

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KAPANG ENDOFIT DARI TANAMAN KUNYIT (*Curcuma longa* L.) SEBAGAI PENGHASIL ANTIOKSIDAN

(*The Isolation and Identification of Endophyte Fungi from Turmeric (*Curcuma longa* L.) as an Antioxidant Producer*)

Tiwit Widowati, Bustanussalam, Harmastini Sukiman dan Partomuan Simanjuntak

Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Jl. Raya Bogor KM 46, Cibinong, Jabar 16911, Indonesia
e-mail: tiwitwidowati@yahoo.com

Naskah diterima 13 Januari 2016, revisi akhir 15 April 2016 dan disetujui untuk diterbitkan 18 April 2016

ABSTRAK. Kapang endofit merupakan mikroba yang terdapat di dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan tanaman inang. Kapang endofit mampu menghasilkan metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan sebagai senyawa antioksidan, antikanker dan antimikroba. Kapang endofit dapat ditemukan pada berbagai jenis tanaman terutama tanaman obat seperti kunyit (*Curcuma longa* L.). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi kapang endofit dari batang tanaman kunyit yang berpotensi sebagai penghasil antioksidan. Kapang endofit yang diisolasi dari batang tanaman kunyit diperoleh 12 isolat. Uji antioksidan menggunakan 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) menunjukkan bahwa isolat K.Cl.Sb.B1 menghasilkan nilai inhibisi tertinggi (78,81%). Berdasarkan identifikasi molekuler, isolat K.Cl.Sb.B1 merupakan *Colletotrichum* sp.

Kata kunci: *Curcuma longa* L., identifikasi antioksidan, kapang endofit

ABSTRACT. Endophyte fungi are microbe that living inside the plant tissue without harming the host plant. Endophyte fungi can produce secondary metabolite which can be used as antioxidant, anticancer and antimicrobes compound. Endophyte fungi can be found in many plants especially herbs such as turmeric (*Curcuma longa* L.). The aims of this study are to isolate and identify endophyte fungi from stem of *C. longa* L. which is potential as an antioxidant producer. The endophyte fungi isolated from turmeric stem were 12 isolates. Antioxidant activity was assayed using 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) showed that isolate K.Cl.Sb.B1 produced the highest inhibition value (78,81%). Based on molecular identification, the isolate K.Cl.Sb.B1 was *Colletotrichum* sp.

Keywords: *Curcuma longa* L., endophyte fungi, identification antioxidant

1. PENDAHULUAN

Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanpa membahayakan tanaman inang (Strobel & Daisy, 2003). Mikroba endofit terdapat di jaringan tanaman seperti bunga, buah, batang, daun, akar dan biji serta merupakan pelindung bagi tanaman inang dari stress lingkungan dan kompetisi mikroba (Hung & Annapurna, 2004). Mikroba ini hidup bersimbiosis saling menguntungkan

dengan tanaman inang, dimana mikroba endofit mendapatkan nutrisi dari hasil metabolisme tanaman sedangkan mikroba menghasilkan senyawa aktif berupa metabolit sekunder yang menjaga inang dari serangan penyakit (Taechowishan, *et al.*, 2005).

Mikroba endofit sebagai penghasil senyawa aktif berpotensi untuk dikembangkan sebagai produser bahan baku obat. Kapang endofit *Muscodor albus* dari *Cinnamomum zeylanicum* diketahui menghasilkan campuran senyawa organik

volatil dan mempunyai aktivitas antimikroba dengan spektrum yang luas (Ezra, *et al.*, 2004). Selanjutnya kapang endofit *Taxomyces andreane* dari tanaman *Taxus brevifolia* menghasilkan senyawa aktif berupa *paclitaxel* (taksol) yaitu obat antikanker (Strobel & Daisy, 2003). Senyawa pestacin dan isopestacin yang diperoleh dari kultur endofit *Pestalotiopsis microspora* dari tanaman *Terminalia morobensis* menunjukkan aktivitas antimikroba dan antioksidan (Harper, *et al.*, 2003).

