

Potensi Polisakarida Kapang Endofitik *Aspergillus sp1* dari Terumbu karang Seroja kol Sebagai Sumber Antioksidan

Yoice Srikandace*

Abstrak

Kekayaan alam Indonesia yang berasal dari lautan merupakan sumber megabiodiversitas. Salah satu megabiodiversitas adalah kapang endofitik dari genus *Aspergillus* yang hidup bersimbiosis dengan biota laut. Kapang endofitik yang berasal dari biota laut belum banyak diteliti dan dieksplor potensinya, khususnya sebagai bahan pangan dan obat. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kapang endofitik dari genus *Aspergillus* yang stabil dalam hal produksi senyawa antioksidan. Kapang endofitik *Aspergillus sp1* yang bersimbiosis dengan biota laut sejenis terumbu karang Seroja kol asal Pameungpek, Garut, Jawa Barat telah berhasil diisolasi. Kapang tersebut diisolasi, dipurifikasi dan disimpan sebagai kultur dengan media Potato Dextrose Agar. Produksi polisakarida dari kapang merupakan hasil fermentasi kapang dengan menggunakan media Sabouraud Broth, dengan waktu fermentasi 14 hari pada suhu ruang dengan kecepatan 120 rpm. Polisakarida yang tersekresi dan yang berasal dari dinding sel kapang diuji aktivitas antioksidannya dengan metode 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Filtrat hasil fermentasi kapang yang diekstraksi dengan etanol 95% disebut exopolysaccharides (EPS), miselium hasil fermentasi kapang yang diekstraksi dengan air disebut water-extracted mycelial polysaccharide (WPS) dan miselium yang diekstraksi dengan sodium disebut sodium hydroxide-extracted polysaccharide (SPS). Aktivitas antioksidan yang tertinggi berasal dari ekstrak EPS dengan aktivitas sebesar 71,98% pada konsentrasi 100 µg/ml. Ekstrak WPS dan SPS dengan konsentrasi sama hanya mampu menangkal radikal bebas DPPH masing-masing sebesar 52,17 % dan 55,27 %. Selanjutnya, ekstrak EPS dipurifikasi dengan kolom Sephadex G-100, dan diidentifikasi dengan Fourier Transform Infrared Resonance (FTIR). Data spektra inframerah menunjukkan bahwa ekstrak EPS mengandung polisakarida dengan bilangan gelombang 3354 cm⁻¹ yang berkarakteristik untuk gugus fungsional hidroksil (OH), sedangkan untuk ikatan C-O dan C-H pada bilangan gelombang 2358 cm⁻¹ dan 2928 cm⁻¹. Berdasarkan hasil identifikasi molekuler dan analisis pilogenetik, *Aspergillus sp1* merupakan spesies baru dengan kemiripan 74% dengan *Aspergillus ochraceus*.

Kata-kata kunci: antioksidan, *Aspergillus*, biota laut, endofitik, pilogenetik, polisakarida

Pendahuluan

Endofitik merupakan mikroorganisme yang hidup bersimbiosis di dalam jaringan makhluk hidup yang sehat, seperti tumbuhan, hewan dan biota laut [1]. Mikroorganisme yang memiliki keanekaragaman yang tinggi dan mampu menghasilkan bioaktif metabolit, diantaranya adalah kapang karena memiliki daerah yang terkonservasi untuk identifikasi hingga ke tingkat spesies, yang disebut dengan *Internal Transcribed Spacer* (ITS) rDNA [2]. Kapang mampu menghasilkan metabolit primer (karbohidrat, protein, lemak) dan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai bahan obat dan pangan [3][4]. Metabolit primer kapang yang dapat dijadikan sebagai bahan obat atau pangan dalam penelitian ini adalah polisakarida. Dinding sel kapang banyak mengandung polisakarida yang memberikan struktur pada sel [5]. Beberapa penelitian sebelumnya menyatakan bahwa polisakarida dari *marine endophytic* memiliki aktivitas antioksidan, seperti *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4 yang diisolasi dari terumbu

karang [6], kapang *A.terreus* [7], *Aspergillus spY16* [8].

