

PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIJAMUR *Bacillus amyloliquefaciens* STRAIN N1
[ASSESSMENT ON ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Bacillus amyloliquefaciens* STRAIN N1]

Juandy Jo^{1*}, Sara Thalia Subroto², Hans Victor³, Astia Sanjaya⁴
^{1,2,3,4}Program Studi Biologi, Universitas Pelita Harapan, Tangerang, Indonesia
*Korespondensi penulis: juandy.jo@uph.edu

ABSTRACT

The negative impact of fungal contamination in food products is profound. The contamination could be caused by fungi that threatens human health as well. Effective and safe antifungal compounds therefore are crucial to control this issue. It had been reported that certain strains of Bacillus amyloliquefaciens exerted an antifungal activity. As a strain of Bacillus amyloliquefaciens (called strain N1) had been isolated by our laboratory from a chicken gizzard, we investigated whether this strain had an antifungal activity as well. Two species of fungi, i.e., Aspergillus welwitschiae and Penicillium sp., were utilized as the target in the whole-cell co-culture method. The result showed that Bacillus amyloliquefaciens strain N1 significantly inhibited the growth of Aspergillus welwitschiae and Penicillium sp. (percentages of inhibition were 73.3% and 100%, respectively). Next, with the availability of whole genome data of Bacillus amyloliquefaciens strain N1, the bioinformatic analyses with RAST and nucleotide BLAST database suggested that Bacillus amyloliquefaciens strain N1 could secrete antifungal compounds of bacillomycin D, surfactin and fengycin. In conclusion, Bacillus amyloliquefaciens strain N1 has a potential to be further utilized due to the presence of its antifungal activity.

Keywords: *antifungal; Aspergillus welwitschiae; Bacillus amyloliquefaciens strain N1; bioinformatic analyses; Penicillium sp.*

ABSTRAK

Dewasa ini, permasalahan kontaminasi pada produk makanan banyak ditemukan. Kontaminasi ini dapat disebabkan, salah satunya oleh jamur yang dapat mengancam kesehatan manusia. Oleh karena itu, senyawa antijamur yang efektif dan aman dibutuhkan untuk mengendalikan permasalahan ini. Berdasarkan penelitian terdahulu, strain tertentu dari bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* diketahui memiliki aktivitas antijamur. Pada penelitian ini, isolat bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* strain N1 yang berhasil diisolasi dari tembolok ayam oleh laboratorium Program Studi Biologi Universitas Pelita Harapan diteliti kemampuan aktivitas antijamurnya. Dua spesies jamur, *Aspergillus welwitschiae* dan *Penicillium* sp. dipergunakan sebagai target dalam percobaan dengan metode *whole-cell co-culture*. Hasil percobaan menunjukkan bahwa *Bacillus amyloliquefaciens* strain N1 menghambat pertumbuhan *Aspergillus welwitschiae* dan *Penicillium* sp. masing-masing sebesar 73,3% dan 100%. Percobaan selanjutnya adalah analisis bioinformatika dengan RAST dan *nucleotide BLAST database* berhubung tersedianya data *whole genome* dari *Bacillus amyloliquefaciens* strain N1, dimana ditunjukkan kemungkinan bahwa senyawa antijamur yang dihasilkan adalah bacillomycin D, surfactin dan fengycin. Kesimpulan kami adalah bahwa *Bacillus amyloliquefaciens* strain N1 memiliki potensi untuk dipergunakan lebih lanjut berkat aktivitas antijamurnya.

Kata kunci: *analisis bioinformatika; antijamur; Aspergillus welwitschiae; Bacillus amyloliquefaciens strain N1; Penicillium sp.*

PENDAHULUAN

Jamur merupakan mikroorganisme yang ditemukan melimpah di alam dan di berbagai zona geografis. Namun, infeksi atau kontaminasi jamur menimbulkan dampak buruk, baik untuk kesehatan maupun untuk makanan (Radi *et al.*, 2017). Oleh karena itu, dibutuhkan adanya senyawa-senyawa antijamur yang efektif dan aman dalam mengendalikan atau mencegah infeksi ataupun kontaminasi jamur (Nett & Andes, 2016).

