawa, T., Sun, J.-Y., Wakimoto, T., & Abe, I. (2013). Epigenetic Modifier-Induced Biosynthesis of Novel Fusaric Acid Derivatives in Endophytic Fungi from *Datura stramonium* L. *Natural Products and Bioprospecting*, *3*(1), 20–23. <https://doi.org/10.1007/s13659-013-0010-2>
- Chen J, Zhang L, Xing Y, Wang Y, Xing X, Zhang D-W, et al. Diversity and Taxonomy of Endophytic Xylariaceous Fungi from Medicinal Plants of *Dendrobium* (Orchidaceae). *PloS one* [Internet]. 2013;8(3):e58268. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3589337&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chung, Y. M., El-Shazly, M., Chuang, D. W., Hwang, T. L., Asai, T., Oshima, Y., ... Chang, F. R. (2013). Suberoylanilide Hydroxamic Acid, A Histone Deacetylase Inhibitor, Induces the Production of Anti-Inflammatory Cyclodepsipeptides from *Beauveria*

- felina. *Journal of Natural Products*, 76(7), 1260–1266. <https://doi.org/10.1021/np400143j>
- Corrêa, R. C. G., Rhoden, S. A., Mota, T. R., Azevedo, J. L., Pamphile, J. A., de Souza, C. G. M., ... Peralta, R. M. (2014). Endophytic Fungi: Expanding the Arsenal of Industrial Enzyme Producers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(10), 1467–1478. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1496-2>
- Cowart, L. A., & Obeid, L. M. (2007). Yeast sphingolipids: Recent Developments in Understanding Biosynthesis, Regulation, and Function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771(3), 421–431. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2006.08.005>
- Crüseemann, M., O'Neill, E. C., Larson, C. B., Melnik, A. V., Floros, D. J., Da Silva, R. R., ... Moore, B. S. (2017). Prioritizing Natural Product Diversity in a Collection of 146 Bacterial Strains Based on Growth and Extraction Protocols. *Journal of Natural Products*, 80(3), 588–597. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00722>
- Doan, T. N., Le, T. D., Ho, N. A., Ho, T. T., Do, T. T., Hoang, H., ... Chu, H. H. (2024). Isolation, Anticancer Potency, and Camptothecin—Producing Ability of Endophytic Fungi Isolated from *Ixora Chinensis*. *Science Progress*, 107(2), 1–22. <https://doi.org/10.1177/00368504241253675>
- dos Reis, J. B. A., Lorenzi, A. S., & do Vale, H. M. M. (2022). Methods Used for the Study of Endophytic Fungi: A Review on Methodologies and Challenges, and Associated Tips. *Archives of Microbiology*, 204(11), 1–30. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03283-0>
- Elfita, Oktiansyah, R., Mardiyanto, Widjajanti, H., & Setiawan, A. (2022). Antibacterial and Antioxidant Activity of Endophytic Fungi Isolated from *Peronema canescens* Leaves. *Biodiversitas*, 23(9), 4783–4792. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230946>
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O., & Samson, R. A. (2004). Mycotoxins, Drugs and Other Extrolites Produced by Species in *Penicillium* Subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 2004(49), 201–241.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes, Application to the Identification of Mycorrhiza and Rusts. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294x.1993.Tb00005.X>