Berbagai jenis tanaman terutama tanaman obat dapat digunakan sebagai sumber isolat kapang endofit. Kapang endofit dari tanaman obat merupakan sumber metabolit sekunder. Isaka, *et al.*, (2010) melaporkan kapang endofit *Xylaria* sp. dari tanaman *Licuala spinosa* mengandung senyawa Eremophilanoides yang bersifat antikanker. Senyawa Phomoarcherins A-C dihasilkan kapang endofit *Phomopsis archeri* yang berasal dari tanaman obat *Viguiera albindia*, bersifat antimalaria (Hemtasin, *et al.*, 2011). Tumbuhan yang banyak digunakan oleh masyarakat sebagai bahan baku obat-obatan tradisional antara lain dari marga Zingiberaceae. Salah satu jenis tanaman yang sering digunakan adalah kunyit (*Curcuma longa* L.). Kunyit selain digunakan sebagai bahan baku obat juga dipakai sebagai bumbu dapur dan zat pewarna alami. Tanaman ini mempunyai senyawa aktif yaitu kurkumin yang berpotensi sebagai antioksidan (Maehara, *et al.*, 2011). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kapang endofit dari batang tanaman kunyit yang berpotensi menghasilkan senyawa kimia yang memiliki aktivitas antioksidan.

2. METODE PENELITIAN

Isolasi dan Pemurnian Kapang Endofit

Tanaman kunyit yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari daerah Cicurug, Sukabumi. Sampel tanaman disimpan dalam plastik untuk dilakukan tahap isolasi di Laboratorium Mikrobiologi Simbiotik Tanaman, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI. Isolasi kapang bakteri

endofit dilakukan menurut metode Tomita (2003). Sampel tanaman dicuci dengan air mengalir selama 10 menit kemudian dipotong menjadi beberapa bagian dengan panjang 2-3 cm. Potongan batang tanaman kunyit disterilisasi permukaan dengan cara direndam dalam alkohol 75% selama 1 menit, larutan sodium hipoklorit (NaOCl) 5,3% selama 5 menit dan alkohol 75% selama 30 detik. Potongan sampel dikeringkan dengan kertas tisu steril kemudian dibelah dengan pisau steril dan diletakkan pada cawan petri yang berisi media *Corn Meal Malt* (CMM) yang terdiri dari 17 g *Corn Meal Agar*, 20 g *Malt Extract*, 2 g *Yeast Extract* dan 50 mg *chloramphenicol* per liter air lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 3 hari sampai 4 minggu.

Koloni kapang yang sudah tumbuh dimurnikan dengan cara memotong sebagian miselium kapang dan dipindahkan secara aseptik ke dalam media kultur. Media kultur yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA). Koloni diinkubasi pada suhu ruang selama 48-72 jam. Koloni yang terpisah dan tumbuh dengan baik selanjutnya ditanam pada media PDA miring sebanyak dua ulangan. Isolat kapang yang telah murni diidentifikasi secara makroskopis.

Karakterisasi Morfologi Kapang

Karakterisasi morfologi kapang dilakukan dengan mengamati beberapa karakter secara makroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi warna dan permukaan koloni (granular, seperti tepung, menggunung, licin), tekstur, zonasi, daerah tumbuh, garis-garis radial dan konsentris, dan warna balik koloni.

Seleksi Kapang Penghasil Antioksidan

Kapang yang telah diperoleh difermentasi secara bertahap pada media *Potato Dextrose Broth* (PDB) volume 5 ml, 50 ml dan 500 ml dan diinkubasi goyang dengan shaker pada kecepatan 150 rpm selama 7 hari. Kultur cair disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan biomassa. Filtrat diekstraksi dengan etil asetat sedangkan biomassa dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 24 jam. Biomassa kering

kemudian diekstrak dengan etil asetat sampai semua biomassa terendam oleh pelarut dengan rasio 1:2. Masing-masing ekstrak dikeringkan menggunakan *rotavapor*. Ekstrak kapang konsentrasi 100 ppm direaksikan dengan 0,6 mL DPPH 0,4 mM. Campuran tersebut diinkubasi ke dalam *water bath* pada suhu 37°C selama 30 menit. Selanjutnya larutan tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 515 nm (Molyneux, 2004).

