

Identifikasi Molekuler Kapang Asosiasi Spons menggunakan Metode DNA Barcoding

Stefanie Jessica Henny Larasati, Agus Sabdono, Mada Triandala Sibero*

Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto S.H, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia

*Corresponding author, e-mail : madatriandalasibero@lecturer.undip.ac.id

ABSTRAK: Spons merupakan organisme yang memiliki pori-pori dan termasuk kedalam filum Porifera. Hewan ini merupakan *filter feeders* dimana spons menyaring makanannya masuk kedalam rongga tubuhnya, sehingga spons dapat memakan partikel organik seperti algae, dan mikroba, termasuk kapang. Kapang merupakan mikroorganisme eukariotik dari kingdom fungi, multiseluler, menghasilkan miselium tanpa pembentukan badan buah. Kapang dapat berfungsi sebagai penjaga keseimbangan ekosistem di perairan. Tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi dua isolat kapang yang telah diisolasi dari inang spons di ekosistem mangrove dengan menggunakan DNA barcoding. Metode dalam penelitian ini yaitu peremajaan isolat, karakterisasi morfologi yaitu warna koloni, tekstur, *reverse*, *exudates*, *sclerotia*, bentuk konidia, konidiofor, spora, dan septa. Identifikasi molekuler dari ekstraksi DNA, amplifikasi, elektroforesis, visualisasi DNA, sekuensing dan BLAST. Optimasi suhu *annealing* dilakukan pada amplifikasi DNA. Berdasarkan identifikasi molekuler dengan menggunakan primer universal (ITS1 dan ITS4) dan persamaan homologi, isolat MKMS 2.1 merupakan *Trichoderma reesei* (100%) dan PKMS 2.2 merupakan spesies *Fusarium solani* (99,81%).

Kata kunci: DNA Barcoding; Kapang; PCR; Spons

Molecular Identification of Sponge-associated Fungi using DNA Barcoding Methods

ABSTRACT: *Sponge is an organism that has pores and belongs to the Porifera phylum. This animal is a filter feeder where the sponge filters its food into the body cavity, so the sponge can eat organic algae particles, and microbes, including mold. Mold is a eukaryotic microorganism from Fungi kingdom, multicellular, that forms mycelium without fruiting body formation. Mold has an important role in balancing the environmental quality in an ecosystem. The purpose of this study was to identify two molds that had been isolated from sponge in the mangrove ecosystem using DNA barcoding. The methods in this research were isolation refreshment, morphological characterization which were consisted of colony color, texture, reverse, exudates, sclerotia, conidia, conidiophores, spores, and septa. Molecular identification consisted of DNA extraction, amplification, electrophoresis, DNA visualization, sequences and BLAST. Annealing temperature optimization is carried out on DNA amplification. Based on molecular identification using universal primers (ITS1 and ITS4) and homological equations, MKMS 2.1 isolates were identified as Trichoderma reesei (100%) and PKMS 2.2 were identified as Fusarium solani (99.81%).*

Keywords: DNA Barcoding; Fungi; PCR; Sponge

PENDAHULUAN

Spons merupakan salah satu invertebrata laut filum Porifera yang memiliki rongga dan struktur tubuhnya masih sangat sederhana. Spons hidup di lingkungan pesisir dan laut dalam. Spons merupakan salah satu invertebrata yang diketahui memiliki peran penting dalam siklus nitrogen, silika, dan karbon; pembentuk ekosistem terumbu karang; pengkonversi *dissolved organic matter* (DOM) menjadi *particulate organic matter* (POM); hingga menjadi *bioeroders* (Bell, 2008; FAO, 2017). Spons merupakan hewan *sessile* karena sebagian besar spons hidup menetap pada substrat, bersifat *filter feeder*, dan diketahui menghasilkan berbagai *chemical substances* sebagai

bentuk pertahanan diri dari predator (Burns *et al.*, 2003). Bentuk pertahanan diri dari predator juga dapat melalui mikroba simbiosis yang menetap pada tubuh spons (Thoms *et al.*, 2007). Mikroba yang berasosiasi dengan inangnya memiliki fungsi ekologis yang dapat berkontribusi untuk kelangsungan hidup mikroba itu sendiri maupun untuk inangnya. Oleh karena itu perlu diketahui keanekaragaman kapang yang berasosiasi dengan spons.