Kapang endofitik *Aspergillus* spp dari biota laut seperti sponge, rumput laut, terumbu karang dan hewan invertebrata lainnya belum banyak diketahui strains maupun bioaktivitasnya. Pada penelitian ini, endofitik *Aspergillus* spp akan diisolasi dari terumbu karang Seroja kol. Polisakarida dari *Aspergillus sp1* akan diuji aktivitas antioksidannya dengan metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH), diidentifikasi strukturnya dan diidentifikasi secara molekuler.

Eksperimen

1. Isolasi *Aspergillus sp1* dari terumbu karang Seroja kol.

Sampel terumbu karang diperoleh dari laut Pameungpeuk, Garut, Jawa Barat. Sampel dimasukkan di dalam kantong plastik yang berisi air laut, dan disimpan di dalam lemari pendingin bersuhu 4°C sebelum digunakan. Saat sampel digunakan, sampel dibilas dengan air laut steril dan dibersihkan dengan alkohol 70%. Terumbu

karang dipecahkan dengan *sterile dissection razor* menjadi bagian-bagian kecil berukuran 1-2 cm secara aseptik, dan diletakkan di atas medium isolasi Potato Dextrose Agar (PDA) yang mengandung 100 mg/L Streptomycin. Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 7-10 hari. *Aspergillus sp1* yang tumbuh, dimurnikan dan disimpan di dalam PDA *slants*.

2. Fermentasi dan ekstraksi polisakarida.

Aspergillus sp1 diremajakan di dalam media PDA *plate* selama 7 hari pada suhu ruang. Sebanyak 3 potongan miselium agar berukuran 0.5 X 0.5 cm diinokulasikan ke dalam 5 L medium Potato Dextrose Broth (PDB), difermentasikan di atas shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 14 hari pada suhu ruang. Kemudian, filtrat dan biomassa kapang dipisahkan dengan vakum filtrasi. Filtrat diekstraksi dengan etanol 95% dan dihomogenkan selama 48 jam pada suhu 4°C. Selanjutnya, disentrifuse dengan kecepatan 17000 selama 15 menit. Polisakarida yang terpresipitasi dicuci kembali dengan etanol 95%, aceton dan disentrifuse. Polisakarida yang diperoleh disebut EPS [12]. Biomassa dikeringkan, lalu ditambahkan dengan etanol 95%:petroleum eter (1:1), disentrifuse pada kecepatan 7000 rpm selama 20 menit. Biomassa (pelet) dikeringkan pada suhu 40°C, ditambahkan dengan air bersuhu 90°C selama 2 jam, disentrifuse pada kecepatan 7000 rpm selama 20 menit. Supernatan dipekatkan hingga 100 ml dengan evaporator pada suhu 60°C. Kemudian, ditambahkan dengan etanol 95%, dan dihomogenkan selama 48 jam pada suhu 4°C (WPS) dan dilanjutkan dengan proses EPS. Sedangkan biomassa hasil perlakuan sebelumnya ditambahkan dengan NaOH 10% (SPS) dan dilanjutkan dengan proses WPS [9][10].

3. Uji aktivitas antioksidan

Uji antioksidan dilakukan dengan metode DPPH. [14] dengan menggunakan mikroplate reader. Konsentrasi DPPH yang digunakan adalah 30 µg/ml, dan konsentrasi sampel 1 mg/ml. Kontrol berupa 50 µl metanol ditambah dengan 150 µl DPPH. Sebanyak 150 µl DPPH ditambah dengan 50 µl sampel dimasukkan ke dalam 96 well polystyrene microplate. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, dan absorbansi dibaca pada λ 517 nm [11]. Nilai persentase inhibisi dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs Kontrol}} \times 100$$

4. Analisis polisakarida

Polisakarida dimurnikan dengan kromatografi kolom dengan fase diam Sephadex G-100, eluen metanol 96%, metanol 50% dan air. Fraksi-fraksi yang diperoleh dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan eluen kloroform : metanol (1:1). Fraksi yang murni selanjutnya dianalisis dengan Fourier Transform Infra Red (FTIR) untuk melihat gugus fungsi [12].