Identifikasi Molekuler

Identifikasi isolat fungi dilakukan secara molekuler berdasarkan analisis genetika secara parsial pada lokus *Internal Transcribed Spacer* (ITS) *ribosomal DNA* fungi. Identifikasi dilakukan pada isolat yang menghasilkan aktivitas antioksidan tertinggi. Isolasi DNA diawali dengan menumbuhkan isolat fungi dalam media cair *Potato Dextrose Broth* (PDB) dan diinkubasi selama 72 jam. Biomassa berupa miselia fungi selanjutnya dipanen dengan menyaring hasil fermentasi dengan menggunakan kertas saring steril dan dicuci dengan akuades steril. Miselia dimasukkan dalam mortar steril dan digerus dengan penggerus steril dengan ditambahkan nitrogen cair. Sekitar 0,5 g biomassa kering dipindahkan ke dalam 1,5 ml tabung mikro yang berisi 600 µl larutan buffer CTAB. Tabung kemudian dibolak-balik dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit dan selanjutnya diinkubasi di dalam es selama 5 menit. Sebanyak 600 µl campuran kloroform dan isoamil alkohol dengan perbandingan 24:1 ditambahkan ke dalam tabung. Tabung kemudian dibolak-balik dan disentrifugasi pada 25.000 x g pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru dan ditambahkan dengan 0,1 x volume 2M NaOAc pH 5,2 dan 3 x volume etanol kemudian diinkubasi pada suhu -20°C selama 2 jam. Pelet DNA kapang diperoleh dengan cara sentrifugasi pada 25.000 x g pada suhu 4°C selama 25 menit. Pelet DNA kapang dicuci dengan 500 µl 70% etanol kemudian disentrifugasi pada 25.000 x g pada suhu 4°C selama 5 menit. Pelet DNA kapang dikeringkan di dalam

ruang kedap udara selama 5 menit kemudian dilarutkan dengan 0,2 x volume RNase dan 30 µl buffer TE steril, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit dan 70°C selama 10 menit. Ekstraksi DNA fungi dilakukan dengan menggunakan reagen kit *nucleon PHYTOpure* (Amersham LIFE SCIENCE, Amerika).

Amplifikasi PCR pada ITS menggunakan Primer ITS 4: 5'-- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3' dan Primer ITS 5: 5'--GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G –3' (White, *et al.*, 1990; O'Donnell, 1993). Amplifikasi DNA dilakukan dengan membuat volume 30 µl yang mengandung 10,5 µl air bebas basa, 15 µl 2 x PCR mastermix (Promega), 0,75 µl 10 pmol masing-masing primer ITS 4 dan ITS 5 serta 3 µl (sekitar 250 ng/µl) templat DNA. Reaksi amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus sebagai berikut: pre-denaturasi pada 95°C selama 15 menit, denaturasi pada 95°C selama 30 menit, pemansan (*annealing*) pada 55°C selama 30 detik, pemanjangan pada 72°C selama 1,5 menit, pemanjangan ulang pada 72°C selama 5 menit dan terakhir disimpan pada suhu 25°C selama 10 menit. Pemurnian produk PCR dilakukan dengan *PEG precipitation method* (Hiraishi, *et al.*, 1995) dan dilanjutkan dengan siklus sekuensing. Hasil siklus sekuensing dimurnikan kembali dengan *Ethanol purification method*. Analisis pembacaan urutan basa nitrogen menggunakan *automated DNA sequencer* (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer) (Applied Biosystems).