Kapang merupakan mikroorganisme multiseluler berfilamen dan membentuk miselium (Miranti *et al.*, 2015). Kapang berasal dari kingdom fungi yang tidak membentuk badan buah, berukuran mikroskopis, dan bersifat heterotrof karena kapang memperoleh makanan dengan cara menyerap nutrisi dari inang asosiasinya (Richards *et al.*, 2012). Mikroorganisme ini mempunyai peran penting di perairan. Kapang berperan dalam menjaga keseimbangan ekosistem di perairan. Proses dekomposisi yang sangat kompleks dan rumit di laut membutuhkan peranan mikroorganisme, salah satunya adalah kapang. Kapang dapat membantu proses degradasi serasah dan batang mangrove karena kapang menghasilkan selulase (Anindyawati, 2010). Kapang berperan dalam melakukan penguraian lignin dan selulosa (Kunarso, 1988). Selain itu, kapang juga hidup berasosiasi dengan organisme laut.

Sebagai mikroorganisme, proses identifikasi kapang secara morfologi sudah dianggap tidak terlalu efektif karena organisme ini bersifat *cryptic* karena sangat susah untuk membedakan antar spesies jika hanya menggunakan pendekatan morfologi (Sibero *et al.*, 2018). Salah satu cara untuk meningkatkan keakuratan identifikasi adalah menggunakan pendekatan DNA *barcoding*. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengidentifikasi dua kapang asosiasi spons asal ekosistem mangrove di Karimunjawa yang menjadi koleksi *Sibero Project, Laboratory of Natural Product, Undip*.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium *Tropical Marine Biotechnology* Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro pada bulan Mei-Juni 2019. Pengolahan data serta analisa sampel dari hasil penelitian dilaksanakan pada Juni-Juli 2019.

Peremajaan Isolat

Stok kapang yang tersimpan pada gliserol dilakukan peremajaan pada cawan petri dengan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) kemudian dilakukan inkubasi selama 7 x 24 jam (Gobalakrishnan & Bhuvaneshwari, 2019).

Identifikasi Makroskopik dan Mikroskopik

Kapang berfilamen diidentifikasi berdasarkan karakteristik makroskopis (kolonial) dan mikroskopisnya. Deskripsi kolonial termasuk karakteristik koloni seperti warna, tekstur, margin, ketinggian dan karakteristik hifa udara. Teknik *slide culture* dari Sibero *et al.* (2017) digunakan untuk pemeriksaan mikroskopis isolat kapang yang mencakup morfologi spora, warna, bentuk, ornamen atau tekstur dinding, ukuran, pembentukan konidia dan karakteristik terkait lainnya seperti pola phialide dan konidiasi. Deskripsi kapang di MycoBank (www.mycobank.com) digunakan sebagai panduan untuk identifikasi lebih lanjut dari isolat kapang.

Ekstraksi DNA

Metode chelex dimulai dengan mengisolasi DNA dengan metode saponin (Sibero *et al.* 2018). Miselia kapang diambil dan dimasukkan ke dalam microtube steril dan ditambahkan 1 mL saponin dan 100 μ L d_2O dan PBS, kemudian disimpan pada suhu 4 °C selama 24 jam.

Sampel microtube dicuci dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 12.000 r.p.m. selama 10 menit, selanjutnya supernatannya dibuang dan ditambahkan d_2O steril yang baru kemudian dicampur menggunakan *vortex*. Proses ini dilakukan sebanyak 2-3 kali dengan tujuan menghilangkan residu saponin. Pelet yang diperoleh dari hasil pencucian selanjutnya ditambahkan 100 μ L Chelex 100 20% kemudian dipanaskan menggunakan *heating block* pada suhu 85 °C selama 5 menit kemudian dicampur lagi menggunakan *vortex* lalu disentrifugasi kembali selama 5 menit. Sampel kembali dipanaskan lagi dengan suhu dan waktu yang sama dan disentrifugasi.

Amplifikasi DNA

DNA kapang yang telah diisolasi selanjutnya diamplifikasi secara *in vitro* menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) (Sibero *et al.*, 2018). Campuran PCR yang digunakan terdiri atas 12.5 μL PCR *mix master*, 1 μL primer *forward* (ITS1), 1 μL primer *reverse* (ITS4), 1 μL DNA kapang dan 9.5 μL d_2O steril sehingga volume maksimal PCR tube adalah 25 μL . Protokol kondisi PCR untuk amplifikasi DNA akan sebanyak 30 kali siklus, yang terdiri atas: denaturasi DNA: 95 °C, selama 1 menit; *annealing* : suhu optimasi, selama 1 menit; ekstensi : 72 °C, selama 1 menit

Pengecekan Kualitas Produk PCR

Pengecekan kualitas produk PCR dilakukan menggunakan elektroforesis dengan *buffer* Tris base, asam asetat dan EDTA (TAE) 1X. Agarose direndam di dalam larutan pewarna *ethidium bromide* (Etbr) selama 30 menit. Agarose selanjutnya dimasukkan ke dalam *gel documentation* untuk disinari dengan lampu UV. Sampel dengan *band* DNA selanjutnya dikirim untuk disekuensing (Sibero *et al.*, 2018). Tahapan sekuensing dilakukan oleh 1st Base Malaysia.