- González-Menéndez V, Pérez-Bonilla M, Pérez-Victoria I, Martín J, Muñoz F, Reyes F, et al. Multicomponent Analysis of the Differential Induction of Secondary Metabolite Profiles in Fungal Endophytes. *Molecules* [Internet]. 2016;21(2):234. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/2/234>
- Han, T. L., Cannon, R. D., & Villas-Bôas, S. G. (2011). The Metabolic Basis of *Candida albicans* Morphogenesis and Quorum Sensing. *Fungal Genetics and Biology*, 48(8), 747–763. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.04.002>
- He, J. W., Chen, G. D., Gao, H., Yang, F., Li, X. X., Peng, T., ... Yao, X. S. (2012). Heptaketides with Antiviral Activity from Three Endolichenic Fungal Strains *Nigrospora* sp., *Alternaria* sp. and *Phialophora* sp. *Fitoterapia*, 83(6), 1087–1091. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.05.002>
- Ismail, A. A., Mahmoud, A. A., & El-Sayed, E.-S. A. (2010). Some Optimal Culture Conditions for Production of Cyclosporin A by *Fusarium roseum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 1112–1123.
- KeMenKes RI. (2019). *Laporan Nasional Riskesdas 2018. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*. Retrieved from http://labdata.litbang.kemkes.go.id/images/download/laporan/RKD/2018/Laporan_Nasional_RKD2018_FINAL.pdf
- Kirihata, M., Ohe, M., Ichimoto, I., & Kimura, Y. (1996). Synthesis and Biological Activity of II-p880 γ and Its Analogues. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60(4), 3–6. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.677>
- Kouipou, R. M., & Boyom, F. F. (2019). Endophytic Fungi from *Terminalia* Species: A Comprehensive Review. *J. Fungi*, 5(43), 1–20. <https://doi.org/10.3390/jof5020043>
- Krings, M., Taylor, T. N., Hass, H., Kerp, H., Dotzler, N., Hermsen, E. J., & Krings, M. (2007). Fungal Endophytes in a 400-Million-Yr-Old Land Plant: Infection Pathways, Spatial Distribution, and Host Responses. *New Phytologist*, (174), 648–657. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02008.x>
- Kumar, A., & Radhakrishnan, E. K. (2020). Microbial Endophytes: Functional Biology and Applications. *Microbial Endophytes: Functional Biology and Applications*. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-00366-4>

- Kurt T, Hartmann R, Lin W, Herve S, Attila M, Daletos G, et al. Inducing Secondary Metabolite Production by the Endophytic Fungus *Chaetomium* sp. Through Fungal-Bacterial Co-Culture and Epigenetic Modification. 2016;72:6340–7.
- Lee, J. C., Lobkovsky, E., Pliam, N. B., Strobel, G., & Clardy, J. (1995). Subglutinols A and B: Immunosuppressive Compounds from the Endophytic Fungus *Fusarium subglutinans*. *Journal of Organic Chemistry*, 60(1), 7076–7077. <https://doi.org/10.1021/jo00127a001>
- Li, L., Liao, Z., Yang, Y., Lv, L., Cao, Y., & Zhu, Z. (2018). Metabolomic Profiling for the Identification of Potential Biomarkers Involved in a Laboratory Azole Resistance in *Candida albicans*. *Plos One*, 13(2), e0192328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192328>
- Li JY, Sidhu RS, Ford EJ, Long DM, Hess WM, Strobel G a. The Induction of Taxol Production in the Endophytic Fungus-- *Periconia* sp from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1998;20:259–64.
- Lindahl, B. D., Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Carlsen, T., Kjølner, R., ... Kauterud, H. (2013). Fungal Community Analysis by High-Throughput Sequencing of Amplified Markers--A User's Guide. *The New Phytologist*, 199(1), 288–299. <https://doi.org/10.1111/nph.12243>
- Luo, D. Q., Zhang, L., Shi, B. Z., & Song, X. M. (2012). Two New Oxysporone Derivatives from the Fermentation Broth of the Endophytic Plant Fungus *Pestalotiopsis karstenii* Isolated from Stems of *Camellia sasanqua*. *Molecules*, 17(7), 8554–8560. <https://doi.org/10.3390/molecules17078554>
- Magotra, A., Kumar, M., Kushwaha, M., Awasthi, P., Raina, C., Gupta, A. P., ... Chaubey, A. (2017). Epigenetic Modifier Induced Enhancement of Fumiquinazoline C Production in *Aspergillus fumigatus* (GA-L7): An Endophytic Fungus from *Grewia asiatica* L. *AMB Express*, 7(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0343-z>
- Maheshwari, D. K. (2017). *Endophytes: Biology and Biotechnology* (Vol. 15). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-66541-2>
- Martínez-luis S, Cherigo L, Higginbotham S, Arnold E, Spadafora C, Ibañez A, et al. Screening and Evaluation of Antiparasitic and