Data mentah hasil pengurutan selanjutnya dipotong dan dikumpulkan menggunakan program BioEdit (Hall, 2013). Data sekuens yang telah dikumpulkan selanjutnya di BLAST dengan data genom yang telah didaftarkan di DNA Data Bank of Japan (DDBJ, 2015) atau National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2016) guna menentukan takson atau spesies yang memiliki *homology/similarity* terbesar dan terdekat secara molekuler.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Karakterisasi Kapang Endofit

Hasil isolasi kapang endofit dari bagian batang kunyit diperoleh 12 isolat. Isolat-isolat tersebut disimpan dalam media PDA miring untuk digunakan dalam pengujian selanjutnya. Berdasarkan deskripsi ciri-ciri dan karakter makroskopis kapang endofit terdapat perbedaan morfologi yang sangat bervariasi, hal ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Adanya variasi bentuk kapang endofit yang diperoleh, diantaranya dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Habitat tanaman merupakan faktor

lingkungan yang banyak mempengaruhi struktur dan komposisi spesies mikroba yang mengkolonisasi akar, batang, cabang dan daun (Araujo, *et al.*, 2002). Hal ini menunjukkan bahwa mikroba endofit bervariasi di dalam tanaman atau tergantung pada interaksi dengan endofit atau patogen lainnya.

Seleksi Kapang Penghasil Antioksidan

Bioaktivitas ekstrak kunyit yang diukur adalah antioksidan dengan data dalam IC_{50} . Molyneux (2004) menyatakan nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration 50*) adalah konsentrasi antioksidan ($\mu\text{g/ml}$) yang mampu menghambat 50% aktivitas radikal bebas.

Tabel 1. Karakter morfologi kapang endofit dari batang *C. longa*

Kode Isolat	Bentuk Koloni	Garis Radial	Lingkar Konsentris	Kecepatan Tumbuh (cm/hari)	Foto
K.Cl.Sb.B1	Miselium agak halus, warna koloni hijau abu-abu, warna sebalik hijau putih	Ada	Tidak ada	0,7	
K.Cl.Sb.B2	Permukaan koloni lebih kasar dan berwarna putih	Tidak ada	Tidak ada	0,9	
K.Cl.Sb.B3	Miselium seperti beludru dengan hifa aerial pendek, warna putih, warna sebalik putih hijau	Ada	Ada	0,9	
K.Cl.Sb.B4	Permukaan koloni lebih kasar, berwarna putih, warna sebalik putih orange	Tidak ada	Ada	1	
K.Cl.Sb.B5	Permukaan koloni lebih kasar dan berwarna putih	Tidak ada	Ada	0,8	
K.Cl.Sb.B6	Hifa aerial halus, pendek, tegak dan berwarna putih	Ada	Ada	1,1	
K.Cl.Sb.B7	Hifa aerial panjang, padat seperti kapas, berwarna putih	Ada	Ada	0,7	
K.Cl.Sb.B8	Permukaan koloni lebih kasar dan berwarna putih coklat	Tidak ada	Tidak ada	0,8	
K.Cl.Sb.B9	Permukaan koloni lebih kasar dan berwarna putih. Warna sebalik coklat hijau	Tidak ada	Tidak ada	0,7	
K.Cl.Sb.B10	Miselium seperti beludru dengan hifa aerial pendek, warna koloni putih hijau	Ada	Ada	0,8	
K.Cl.Sb.B11	Permukaan koloni lebih kasar dan berwarna putih. Warna sebalik putih hijau	Ada	Ada	1,2	
K.Cl.Sb.B12	Permukaan koloni lebih kasar dan berwarna putih	Tidak ada	Tidak ada	0,8	

Keterangan: K = kapang; Cl = *Curcuma longa*; Sb = Sukabumi; B = batang; 1-12 = nomor koleksi