5. Identifikasi molekuler.

Isolat *Aspergillus sp1* diidentifikasi secara molekular pada daerah ITS rDNA. DNA diisolasi dari DNA dan daerah ITS diamplifikasi dengan Polymerase Chain Reaction (PCR) dengan menggunakan primer ITS1 dan ITS4. Sekuen dianalisis dengan Basic Local Alligment Search Tool (BLAST) dan filogenetik dianalisis dengan metode Neighbour Joining (NJ) [2].

Hasil dan diskusi

Kapang endofitik *Aspergillus* yang berhasil diisolasi dari terumbu karang Seroja kol hanya ada 1 isolat. Kapang *Aspergillus* merupakan salah satu kapang yang paling sering ditemukan di darat, perairan maupun di biota laut dan merupakan salah satu genus yang paling banyak memiliki spesies. Terumbu karang, alga dan hewan invertebrata dan hewan vertebrata di Australia juga menemukan bahwa *Aspergillus* spp dan *Penicillium* spp merupakan genus yang paling banyak memiliki banyak strain [13]. Daerah Laut Cina Selatan juga telah menemukan dan telah mengidentifikasi strain *Aspergillus*, seperti *A. carneus*, *A. Gracilis*, *A. Nomius*, *A. Sydowii* dan *A. Sclerotiorum* [14].

Kapang *Aspergillus sp1* menghasilkan 4,11 g EPS, 1,88 g WPS dan 2.57 g SPS. Kadar polisakarida dari setiap kapang endofitik berbeda karena adanya perbedaan kemampuan menggunakan substrat yang mengandung berbagai macam sumber karbon. Polisakarida *Aspergillus sp1* mampu menangkal radikal bebas DPPH sebesar 71,98% (EPS), 52,17% (WPS) dan 55,27% (SPS). Produksi polisakarida yang aktif sebagai antioksidan dari masing-masing kapang dapat berbeda-beda. Kapang *Berkleasium Dzf12* menunjukkan polisakarida yang aktif berasal dari EPS (61,60%) dan SPS (91,51%) [11]. Polisakarida EPS dari kapang *Fusarium oxyforum Dzf17* tidak memiliki aktivitas antioksidan, sedangkan WPS dan SPS mampu menangkal radikal bebas 50% dengan konsentrasi 54,54 µg/mL dan 44,91 µg/mL [10].

Polisakarida dari *Aspergillus sp1* dilanjutkan untuk fraksinasi (Gbr1).

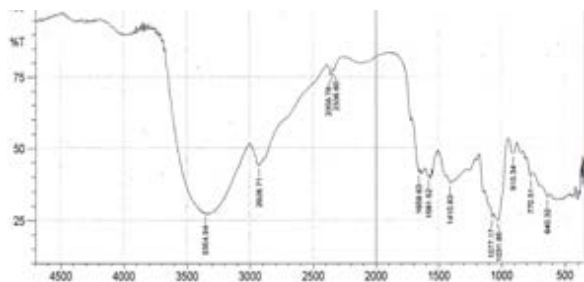
1 2 3 4 5 6 7 8 9



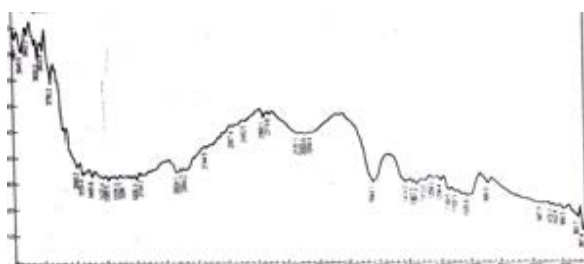
Gambar 1. Analisis KLT dengan penanda bercak Fenol-Sulfat. Line1.Std polisakarida, 2. Fr.1-EPS, 3.Fr.2-EPS, 4.Fr.3-EPS, 5.Fr.4-WPS, 6.Fr.-WPS, 7.Fr.-WPS, 8.Fr.-SPS, 9.Fr.-SPS