- In Vitro Anticancer Activities of Panamanian Endophytic Fungi. *International Microbiology*. 2011;14:95–102.
- Micali, C. O., & Smith, M. L. (2003). On the Independence of Barrage Formation and Heterokaryon Incompatibility in *Neurospora Crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 38(2), 209–219. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00533-9](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00533-9)
- Michell, R. H. (2008). Inositol Derivatives: Evolution and Functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 151–161. <https://doi.org/10.1038/nrm2334>
- Netzker T, Fischer J, Weber J, Mattern DJ, König CC, Valiante V, et al. Microbial Communication Leading to the Activation of Silent Fungal Secondary Metabolite Gene Clusters. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2015;6(April):1–13. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00299/abstract>
- Nützmann HW, Schroeckh V, Brakhage AA. Regulatory Cross Talk and Microbial Induction of Fungal Secondary Metabolite Gene Clusters. In: *Methods in Enzymology*. 2012. p. 325–41.
- Paloque, L., Triastuti, A., & Bourdy, G. (2017). Natural Products as Antiparasitic Agents, 1–25.
- Pang, Z., Zhou, G., Ewald, J., Chang, L., Hacariz, O., Basu, N., & Xia, J. (2022). Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS Spectra Processing, Multi-Omics Integration and Covariate Adjustment of Global Metabolomics Data. *Nat Protoc*. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00710-w>
- Polke, M., Hube, B., & Jacobsen, I. D. (2015). *Candida* Survival Strategies. *Advances in Applied Microbiology*, 91, 139–235. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.12.002>
- Prado S, Li Y, Nay B. Diversity and Ecological Significance of Fungal Endophyte Natural Products. In: Atta-ur-Rahman, editor. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier; 2012. p. 249–96.
- Reen FJ, Romano S, Dobson ADW, O’Gara F. The Sound of Silence: Activating Silent Biosynthetic Gene Clusters in Marine Microorganisms. Vol. 13, *Marine Drugs*. 2015. p. 4754–83.
- Reynolds, T. B. (2009). Strategies for Acquiring the Phospholipid Metabolite Inositol in Pathogenic Bacteria, Fungi and Protozoa: Making It and Taking It. *Microbiology*, 155(5), 1386–1396. <https://doi.org/10.1099/mic.0.025718-0>

- Rodriguez, P., Gonzalez, D., & Rodríguez Giordano, S. (2016). Endophytic Microorganisms: A Source of Potentially Useful Biocatalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2017.02.013>
- Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, A. E., Redman, R. S., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal Endophytes: Diversity and Functional Roles. *New Phytologist*, *182*(2), 314–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>
- Serrano R, González-Menéndez V, Rodríguez L, Martín J, Tormo JR, Genilloud O. Co-Culturing of Fungal Strains Against Botrytis cinerea as a Model for the Induction of Chemical Diversity and Therapeutic Agents. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8(APR):1–15.
- Shalihin, M. I., Khatib, A., Yusnaidar, Y., Lasmana, I., & Latief, M. (2024). An In-Vogue Plant, *Peronema canescens* Jack: Traditional Uses and Scientific Evidence of its Bioactivities. *Discover Plants*, *1*(58). <https://doi.org/10.1007/s44372-024-00048-5>
- Sharma, S., Khan, I. A., Ali, I., Ali, F., Kumar, M., Kumar, A., ... Qazi, G. N. (2009). Evaluation of the Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Hydroxychavicol for Its Potential Use as an Oral Care Agent. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(1), 216–222. <https://doi.org/10.1128/AAC.00045-08>
- Siless, G. E., Gallardo, G. L., Rodriguez, M. A., Rincón, Y. A., Godeas, A. M., & Cabrera, G. M. (2018). Metabolites from the Dark Septate Endophyte *Drechslera* sp. Evaluation by LC/MS and Principal Component Analysis of Culture Extracts with Histone Deacetylase Inhibitors. *Chemistry & Biodiversity*, *15*(8), e1800133. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800133>
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products, *67*(4). <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491>
- Talukdar, R., Wary, S., Mili, C., Roy, S., & Tayung, K. (2020). Antimicrobial Secondary Metabolites Obtained from Endophytic Fungi Inhabiting Healthy Leaf Tissues of *Houttuynia cordata* Thunb., an Ethnomedicinal Plant of Northeast India. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *10*(9), 99–106. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2020.10912>