Seleksi Kapang Penghasil Antioksidan

Bioaktivitas ekstrak kunyit yang diukur adalah antioksidan dengan data dalam IC_{50} . Molyneux (2004) menyatakan nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration* 50) adalah konsentrasi antioksidan ($\mu\text{g/ml}$) yang mampu menghambat 50% aktivitas radikal bebas. Pola aktivitas antioksidan dari bahan yang diuji dinyatakan aktif bila menghambat radikal bebas lebih dari 80%, dinyatakan sedang keaktifannya bila menghambat 50-80% dan dinyatakan tidak aktif bila menghambat kurang dari 50%. Zat aktif pada kunyit yang memiliki efektivitas sebagai antioksidan (% inhibisi) adalah kurkumin. Pigmen alami berwarna kuning ini memiliki kemampuan yang sangat baik dalam melindungi tubuh dari radikal bebas yang sangat baik terutama radikal bebas berupa lemak buruk dan senyawa yang larut dalam lemak. Hasil ekstrak etil asetat dari filtrat dan biomassa kapang endofit kunyit mempunyai aktivitas antioksidan yang bervariasi seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase inhibisi dari ekstrak etil asetat filtrat dan biomassa

No.	Kode Isolat	Inhibisi (%)	
		Filtrat	Biomassa
1.	K.Cl.Sb.B1	78,81	38,37
2.	K.Cl.Sb.B2	24,21	4,81
3.	K.Cl.Sb.B3	33,41	8,84
4.	K.Cl.Sb.B4	34,32	21,56
5.	K.Cl.Sb.B5	54,24	0,89
6.	K.Cl.Sb.B6	42,49	0,89
7.	K.Cl.Sb.B7	40,07	12,98
8.	K.Cl.Sb.B8	33,29	8,05
9.	K.Cl.Sb.B9	22,52	7,94
10.	K.Cl.Sb.B10	30,23	1,16
11.	K.Cl.Sb.B11	42,57	3,10
12.	K.Cl.Sb.B12	48,87	7,11

Ekstrak dari filtrat isolat K.Cl.Sb.B1 menunjukkan nilai inhibisi tertinggi (78,81%), sedangkan nilai inhibisi terendah ditunjukkan oleh ekstrak filtrat isolat K.Cl.Sb.B9 (22,52%). Persentase inhibisi tertinggi dari ekstrak biomassa

juga ditunjukkan oleh isolat K.Cl.Sb.B1 (38,37%), sedangkan nilai inhibisi terendah diperoleh dari ekstrak biomassa isolat K.Cl.Sb.B5 dan K.Cl.Sb.B6 (0,89%). Data tersebut menyatakan bahwa filtrat isolat K.Cl.Sb.B1 bisa menghambat radikal bebas dengan keaktifan sedang, sedangkan isolat yang lain, tidak aktif. Hasil Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai % inhibisi filtrat lebih besar dibandingkan dengan biomassa, hal ini terjadi karena senyawa aktif antioksidan yang dihasilkan berada banyak di filtrat (ekstraseluler) dibandingkan di biomassa (intraseluler).

Uji antioksidan DPPH didasarkan pada kemampuan senyawa aktif antioksidan untuk meredam aktifitas radikal bebas DPPH yang berwarna ungu membentuk senyawa stabil non-radikal yang berwarna kuning. Aktivitas perendaman DPPH menunjukkan adanya kemampuan senyawa antioksidan untuk mendonorkan elektron atau hidrogen sehingga merubah radikal menjadi non-radikal yang lebih stabil (Bougatef, *et al.*, 2009). Souwaluck & Yingyong (2009) melaporkan adanya aktivitas antioksidan dari ekstrak rimpang *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr., antara 57,63-80,88%. Selain itu, juga dilaporkan adanya aktivitas antioksidan dari tanaman Zingiberaceae di Taiwan sekitar 53-89% (Chen, *et al.*, 2008).