Pada Gambar 1. menunjukkan bahwa semua fraksi memiliki Rf yang sama dengan standar polisakarida. Fraksi-fraksi yang memiliki Rf yang sama digabung, sehingga diperoleh fraksi EPS 17,11 mg, fraksi WPS 15,27 mg, dan fraksi SPS 15,77mg. Sephadex G-100 mampu memisahkan karbohidrat dari protein dan memurnikan polisakarida.

Analisis inframerah EPS memberikan bilangan gelombang 3354 cm^{-1} yang berkarakteristik untuk gugus fungsional hidroksil (OH), sedangkan untuk ikatan C-O dan C-H pada bilangan gelombang 2358 cm^{-1} dan 2928 cm^{-1}



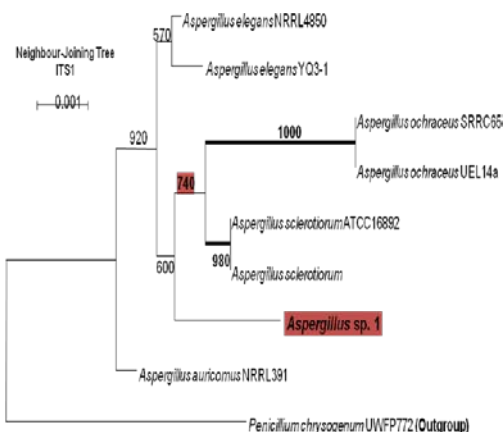
Gambar 2. Spektrum inframerah polisakarida EPS *Aspergillus sp1*.



Gambar 3. Spektrum inframerah standar polisakarida.

Hasil spektrum inframerah pada Gambar 2. dan Gambar 3. tidak menunjukkan adanya perbedaan jauh gugus fungsi antara standar dan EPS. Hal ini ditunjukkan dengan bilangan gelombang O-H, C-H, C-O antara standar dan EPS tidak berbeda jauh.

Hasil identifikasi molekular menunjukkan bahwa *Aspergillus sp1* memiliki homologi 74% dengan *A.ochraceus*. Pada Gambar 4. Terlihat bahwa *Aspergillus sp1* merupakan strain baru yang berkerabat dekat dengan *A.ochraceus* dan *A. sclerotiorum* dan berkerabat jauh dengan *A.elegans* dan *A.auricomus*. Isolat *Aspergillus sp1* memiliki daerah ITS yang lebih bervariasi dibandingkan daerah ITS *Aspergillus* lain, akan tetapi masih terdapat juga variasi pada daerah 18S,5.8S dan 28S jika dibandingkan dengan *Aspergillus* lainnya.



Gambar 4. Pohon filogenetik *Aspergillus sp1*.

Aspergillus spp memiliki daerah sekuen yang terkonservasi daripada daerah ITS1 dan ITS2 [15]. Variasi daerah ITS dapat mengidentifikasi suatu mikroorganisme (kapang) sampai tingkat spesies [16].

Kesimpulan

Kapang endofitik *Aspergillus sp1* mampu menghasilkan polisakarida yang berpotensi sebagai bahan antioksidan. Aktivitas antioksidan polisakarida EPS, WPS dan SPS berturut-turut adalah 71,98%, 52,17% dan 55,27%. Berdasarkan identifikasi molekular *Aspergillus sp1* berkerabat dekat dengan *A.ochraceus* dengan homologi sebesar 74% dan merupakan strain baru

Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih atas dana DIPA-LIPI P2 Kimia 2015 dan fasilitas dari P2 Kimia Bandung dan Serpong. Penulis juga berterima kasih kepada Dr. Zalarin Udin yang telah memberikan dukungan dan saran dalam penelitian dan penulisan makalah ini.