Analisis Sekuens dan Pembuatan Pohon Filogenetik

Sekuens yang diperoleh selanjutnya diolah menggunakan *software* MEGA X. Untuk mengetahui spesies kapang maka sekuens yang diterima dari 1st Base Malaysia dicocokkan pada pangkalan data di *GenBank* menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yang terdapat di <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Pohon filogenetik dilakukan dengan cara mensejajarkan seluruh sekuens dan sekuens pembandingnya. Analisis algoritma dilakukan menggunakan metode *Neighbor Joining* (NJ) kemudian pengujian dilakukan dengan nilai *bootstrap* 10000 kali.

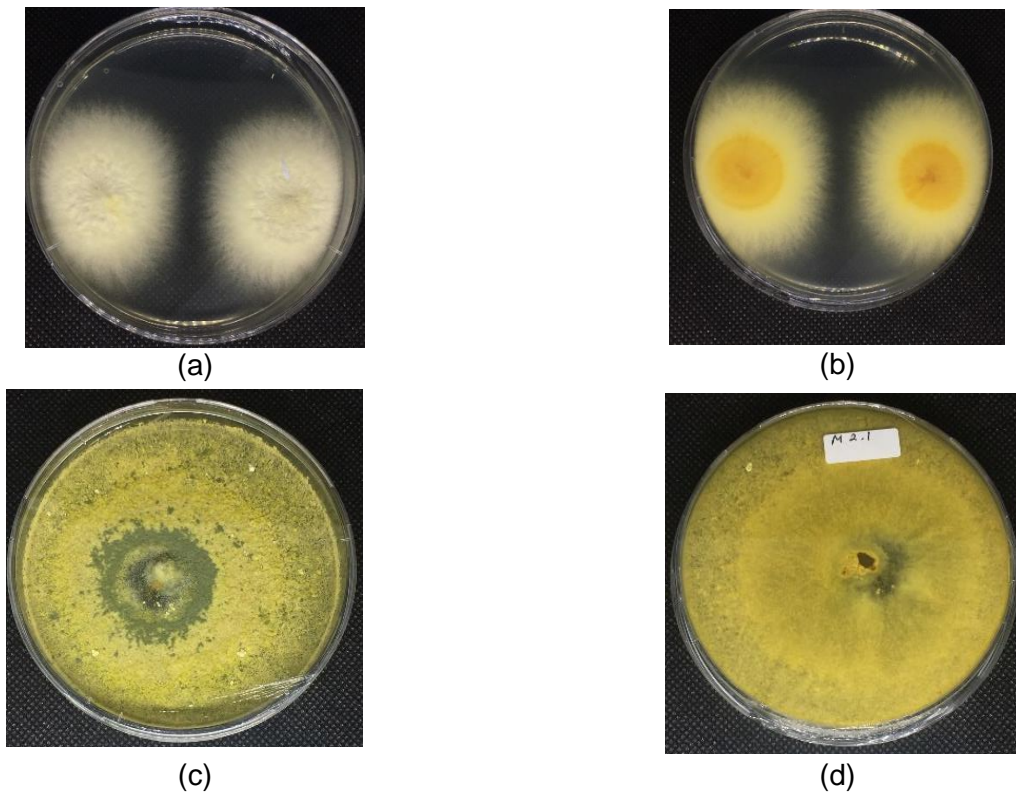
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebelum adanya penemuan teknik DNA *barcoding*, identifikasi kapang dilakukan menggunakan pengamatan makroskopis koloni dan mikroskopis dengan mikroskop. Penelitian ini menggabungkan pendekatan identifikasi morfologi dan DNA *barcoding* untuk memberikan hasil yang lebih akurat. Tabel 1-2 dan Gambar 1-2 menunjukkan hasil karakterisasi makro dan mikroskopi kedua isolat kapang. Hasil karakterisasi morfologi yang mencakup identifikasi makroskopik dan mikroskopik menunjukkan bahwa kapang MKMS 2.1 ketika diamati dibawah mikroskop memiliki konidiofor yang bercabang (*branching*), memiliki sekat (*septa*), dan tipe flask pada fialidnya dengan konidia yang tidak beronamen (*smooth*). Secara makroskopik, isolat mempunyai teksur miselia dengan tutupan serta konidia yang sangat banyak (*powdery*). Koloni isolat ini berwarna hijau dengan pola radial hijau dan kuning. Berdasarkan karakterisasi inilah, isolat ini diduga berasal dari genus *Trichoderma*.