Identifikasi Molekuler Isolat K.Cl.Sb.B1

Hasil sekuensing ITS rDNA isolat K.Cl.Sb.B1 adalah sebagai berikut:

>1776493_B1 ITS_4

```
GGGGGTTTTACGGCTAGAGTCCCTC
CGAATCCCAATGCGAGACGAAATGT
TACTACGCAAAGGAGGCTCCGAGAG
GGTCCGCCACTACCTTTAAGGGCCT
ACGTCAACCGTAGAGCCCCAACACC
AAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGA
CGCTCGAACAGGCATGCCCCGCCAGA
ATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTC
AAAGATTTCGATGATTCACCTGAATTC
TGCAATTCACATTACTTATCGCATTT
CGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGA
ACCAAGAGATCCGTTGTAAAAAGTT
TTGATTATTTGCTTGTGTCACTCAGA
AGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTG
GTTATCCTCCGGCGGGCGCCCCACC
```

CGCGGACGGGAGAGGGCCGGGAGA
CGTCCTTTTTAGGGGACGCCTACCC
GCCGAAGCAACAGTTAAGGTATGTT
CACAAAGGGTTGATGAGCGGTAAC
CAGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCA
CCAACGGAGACCTTGTTACG

>1776492_B1_ITS_5

TTACTGAGTTACCGCTCATCAACCCT
TTGTGAACATACCTTAAGTGTGCTT
CGGCGGGTAGGCGTCCCCTAAAAAG
GACGTCTCCCGGCCCTCTCCCGTCC
GCGGGTGGGGCGCCCGCGGAGGA
TAACCAAACCTCTGATTTAACGACGT
TTCTTCTGAGTGACACAAGCAAATA
ATCAAAACTTTTAACAACGGATCTC
TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGC
CAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTT
CGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCT
CTGCTTGGTGTGTTGGGGCTCTACGGT
GACGTAGGCCCTTAAAGGTAGTGGC
GGACCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCG
TAGTAACATTTCTGCTCTCGCATTGGG
ATTTCGGAGGGACTCTAGCCGTAAAA
CCCCCAATTTTACTAAGGTTGACCTC
GGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAA
CTTAAGCATATCAATA

>Contig-B1

CGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAAC
CAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTA
CCGCTCATCAACCCTTTGTGAACAT
ACCTTAAGTGTGCTTCGGCGGGTA
GGCGTCCCCTAAAAAGGACGTCTCC
CGGCCCTCTCCCGTCCGCGGGTGGG
GCGCCCGCCGGAGGATAACCAAAC
CTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGT
GACACAAGCAAATAATCAAAACTTT
TAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTG
GCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT

TTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGT
TGGGGCTCTACGGTTGACGTAGGCC
CTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCTC
GGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACATT
TCGTCTCGCATTGGGATTTCGGAGGG
ACTCTAGCCGTAAAACCCCCAATTT
TACTAAGGTTGACCTCGGATCAGGT
AGGAATACCCGCTGAACCTAAGCAT
ATCAATA

Berdasarkan hasil sekuen, isolat K.Cl.Sb.B1 menunjukkan 100% kemiripan dengan sekuen *Colletotrichum* sp. dari GenBank yang dapat dilihat pada Tabel 3. Adanya kemiripan antara 99-100% menunjukkan bahwa isolat K.Cl.Sb.B1 mempunyai jumlah kromosom, ukuran genom dan fungsi gen yang sama dengan *Colletotrichum* sp.

Colletotrichum merupakan genus kapang yang bersimbiosis dengan tanaman sebagai endofit atau fitopatogen (Rodriguez & Redman, 2008). Beberapa spesies *Colletotrichum* adalah patogen bagi tanaman, tetapi spesies yang lain mempunyai hubungan simbiosis mutualistik dengan inangnya, bahkan diantaranya menghasilkan beberapa senyawa bioaktif. Tianpanich, *et al.*, (2011) melaporkan telah mengisolasi dan mengidentifikasi 5 senyawa turunan *isocoumarins* dan *phthalide* baru dari kapang endofit *Colletotrichum* sp. CRI535-02 yang menunjukkan aktifitas antioksidan, sitotoksik dan radikal bebas.