- Tamhid AH, Sukmarini L, Fitria A, Davi Setiawan I, Wahyu Wardana A, Ilyas M, Pramisanidi A, Triastuti A. Biodiversity and Bioprospecting of Fungal Endophytes from *Houttuynia cordata* Thunb. as a Potential Antibacterial and Anticancer Agent. *Chem Biodivers.* 2025 Feb;22(2):e202401705. doi: 10.1002/cbdv.202401705
- Tian, J., Fu, L., Zhang, Z., Dong, X., Xu, D., Mao, Z., ... Zhou, L. (2017). Dibenzo- α -Pyrones from the Endophytic Fungus *Alternaria* sp. Samif01: Isolation, Structure Elucidation, and Their Antibacterial and Antioxidant Activities. *Natural Product Research*, 31(4), 387–396. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1205052>
- Triastuti, A (2018). Exploration of Chemical Diversities in Fungal Endophytes: Influence of Addition of Epigenetic Modifiers and Fungal Co-Cultivation in *Botryosphaeria mamane* Metabolome. Dissertation. Université Paul Sabatier, France.
- Triastuti, A. (2020). Jamur Endofit sebagai Sumber Obat Bahan Alam. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 16(1), 52–73.
- Triastuti, A., Amalia, S. P., Ilyas, M., Pramisanidi, A., Wardana, A. W., Lubis, R. A., ... Sukmarini, L. (2025). Exploring the Biodiversity and Anticancer Potential of Fungal Endophytes from *Peronema canescens* Jack Authors: *Chem. Biodiversity*, e202403347. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202403347>
- Triastuti A, Vansteelandt M, Barakat F, Amasifuen C, Jargeat P, Haddad M. Untargeted Metabolomics to Evaluate Antifungal Mechanism: A Study of *Cophinforma mamane* and *Candida albicans* Interaction. *Nat Prod Bioprospect.* 2023 Jan 3;13(1):1. doi: 10.1007/s13659-022-00365-w
- Triastuti, A., Vansteelandt, M., Barakat, F., Trinel, M., Jargeat, P., Fabre, N., ... Haddad, M. (2019). How Histone Deacetylase Inhibitors Alter the Secondary Metabolites of *Botryosphaeria mamane*, an Endophytic Fungus Isolated from *Bixa orellana*. *Chemistry and Biodiversity*, 16(4). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800485>
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., ... Arita, M. (2015). MS-DIAL: Data-Independent MS/MS Deconvolution for Comprehensive Metabolome Analysis. *Nat. Methods*, 12(6), 523–526. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3393>
- Turenne, C. Y., Sanche, S. E., Hoban, D. J., Karlowsky, J. a., & Kabani, A. M. (1999). Rapid Identification of Fungi by Using the ITS2 Genetic Region and an Automated Fluorescent Capillary