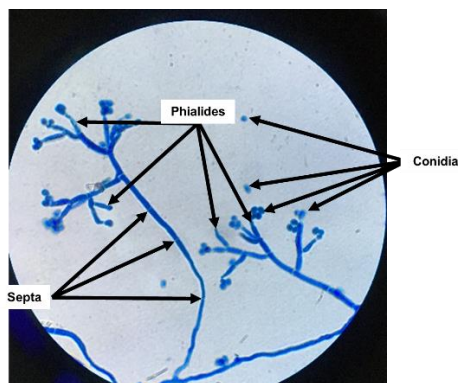
Hal ini sesuai dengan penelitian Suanda (2019) yang menyatakan bahwa genus *Trichoderma* memiliki ciri ciri morfologis; tekstur *powdery* dengan warna koloni kuning-hijau, *reverse color* kuning-hijau, tidak terdapat *sclerotia* dan *exudates*. Sedangkan pada penelitian Ghazanfar *et al.* (2018); Waghunde *et al.* (2016), menyatakan bahwa genus *Trichoderma* memiliki bentuk konidia *smooth* atau *ellipsoidal*, bentuk konidiofor yang bercabang, memiliki tipe hifa yang bersekat, dan bentuk fialid seperti flask. Genus *Trichoderma* adalah kapang berfilamen dalam fase aseksual *teleomorph* milik urutan *Hypocreales* divisi *Ascomycota*. Fungsi ekologis *Trichoderma* sebagai dekomposer residu di lingkungan. Beberapa spesies dari *Trichoderma* menghasilkan enzim selulase yang baik sehingga *Trichoderma* mempunyai peran penting dalam bidang *bioteknologi*. Misalnya, beberapa spesies dari genus ini memiliki kemampuan antagonis untuk melawan kapang patogen. Strain *Trichoderma* yang memiliki kemampuan antagonis pada patogen tanaman dapat menjadi kandidat potensial untuk agen biokontrol (Kredics *et al.*, 2003). Menurut Gultom (2008) mekanisme antagonis kapang *Trichoderma* seperti a) kompetisi nutrisi dalam jumlah terbatas tetapi tidak diperlukan oleh organisme/mikroorganisme patogen, b) antibiosis sebagai produk metabolit sekunder yang dihasilkan ketika merasa terancam, dan c) predasi, hiperparasitisme, dan mikroparasitisme. Genus *Trichoderma* termasuk kapang *cosmopolitan* karena hampir ditemukan di seluruh wilayah. Hal ini

dapat dikarenakan spora kapang genus *Trichoderma* yang dapat menyebar melalui udara dan kolom air, sehingga dapat sampai keperairan dan ditangkap oleh spons.

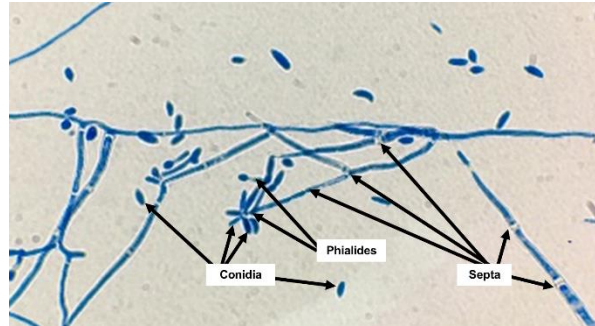
Secara makroskopik, isolat PKMS 2.2 mempunyai tekstur miselia *powdery*. Warna koloni adalah putih. Warna *reverse* mayoritas adalah putih menuju kuning kecokelatan. Isolat ini ketika diamati dibawah mikroskop semuanya memiliki tipe konidiofor *branching*, dengan tipe konidia yaitu mikro konidia, tipe hifa yang bersekat dan fialid bertipe monofialid. Dari pengamatan tersebut, isolat ini berasal dari genus *Fusarium* (Hafizi *et al.*, 2013). Spesies *Fusarium* dapat menghasilkan tiga jenis spora yang disebut *macroconidia*, *microconidia*, dan *chlamydospores*. *Macroconidia* diproduksi di *sporodochium* (struktur khusus) diproduksi dalam struktur khusus yang disebut sporodochium. *Microconidia* diproduksi di *aerial* miselia. *Microconidia* dapat di produksi di kepala atau rantai tiruan pada fialid. *Chlamydospores*, yaitu spora ber dinding tebal yang berisi lipid dan akan berfungsi untuk berpindah tempat ketika kondisi inang tidak cocok (Nelson *et al.*, 1994).