Phthalide alami dapat ditemukan pada tumbuhan dan kapang serta mempunyai aktifitas biologis dengan spektrum yang luas. Penelitian lain menyebutkan bahwa kapang endofit *Colletotrichum gleosporioides* strain JGC-9 yang diisolasi dari tanaman obat *Justicia gendarussa* mampu menghasilkan senyawa taksol sebagai obat antikanker dan antioksidan (Gangadevi & Muthumary, 2008). Kapang endofit *C. gleosporioides*

Tabel 3. Analisis blast berdasarkan sekuen ITS-rDNA

Deskripsi	Nilai total	Nilai pensejajaran	Nilai E	Kemiripan
<i>Colletotrichum</i> sp. ITCC 6450	1077	100%	0.0	100%
<i>Colletotrichum</i> sp. ITCC 4971	1077	100%	0.0	100%

yang diisolasi dari tanaman *Michelia campaca* juga menghasilkan senyawa aktif *2-phenylethyl 1H-indol-3-yl-acetate* dan tujuh senyawa lain yang menunjukkan aktifitas antikanker dan antifungal (Chapla, *et al.*, 2014).

Ekstrak etil asetat dari kapang endofit *Colletotrichum* sp. yang diisolasi dari tanaman *Polygala elongata* menunjukkan nilai inhibisi maksimum 81,72% pada konsentrasi 100 µg/ml (Pawle & Singh, 2014). Nilai tersebut sedikit lebih tinggi jika dibandingkan dengan nilai inhibisi yang dihasilkan isolat K.Cl.Sb.B1 (78,81%) yang juga teridentifikasi sebagai *Colletotrichum* sp. Nath, *et al.*, (2014) melaporkan bahwa ekstrak etanol dari kapang endofit *Colletotrichum gleosporioides* MKL1 yang diisolasi dari tanaman *Murraya koengii* menunjukkan nilai inhibisi lebih rendah (52,77%) dibandingkan ekstrak dari isolat K.Cl.Sb.B1.

4. KESIMPULAN

Isolasi kapang endofit dari batang tanaman kunyit diperoleh 12 isolat. Ekstrak filtrat dari isolat K.Cl.Sb.B1 berpotensi sebagai penghasil antioksidan dengan IC₅₀ sebesar 78,81%. Hasil identifikasi molekuler menunjukkan isolat K.Cl.Sb.B1 merupakan kapang *Colletotrichum* sp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia atas dana penelitian yang telah diberikan melalui kegiatan penelitian kompetitif.

DAFTAR PUSTAKA

- Araújo, W. L., Marcon, J., Maccheroni Jr, W., van Elsas, J. D. & Azevedo, J. L. (2002). Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(10), 4906-4914. DOI: 10.1128/AEM.68.10.4906-4914.2002.
- Bougatef, A., Muhammed, H., Rafik, B., Imen, L., Yosra, T. E. & Moncef, N. (2009).

Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus*) muscle protein hydrolysates by gastrointestinal proteases. *Food Chemical*. 114, 1198-1205.