Referensi

- [1] A.L.L. Oliveira, R.Felicio and H.M. Deboni, "Review: Marine natural product: chemical and biological of seaweeds and their endophytic fungi," *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(4), 904-920 (2012)
- [2] C.L. Schoch, K.A. Seifert, S. Huhndorf, V.Robert, J.L. Spouge, C.L. Levesque and W. Chen, "Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi," *PNAS open access* 109, 6241-6246 (2011)
- [3] S. Mahapatra and D. Banerjee, "Review: Fungal exopolysaccharide: Production, composition and application," *Microbiology insights* 6, 1-16 (2013)
- [4] S. Kusari, C. Herweck and M. Spiteller, "Chemical ecology of endophytic fungi: Origin of secondary metabolites," *Chemistry and Biology* 19, 792-799 (2012)
- [5] A. Gastebois, C. Clavaud, V. Aïmanianda and J.P. Latge, "*Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization," *Future Microbiology* 4(5), 583-595 (2009)
- [6] Y. Chen, W. Mao, Y. Yang, X. Teng, W. Zhu, X. Qi, C. Zhao, Y. Hou, C. Wang, N. Li, "Structure and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide from coral associated fungus *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4," *Carbohydrate polymer* 87(1), 218-226 (2012)
- [7] C. Wang, W. Mao, Z. Chen, W. Zhu, Y. Chen, C. Zhao, N. Li, M. Yan, X. Liu and T. Guo, "Purification, structural characterization and antioxidant property of an extracellular polysaccharide from *Aspergillus terreus*," *Process Biochemistry* 48(9), 1395-1401 (2013)
- [8] Y. Chen, W. Mao, H. Tao, W. Zhu, X. Qi, H. Li, C. Zhao, Y. Yang, Y. Hou, C. Wang and N. Li, "Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus spY16*," *Bioresource Technology* 102(17), 8179-8184 (2011)
- [9] P. Li, L. Xu, Y. Mou, T. Shan, Z. Mao, S. Lu, Y. Peng and L. Zhou, "Medium optimization for exopolysaccharide production in liquid culture of endophytic fungus *Berkleasium spDzf12*," *International Journal of Molecular Science* 13, 11411-11426 (2012)
- [10] P. Li, S. Lu, T. Shan, Y. Mou, Y. Li, W. Sun and L. Zhou, "Extraction optimization of water-extracted mycelial polysaccharide from endophytic fungus *Fusarium oxyporum* Dzf17 by response surface methodology," *International Journal of Molecular Science* 13, 5441-5453 (2012)
- [11] P. Li, W. Sun, C. Luo, T. Shan, Y. Mou, S. Lu, Z. Mao and L. Zhou, "In vitro evaluation of antioxidant activity of polysaccharides endophytic fungus *Berkleasium Dzf12*," *African Journal of Microbiology Research* 6(2), 471-477 (2012)
- [12] C.W. Huie and X. Di, "Chromatographic and electrophoretic methods for LingZhi pharmacologically active components," *Journal of Chromatography B* 812, 241-257 (2004)
- [13] S.M. Gardiner, "Dominant fungi from Australian coral reefs," *Fungal diversity* 1, 106-121 (2001)
- [14] X. Zhang, J. Bao, G. Wang, F. He, X. Xu, S. Qi, "Diversity and antimicrobial activity of culturable fungi isolated from six species of The South China Sea Gorgonians," *Microbiology Ecology* 64, 617-627 (2012)
- [15] T. Henry, P.C. Iwen, and S.H. Hinrichs, "Identification of *Aspergillus* species using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2," *Journal of clinical microbiology* 38(4), 1510-1515 (2000)
- [16] J. Zhao, F. Kong, R. Li, X. Wang, Z. Wan and D. Wang, "Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions," *Journal of Clinical Microbiology* 39(6), 2261-2266 (2001)

Yoice Srikandace*
Pusat Penelitian Kimia-LIPI Bandung
Bahan Baku Obat
yoice_srikandace@yahoo.co.id

*Corresponding author