Bakteri merupakan salah satu kandidat senyawa antijamur yang sering diteliti (Damayanti *et al.*, 2015). Salah satu tipe bakteri yang diketahui memiliki senyawa antijamur adalah bakteri-bakteri dari genus *Bacillus*, salah satunya *Bacillus amyloliquefaciens* (*B. amyloliquefaciens*) (Kim *et al.*, 2017). Berdasarkan penelitian, strain dari *B. amyloliquefaciens* dilaporkan memiliki aktivitas antijamur (Lee *et al.*, 2017; Li *et al.* 2016).

Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk menguji aktivitas antijamur dari koleksi bakteri *B. amyloliquefaciens* strain N1 Laboratorium Program Studi Biologi Universitas Pelita Harapan yang berhasil diisolasi dari tembolok ayam.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Isolat bakteri yang dipergunakan adalah *B. amyloliquefaciens* strain N1. Isolat jamur yang dipergunakan adalah *Aspergillus welwitschiae* dan *Penicillium* sp. Bahan yang dipergunakan adalah agar bacteriological (Himedia, India), kentang, D+glucose (Merck, Jerman), de Man Rogosa and Sharpe broth (Merck, Jerman), serta Luria Bertani Broth (Condalab, Spanyol).

Metode Penelitian

Uji Aktivitas Antijamur

Bakteri *B. amyloliquefaciens* strain N1 ditumbuhkan di agar Luria Bertani pada suhu 37 °C. Jamur *Aspergillus welwitschiae* dan *Penicillium* sp. ditumbuhkan di *Potato-Dextrose Agar* (PDA) pada suhu 25 °C. Setelah koloni tunggal didapatkan, bakteri dan jamur ditumbuhkan ulang di medium baru (subkultur). Kemudian bakteri *B. amyloliquefaciens* strain N1 diinkubasi selama satu hari, sementara *Aspergillus welwitschiae* dan *Penicillium* sp. diinkubasi selama tujuh hari (Mardanova *et al.* 2017).

Pada penelitian ini juga dilakukan pengujian zona inhibisi pertumbuhan jamur secara kualitatif menggunakan metode *whole-cell co-culture*. Pada metode ini, koloni bakteri dan koloni

jamur dengan diameter 6 mm diambil dan diletakkan dalam cawan petri berisikan PDA dengan jarak tiga sentimeter antara koloni bakteri dan jamur. Selanjutnya, dilakukan inkubasi pada suhu 30 °C selama tujuh hari (Mardanova *et al.* 2017). Kontrol negatif yang digunakan untuk pengujian ini cawan petri PDA yang hanya berisikan koloni jamur. Setelah inkubasi selama tujuh hari selesai, zona inhibisi dilakukan diukur dan dibandingkan dengan kontrol negatif. Selanjutnya, hasil pengukuran digunakan untuk menghitung persentase inhibisi berdasarkan rumus berikut:

$$\text{Persen inhibisi (\%)} = \frac{R - r}{R} \times 100$$

Keterangan:

R = jari-jari pertumbuhan jamur pada kontrol negatif.

r = jari-jari pertumbuhan jamur pada *co-culture*.

Identifikasi Gen Antijamur

Whole-genome sequencing dari *B. amyloliquefaciens* strain N1 telah dilakukan Laboratorium Program Studi Biologi Universitas Pelita Harapan (*manuscript in submission*). Selanjutnya, dilakukan analisis bioinformatika berdasarkan data *whole genome* yang diperoleh untuk mengidentifikasi kandidat gen yang terlibat dalam aktivitas antijamur dari *B. amyloliquefaciens* strain N1. Analisis ini dilakukan menggunakan data *whole genome* dari *B. amyloliquefaciens*

strain WF02 (NZ_CP053376) sebagai *genome reference*.