- Electrophoresis System. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1846–1851.
- Vaniya, A., Samra, S. N., Palazoglu, M., Tsugawa, H., & Fiehn, O. (2017). Using MS-FINDER for Identifying 19 Natural Products in the CASMI 2016 Contest. *Phytochemistry Letters*, 21, 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.12.008>
- Venugopalan, A., & Srivastava, S. (2015). Endophytes as in Vitro Production Platforms of High Value Plant Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances*, 33(6), 873–887. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.004>
- Vujanovic, S., Vujanovic, J., & Vujanovic, V. (2022). Microbiome-Driven Proline Biogenesis in Plants Under Stress: Perspectives for Balanced Diet to Minimize Depression Disorders in Humans. *Microorganisms*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112264>
- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., ... Bandeira, N. (2016). Sharing and Community Curation of Mass Spectrometry Data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, 34(8), 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M., & Lorito, M. (2006). The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. *Phytopathology*, 96(2), 181–185. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0181>
- World Health Organization. (2022). *Cancer. WHO Fact sheet*. <https://doi.org/10.18356/9789210018647c003>
- Wu, S. H., He, J., Li, X. N., Huang, R., Song, F., Chen, Y. W., & Miao, C. P. (2014). Guaiane Sesquiterpenes and Isopimarane Diterpenes from an Endophytic Fungus *Xylaria* sp. *Phytochemistry*, 105, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.04.016>
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2016). Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols*

- in Bioinformatics*, (September), 14.10.1-14.10.91. <https://doi.org/10.1002/cpbi.11>
- Yang XL, Huang L, Ruan XL. Epigenetic Modifiers Alter the Secondary Metabolite Composition of a Plant Endophytic Fungus, *Pestalotiopsis crassiuscula* Obtained from the Leaves of *Fragaria chiloensis*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2014;16(4):412–7.
- Yasuo, K., & Saburo, T. (1971). Isolation and Biological Synergist Activity of Pestalotin, a Gibberellin from *Pestalotia cryptomeriaeicola*. *J Agr Biol Chem*, 36(11), 1925–1930. <https://doi.org/10.1080/00021369.1972.10860489>
- Ye, H. T., Luo, S. Q., Yang, Z. N., Wang, Y. S., Ding, Q., Wang, K. F., ... Wang, Y. (2021). Endophytic Fungi Stimulate the Concentration of Medicinal Secondary Metabolites in *Houttuynia Cordata* Thunb. *Plant Signaling and Behavior*, 16(9). <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1929731>
- Yu, Y., Zhao, Q., Wang, J., Wang, J., Wang, Y., Song, Y., ... Li, Q. (2010). Swainsonine-Producing Fungal Endophytes from Major Locoweed Species in China. *Toxicon*, 56(3), 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.020>
- Zabala, A. O., Xu, W., Chooi, Y. H., & Tang, Y. (2012). Characterization of a Silent Azaphilone Gene Cluster From *Aspergillus niger* ATCC 1015 Reveals a Hydroxylation-Mediated Pyran-Ring Formation. *Chemistry and Biology*, 19(8), 1049–1059. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.004>
- Zhang, Z., He, X., Wu, G., Liu, C., Lu, C., Gu, Q., ... Li, D. (2018). Aniline-Tetramic Acids from the Deep-Sea-Derived Fungus *Cladosporium sphaerospermum* L3P3 Cultured with the HDAC Inhibitor SAHA. *Journal of Natural Products*, 81(7), 1651–1657. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00289>

INDEX

A

- Acremonium* 39, 51
- Alkaloid 6, 30, 31, 32
- Alternaria* 6, 25, 38, 41, 44, 45, 109, 113, 128, 148, 150, 154
- Antibiotik 84
- Antidiabetes 39
- Antifeedant* 6
- Antiinflamasi 36, 47
- Antijamur 35, 38, 49, 102, 104, 105, 130
- Antikanker 15, 36, 43, 44, 45
- Antimikroba 30, 37, 98, 99
- Antioksidan 36
- Antiprotozoa 42
- Arabidopsis* 48
- Artemisia annua* 42
- Asam valproat 129, 130, 131, 139, 141
- Ascomycota 8, 9
- Aspergillus* 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 47, 82, 111, 130, 147, 151, 156
- Astragalus adsurgens* 5
- Auxin 5, 6