- Chapla, V. M., Zeraik, M. L., Leptokarydis, I. H., Silva, G. H., Bolzani, V. S., Young, M. C. M., Pfennig, L. H. & Araujo, A. R. (2014). Antifungal Compounds Produced by *Colletotrichum gleosporioides*, an Endophytic Fungus from *Michelia champaca*. *Molecules*. 19, 19243-19252. doi:10.3390/molecules191119243.
- DDBJ. (2015). Blast. DNA Data Bank of Japan (DDBJ). <http://blast.ddbj.nig.ac.jp/>.
- Ezra, D., Hess, W. M. & Strobel G. A. (2004). New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*. 150, 4023-4031. doi: 10.1099/mic0.27334-0.
- Gangadevi, V. & Muthumary, J. (2008). Isolation of *Colletotrichum gleosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. *Mycologia Balcanica*. 5, 1-4.
- Hall, Tom. (2013). *BioEdit*. Ibis Biosciences Carlsbad, CA 92008. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
- Harper, J. K., Arif, A. M. & Ford E. J. (2003). Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron*. 59(14), 2471-2476.
- Hemtasin, C., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Hahnvajanawong, C., Soyong, K., Prabpai, S. & Kongsaree, P. 2011. Cytotoxic Pentacyclic and tetracyclic aromatic sesquiterpenes from *Phomopsis archeri*. *J. Nat. Prod*. 74(4), 609-613.
- Hiraishi, A., Kamagata, Y. & Nakamura, N. (1995). Polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from methanogens. *Journal of Fermentation Bioengineering*. 79, 523-529.

- Hung, P. Q. & Annapurna, K. (2004). Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* sp.). *Omonrice*. 12, 92-101.
- I-Nan Chen, I. C., Chang. C. C., Ng C. C., Wang, C. Y., Shyu, Y. T. & Chang, T. L. (2008). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Zingiberaceae Plants in Taiwan. *Plant. Foods Hum. Nutr.* 63, 15–20.
- Isaka, M., Chinthanom, P., Boonruangprapa, T., Rungjindamai, N. & Pinruan, U. (2010). Eremophilan-type sesquiterpenes from the fungus *Xylaria* sp. BCC 21097. *J. Nat. Prod.* 73, 683–687.
- Maehara, S., Ikeda, M., Haraguchi, H., Kitamura, C., Nagoe, T., Ohashi, K. & Shibuya, H. (2011). Microbial conversion of curcumin into colorless hydroderivatives by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. associated with *Curcuma longa*. *Chem Pharm Bull.* 59(8), 1042-1044.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanarin Journal of Science Technology*. 26(2), 211-219.
- Nath, A., Pathak, J. & Joshi, S. R. (2014). Bioactivity assessment of endophytic fungi associated with *Centella asiatica* and *Murraya koengii*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 2(05), 006-011. DOI: 10.7324/JABB.2014.2502.
- NCBI. (2016). *Blast*. National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- O'Donnell, K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds, D.R. & Taylor, J.W. (eds), *The fungal holomorph: Mitotic, meiotic and pleomorphic specification in fungal systematic* (pp. 225-233). CAB International, Wallingford.
- Pawle, G. & Singh, S. K. (2014). Antioxidant Potential of Endophytic Fungus *Colletotrichum* species isolated from *Polygala elongata*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 5(3), 313-319.
- Rodriguez, R. & Redman, R. (2008). More than 400 million years of evolution and some plant still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experiment Botany*. 59(5), 1109-1114. DOI:10.1093/jxb/erm342.
- Saowaluck, B. & Yingyong, P. (2009). Essential Oil and Antioxidant Activity of Cassumunar Ginger (Zingiberaceae: *Zingiber montanum* (Koenig) Link ex Dietr.) Collected from Various Parts of Thailand. *Kasetsart Journal Natural Science*. 43, 467-475.
- Strobel, G.A. & Daisy, B. (2003). Bioprocessing for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(4), 491-502. DOI: 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. & Lumyong, S. (2005). Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiology*. 151, 1691-1695. DOI:10.1099/mic0.27758-0.
- Tianpanich, K., Prachya, S., Wiyakrutta, S., Mahidol, C., Ruchirawat, S. & Kittakoop, P. (2011). Radical Scavenging and Antioxidant Activities of Isocoumarins and a Phthalide from the Endophytic Fungus *Colletotrichum* sp. *Journal of Natural Product*. 74, 79-81.
- Tomita, F. (2003). Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic diversity and potential applications. *Fungal Diversity*. 14, 187-204.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (eds). *PCR protocols* (pp. 315-322) Academic, San Diego.