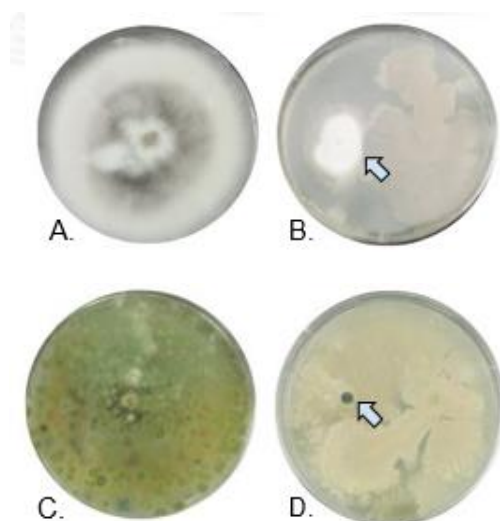
Proses identifikasi dilakukan menggunakan dua metode. Pertama, data genom dengan format FASTA dari *B. amyloliquefaciens* strain N1 dimasukkan ke dalam *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) database (<https://rast.nmpdr.org/>) untuk mengidentifikasi/menganotasi genom. Anotasi genom yang dilakukan mencakup identifikasi gen pengkode protein, gen rRNA dan gen tRNA.

Kedua, genom *B. amyloliquefaciens* strain N1 dianalisis dengan *nucleotide BLAST database* (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) untuk mengidentifikasi kandidat gen yang dapat menghasilkan senyawa antijamur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Aktivitas Antijamur

Uji aktivitas antijamur dilakukan dengan metode *whole-cell co-culture* antara *B. amyloliquefaciens* strain N1 dengan kedua target jamur. Parameter yang diukur adalah jari-jari dari pertumbuhan jamur. Gambar 1 adalah gambar representatif dari uji aktivitas antijamur tersebut. Hasil pengukuran jari-jari pertumbuhan jamur dan perhitungan persentase inhibisi disajikan di Tabel 1.



Gambar 1. Gambar representatif dari *whole-cell co-culture* *B. amyloliquefaciens* strain N1 dengan *Aspergillus welwitschiae* atau *Penicillium* sp. Lokasi *B. amyloliquefaciens* strain N1 (N1) selalu di sebelah kanan di panel B dan D. A: *Aspergillus welwitschiae* sebagai kontrol negatif; B: N1 dengan *Aspergillus welwitschiae*; C: *Penicillium* sp. sebagai kontrol negatif; D: N1 dengan *Penicillium* sp. Anak panah menunjukkan pertumbuhan jamur yang terhambat atau zona inhibisi yang terbentuk.

Identifikasi Gen Antijamur

Berdasarkan hasil metode *whole-cell co-culture* yang menunjukkan adanya aktivitas antijamur dari *B. amyloliquefaciens* strain N1, maka selanjutnya dilakukan analisis bioinformatika untuk mengidentifikasi kandidat gen dalam genom *B. amyloliquefaciens* strain N1 yang menghasilkan senyawa antijamur. Analisis ini dilakukan dengan menggunakan data *whole-genome sequencing* *B. amyloliquefaciens* strain N1 yang telah dilakukan oleh Laboratorium Program Studi Biologi Universitas Pelita Harapan sebelumnya (*manuscript in submission*).

Tabel 1. Hasil pengukuran jari-jari pertumbuhan jamur dan perhitungan persentase inhibisi pertumbuhan jamur pada berbagai kondisi

Kondisi	Jari-Jari Pertumbuhan Jamur (cm)			% Inhibisi
	I	II	III	
<i>Aspergillus welwitschiae</i> (kontrol negatif)	4,5	-	-	0%
<i>Aspergillus welwitschiae</i> + N1	0,8	1,8	1	73,3%
<i>Penicillium</i> sp. (kontrol negatif)	4,5	-	-	0%
<i>Penicillium</i> sp. + N1	0	0	-	100%

Keterangan: kondisi pertama dan ketiga dilakukan masing-masing sekali. Kondisi kedua diulang sebanyak 3 kali. Kondisi keempat diulang sebanyak 2 kali. N1, *B. amyloliquefaciens* strain N1. Angka romawi dalam kolom jari-jari pertumbuhan menunjukkan jumlah pengulangan.