B

- Barcode DNA 63
- Basidiomycota 9
- Beauveria* 51, 111, 129, 132, 148

Biodiversitas 8, 15, 149

BLAST 75, 76

Botryosphaeria 31, 46, 47, 84, 128, 148, 154

Botrytis 109

C

Candida 37, 38, 82, 99, 147, 150, 151, 152, 154

Catharanthus roseus 5, 44, 51

Ceratobasidium 16, 19, 52

Chalara 138

Cladosporium 19, 38, 129, 156

Clavicipitaceae 8

Colletotrichum 15, 16, 17, 18, 19, 41, 51, 109

Cytoscape 140, 142

D

Diagram venn 124

Dimetilalil difosfat 29

E

Elektroforesis 72, 75

Epifit 14, 55

F

Farnesol 103, 104

Fase kematian 80

Fase lag 80

Fase log 80

Fase stasioner 80

Fermentasi 43, 53, 79, 81, 82, 84, 86, 87, 88, 93, 125, 136

Filogeni 76

Fusarium 5, 16, 19, 25, 31, 32, 38, 44, 46, 49, 51, 64, 95, 150, 151

G

Gaeumannomyces 5

H

Heterotrof 6, 7, 13, 82

Hifa 6, 7, 10, 11, 60, 61, 80, 104, 123

Histone deacetylase inhibitors 129

Houttuynia cordata 18, 19, 153, 154

I

IGS 64, 66

Imunosupresan 5, 24, 30, 45, 46

Isopentenil difosfat 29

ITS 63, 64, 65, 149

K

Kadar bunuh minimum 97

Kadar hambat minimum 97

Klade 76

Kladogram. *Lihat klade*

KLT 85, 89, 91, 92, 93

Ko-kultur 98, 99, 102, 103, 104, 113, 114, 115, 116, 119, 120, 121, 123, 125, 127, 128

M

Meroterpenoid 23, 31

Mikoriza 14

Miselium 7

Mucor 39, 45

Multivariat 123, 124

N

Neocosmospora 16, 43

Nigrospora 39, 40, 42, 44, 51, 109, 113, 128, 150

Non-ribosomal peptide 23, 24

Nonribosomal peptides 22

P

Penicillium sp 5, 18, 46, 51, 138

Peronema canescens 15, 18, 58, 76, 147, 149, 153, 154

Pestalotiopsis 5, 31, 32, 37, 39, 44, 51, 52, 111, 125, 151, 156

Phoma 31, 39, 44, 51

Phomopsis 6, 15, 16, 17, 19, 31, 46, 52, 58, 76

Poliketida 25

Polymerase chain reaction 62, 69

R

Rhizopus 47

ROS 36, 37

S

SAHA 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 142, 156

Sekuensing 74

Self-loop 142

Septat 7

Simbiosis 5, 7, 13, 14

Sinopodophyllum hexandrum 5

Spora 2, 7, 60, 61, 62, 77

T

Talaromyces 42, 44

Taxomyces andreana 1

Taxus iii, 2, 4, 44

Terminalia 5, 37, 150

Terminalia morobensis 5, 37

Terpenoid 28

Tracheospermum 37

Trametes 5

Trichoderma 17, 45, 47, 50, 155

Trichophyton 113

Trifolium alexanderinum 5

V

Volcano plot 134, 135

X

Xcalibur 142

BIOGRAFI PENULIS

Asih Triastuti merupakan seorang peneliti dan akademisi di bidang farmasi bahan alam dengan fokus utama pada eksplorasi metabolit sekunder dari jamur endofit. Ia menyelesaikan pendidikan sarjana dan profesi apoteker di Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pendidikan magister (S2) ia tempuh di Kyungshung University, Korea Selatan, dengan penekanan pada ilmu-ilmu farmasi dan bioteknologi. Gelar doktor diraihinya dari Université Paul Sabatier, Toulouse, Perancis, dalam bidang Biologi, Kesehatan, dan Kimia. Disertasinya menitikberatkan pada kajian mendalam terkait potensi bioaktif metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur endofit dan metode meningkatkan metabolit sekunder jamur endofit.