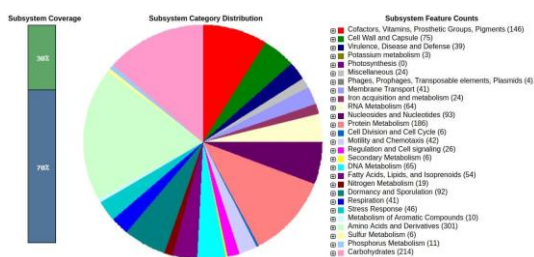
Tabel 1 menunjukkan bahwa *B. amyloliquefaciens* strain N1 memiliki aktivitas antijamur yang dibuktikan dengan terjadinya aktivitas penghambatan pertumbuhan jamur *Aspergillus welwitschiae* dan *Penicillium* sp. secara signifikan. Persentase inhibisi pertumbuhan *Aspergillus welwitschiae* dan *Penicillium* sp. adalah sebesar 73,3% dan 100%.

Analisis dengan RAST *database* pertamanya memberikan informasi umum terkait genom *B. amyloliquefaciens* strain N1. Hasil analisis ini dapat dilihat pada Tabel 2. Gambar 2 menampilkan pengelompokan gen-gen dari *B. amyloliquefaciens* strain N1 berdasarkan subsistem yang teranotasi.

Namun, kandidat gen antijamur tidak ditemukan.

Tabel 2. Informasi umum dari genom *B. amyloliquefaciens* strain N1

Indikator	<i>B. amyloliquefaciens</i> strain N1
Ukuran	3.900.964 <i>basepairs</i>
Persentase GC	46,5 %
Jumlah <i>coding sequence</i>	3.929 <i>basepairs</i>
Jumlah RNAs	90



Gambar 2. Data subsistem dari genom *B. amyloliquefaciens* strain N1.

Analisis selanjutnya dengan *nucleotide BLAST database* menunjukkan adanya beberapa kandidat gen antijamur di dalam genom *B. amyloliquefaciens* strain N1, sebagaimana ditampilkan dalam Tabel 3. Tiga keluarga gen penghasil senyawa antijamur yang teridentifikasi adalah bacillomycin D, surfactin dan fengcyn. Ketiga senyawa yang tergolong *cyclic lipopeptide* tersebut bekerja dengan mengganggu fungsi membran dan menimbulkan kebocoran pada sel jamur sehingga ion kalium keluar dari dalam sel, yang akhirnya menimbulkan kematian sel jamur. Cara kerja ini merupakan cara kerja

obat antijamur golongan polien (Nett & Andes, 2016).

Secara lebih mendalam, *bacillomycin D* merupakan kandidat kuat dari senyawa antijamur yang dihasilkan *B. amyloliquefaciens* strain N1, berdasarkan tingginya nilai *query cover* dan *identity percentage* di Tabel 3. Informasi penting lainnya adalah ditemukannya regulator transkripsi gen bacillomycin D (gen *degU*, *degS* dan *comA*) dan gen pengkode protein *Kdgc* yang berfungsi sebagai *protein transmembrane* untuk mengekspresikan bacillomycin D (Koumoutsis *et al.*, 2007) di genom *B. amyloliquefaciens* strain N1.

Selain bacillomycin D, genom *B. amyloliquefaciens* strain N1 juga memiliki gen penghasil surfactin dan fengcyn. Surfactin berguna untuk meningkatkan daya tahan bakteri tersebut dengan menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur (Vitullo *et al.*, 2012; Meena & Kanwar, 2015; Sarwar *et al.*, 2018).

Fengcyn sendiri merupakan agen fungisida yang disintesis oleh *Bacillus* spp. dan umum dipergunakan dalam pertanian (Tao *et al.*, 2011). Nilai *query cover* dan *identity percentage* untuk kedua kelompok gen tersebut juga tinggi (Tabel 3). Perlu diutarakan bahwa penelitian ini tidak menemukan adanya senyawa antijamur lainnya yang dapat dihasilkan oleh *B. amyloliquefaciens* strain N1.

Tabel 3. Hasil *nucleotide BLAST B. amyloliquefaciens* N1 pada gen pengkode komponen antijamur

Sekuen Pembanding	Fungsi	Query Cover	Identity Percentage
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain GYL4 bacillomycin D synthetase A (<i>bmyA</i>) gene, partial cds		100	98,41
UNVERIFIED: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain MH71 <i>BmyB</i> -like gene, partial sequence	Gene cluster Bacillomycin D	99	93,51
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain GYL4 bacillomycin D synthetase C (<i>bmyC</i>) gene, partial cds		100	98,1
<i>Bacillus subtilis</i> strain BS6 <i>BmyD</i> (<i>bmyD</i>) gene, partial cds		100	95,13
degU – two-component system response regulator <i>DegU</i>		100	100
degS – two-component system response regulator <i>DegS</i>	Regulator transkripsi untuk ekspresi gen Bacillomycin D	100	99,66
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (<i>comA</i> gene)		100	99,07
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>kdg</i> gene for KdgK protein	Protein transmembran untuk ekspresi Bacillomycin D	98	97,24
Surfactin non-ribosomal peptide synthetase <i>SrfAA</i> [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]		100	98,52
Surfactin non-ribosomal peptide synthetase <i>SrfAB</i> [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]		100	98,57
Surfactin non-ribosomal peptide synthetase <i>SrfAC</i> [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]	Gene cluster Surfactin	100	99,22
Surfactin non-ribosomal peptide synthetase <i>SrfAD</i> [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>]		100	98,50
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain SYBC H47 <i>FenA</i> gene, complete cds		100	99,01
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain SYBC H47 <i>FenB</i> gene, complete cds		100	99,43
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain SYBC H47 <i>FenC</i> gene, complete cds	Gene cluster Fengycin	100	98,63
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain SYBC H47 <i>FenD</i> gene, complete cds		100	97,95
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain SYBC H47 <i>FenE</i> gene, complete cds		100	98,76

Sebagai contoh, bacillibactin merupakan senyawa antijamur, dalam kombinasi dengan surfactin dan fengcyn, yang dihasilkan oleh gen *dhb* dari *Bacillus valesensis* (Rabbee dan Baik, 2020). Akan tetapi, analisis RAST dan *nucleotide BLAST database* menunjukkan bahwa genom *B. amyloliquefaciens* strain N1 tidak memiliki gen *dhb* (data tidak ditampilkan).

KESIMPULAN

Hasil penelitian kami mendukung kemungkinan bahwa isolat *Bacillus amyloliquefaciens* strain N1 yang dimiliki Laboratorium Program Studi Biologi Universitas Pelita Harapan memiliki aktivitas antijamur, berdasarkan percobaan *whole-cell co-culture* terhadap jamur *Aspergillus welwitschiae* dan *Penicillium* sp. Analisis bioinformatika yang dilakukan pada data *whole genome* dari *B. amyloliquefaciens* strain N1 mengidentifikasi 3 kelompok gen antijamur, yaitu bacillomycin D, surfactin dan fengcyn. Oleh karena itu, *Bacillus amyloliquefaciens* strain N1 memiliki potensi untuk dipergunakan lebih lanjut berkat aktivitas antijamurnya.

SARAN

Penelitian lanjutan yang dapat dilakukan adalah dengan menggunakan metode *cell-free supernatant* untuk memastikan adanya aktivitas antijamur.

Penelitian berikut yang dapat dilakukan adalah mengidentifikasi senyawa antijamur dari *supernatant* kultur bakteri dengan menggunakan *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry* (LC-MS).