Minat riset Asih terfokus pada mikroorganisme endofit yang hidup dalam jaringan tanaman dan kemampuannya dalam menghasilkan senyawa bioaktif dengan aktivitas farmakologis, termasuk antioksidan, antimikroba, dan antikanker. Ia memanfaatkan pendekatan metabolomik, dengan dukungan teknologi analitik seperti LC-MS/MS dan NMR, untuk mengidentifikasi dan mengevaluasi profil kimia dari metabolit-metabolit tersebut. Penelitian terkininya mencakup eksplorasi jamur endofit dari tanaman *Houttuynia cordata* (amis-amisan) dan *Peronema canescens* (sungkai) sebagai sumber potensial senyawa antimikroba dan antikanker.

Asih telah mempublikasikan hasil penelitiannya di berbagai jurnal ilmiah bereputasi internasional dan aktif sebagai pemakalah pada konferensi ilmiah nasional maupun internasional. Selain aktivitas riset, ia juga terlibat dalam kegiatan akademik seperti pengajaran, pembimbingan mahasiswa, dan pengembangan kerja sama penelitian lintas institusi, nasional dan internasional.

Keterlibatannya dalam berbagai bidang ilmiah menunjukkan komitmennya terhadap pengembangan ilmu pengetahuan yang berdampak langsung pada masyarakat. Melalui buku ini, Asih berupaya menghadirkan kontribusi ilmiah yang tidak hanya bersifat akademik, tetapi juga aplikatif dan relevan dalam konteks pengembangan bahan alam sebagai sumber pengobatan masa depan.

Jamur Endofit

Sumber Senyawa
Terapeutik dan Komersial

Buku berjudul ***“Jamur Endofit: Sumber Senyawa Terapeutik dan Komersial”*** ditulis oleh Asih Triastuti, dosen Farmasi Universitas Islam Indonesia. Buku ini merupakan buku pertama yang mengintegrasikan pendekatan biologi, farmasi, dan kimia dalam membahas jamur endofit. Buku ini terdiri atas 12 bab yang mendiskusikan tentang definisi, klasifikasi, teknik fermentasi, teknik ekstraksi dan isolasi metabolit sekunder. Buku ini dilengkapi dengan contoh spesies jamur endofit dan metabolit yang diproduksinya beserta aktivitasnya baik di bidang kesehatan, industri, dan lingkungan.

Penjelasan mengenai panduan pemilihan tanaman sebagai sumber endofit, teknik isolasi jamur endofit, beserta teknik preservasinya dijelaskan secara sistematis dan dilengkapi dengan ilustrasi gambar yang menarik. Buku ini dilengkapi dengan kasus nyata penelitian yang dilakukan penulis dalam mengembangkan jamur endofit nusantara. Teknik metabolomik juga dibahas dalam buku ini yang penting dalam mendukung analisis metabolom jamur dan sistem biologisnya. Buku ini memperkenalkan teknik analisis modern dalam metabolomik seperti analisis diferensial dan multivariat serta penggunaan platform seperti MS-DIAL dan MS-FINDER serta MetaboAnalyst.

Di buku ini juga dibahas permasalahan yang muncul selama proses kultur jamur endofit seperti munculnya fenomena “silent gene” sebagai akibat kultivasi kultur tunggal dan aseptik di laboratorium beserta pendekatan yang dilakukan untuk mengatasinya. Akhir kata, buku ini sangat bermanfaat bagi mahasiswa, dosen, dan peneliti yang ingin mempelajari tentang jamur endofit.



✉ zahirpublishing@gmail.com

🌐 www.zahirpublishing.net

ISBN 978-623-966-646-5



9

786234

666465