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami berterima kasih kepada Dr. Reinhard Pinontoan, Dr. Ellen Tanudjaja, Steven Tan, S.Si. serta Dikson, S.Si. yang telah mengisolasi *Bacillus amyloliquefaciens* strain N1, mengekstraksi DNA serta melakukan *whole-genome sequencing* pada bakteri tersebut. Kami juga berterima kasih kepada Suawa Natania Abigail Christy, S.Si. yang memberikan masukan berharga terkait penulisan artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Damayanti, E., Suryani, A.E., Sofyan, A., Karimy, M.F., & Julendra, H. (2015). Seleksi Bakteri Asam Laktat dengan Aktivitas Anti Jamur yang Diisolasi dari Silase dan Saluran Cerna Ternak (Isolation of Lactic Acid Bacteria for Antifungal Activity Isolated from Silage and Animal Digestives Tract). *Jurnal Agritech*, 35(02), 164. <https://doi.org/10.22146/agritech.9402>
- Kim, M.J., Radhakrishnan, R., Kang, S.M., You, Y.H., Jeong, E.J., Kim, J.G., & Lee, I.J. (2017). Plant Growth Promoting Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* H-2-5 on Crop Plants and Influence on Physiological Changes in Soybean under Soil Salinity. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3), 571–80. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0449-4>

- \Koumoutsis, A., Chen, X.H., Vater, J., & Borriss, R. (2007). DegU and YczE Positively Regulate the Synthesis of Bacillomycin D by *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6953–64. <https://doi.org/10.1128/AEM.00565-07>
- Lee, T., Park, D., Kim, K. Lim, S.M., Yu, N.H., Kim, S., Kim, H.Y., Jung, K.S., Jang, J.Y., Park, J.C., Ham, H., Lee, S., Hong, S.K., & Kim, J.C. (2017). Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* DA12 Showing Potent Antifungal Activity against Mycotoxigenic Fusarium Species. *Plant Pathology Journal*, 33(5), 499–507. <https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.06.2017.0126>
- Li, X., Zhang, Y., Wei, Z., Guan, Z., Cai, Y., & Liao, X. 2016. Antifungal Activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the Biocontrol of Peach Gummosis. *PLoS ONE*, 11(9), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162125>
- Mardanov, A.M., Hadieva, G.F., Lutfullin, M.T., Khilyas, I.V., Minnullina, L.F., Gilyazeva, A.G., Bogomolnaya, L.M., & Sharipova, M.R. (2017). *Bacillus subtilis* Strains with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi. *Agricultural Sciences*, 08(01), 1–20. <http://dx.doi.org/10.4236/as.2017.81001>
- Meena, K.R., & Kanwar, S.S. 2015. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents. *BioMed Research International*, 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/473050>
- Nett, J.E., & Andes, D.R. (2016). Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), 51–83. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.012>
- Rabbee, M.F., & Baek, K.H. (2020). Antimicrobial Activities of Lipopeptides and Polyketides of *Bacillus velezensis* for Agricultural Applications. *Molecules*, 25(21). <https://doi.org/10.3390/molecules25214973>
- Radi, N.A.M., Abdelmonem, A.A., & Ziada, A.A. (2017). A Study on the Antifungal Effects of *Lactobacillus* Spp. on Candida Species. *The Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 26(3), 25–29.
- Sarwar, A., Hassan, M.N., Imran, M., Iqbal, M., Majeed, S., Brader, G., Sessitsch, A., & Hafeez, F.Y. (2018). Biocontrol Activity of Surfactin A Purified from Bacillus NH-100 and NH-217 against Rice Bakanae Disease. *Microbiological Research*, 209, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.006>
- Tao, Y., Bie, X., Lv, F., Zhao, H., & Lu, Z. (2011). Antifungal Activity and Mechanism of Fengycin in the Presence and Absence of Commercial Surfactin Against *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Microbiology*, 49(1), 146–50. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0171-9>
- Vitullo, D., Di Pietro, A., Romano, A., Lanzotti, V., & Lima, G. (2012). Role of New Bacterial Surfactins in the Antifungal Interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, 61(4), 689–99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02561.x>