Gambar 1. Isolat Kapang PKMS 2.2. (a); tampak depan isolat, (b); tampak belakang isolat Isolat Kapang MKMS 2.1 (c); tampak depan isolat, (d); tampak belakang isolat Isolat



Gambar 2. Karakteristik mikroskopik konidiofor isolat MKMS 2.1



Gambar 3. Karakterisasi mikroskopik konidiofor isolat PKMS 2.2

Tabel 1. Karakterisasi Makroskopik

Isolat	Karakteristik Makroskopik					
	Colony color	Colony texture	Mycellium	Exudates	Reverse	Sclerotia
MKMS 2.1	White	Granular	Green	No	Green	No
PKMS 2.2	White	Wolly	White	No	White	No

Tabel 2. Karakterisasi Mikroskopik

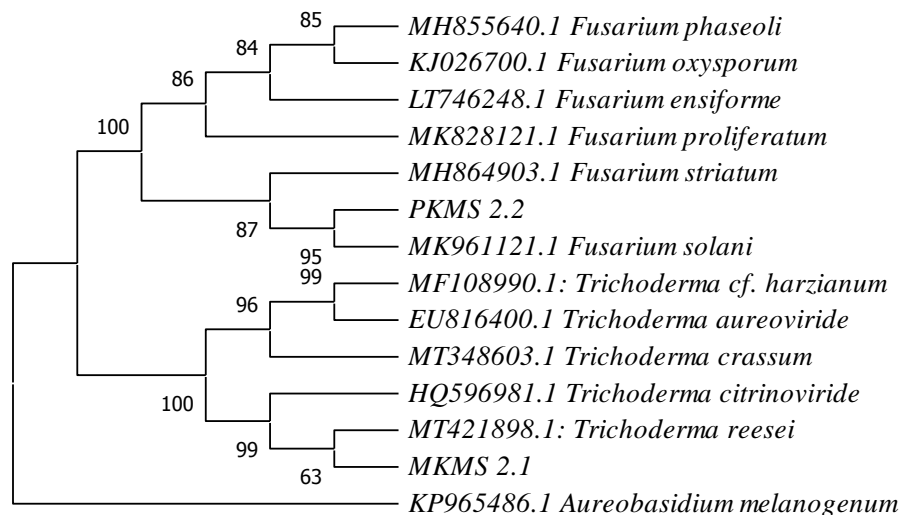
Isolat	Karakteristik Mikroskopik			
	Conidiophore	Conidia	Phialides	Hyphae
MKMS 2.1	Branching	Ellipsoidal	Flask	Septum
PKMS 2.2	Branching	Microconidia	Monofialid	Septum

DNA *barcoding* dilakukan setelah pengamatan morfologi untuk mengkonfirmasi dugaan awal genus kedua isolat. Hasil sekuens dipengaruhi oleh keberhasilan proses PCR sampai dengan elektroforesis. Keberhasilan amplifikasi ini dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain keberhasilan ekstraksi DNA, kemurnian DNA, komposisi larutan PCR, kondisi reaksi dan suhu yang digunakan saat proses *annealing* atau penempelan primer. Kualitas pita DNA untuk menentukan konsentrasi primer optimum dapat dipengaruhi oleh konsentrasi DNA *template* dan konsentrasi primer itu sendiri. Kualitas PCR dan spesifisitas tergantung pada konsentrasi primer optimal yaitu 0.1-2.0 μM (Loffert *et al.*, 1999).

Optimasi suhu *annealing* dilakukan dengan menggunakan *gradient annealing* saat PCR. Suhu *annealing* yang optimal adalah 55 °C. Artinya, penempelan primer optimal pada suhu 55 °C dan DNA dapat teramplifikasi. Hasil identifikasi berdasarkan persamaan *BLAST homology* didapatkan kesamaan isolat MKMS 2.1 dengan *Trichoderma reesei* (MT421898.1) sebesar 100% dengan *query cover* 100%. Hal ini menunjukkan bahwa kesamaan basa yang dimiliki isolat dengan *Trichoderma* ini sangat mirip sehingga dapat dikatakan bahwa isolat ini adalah spesies *Trichoderma reesei*. Sedangkan isolat PKMS 2.2 berdasarkan persamaan *BLAST homology* merupakan spesies *Fusarium solani* (MK961121.1) dengan prosentase *query cover* 100% dengan prosentasi identifikasi 99,82%.

Konstruksi pohon filogenetik menggunakan *Aureobasidium melanogenum* sebagai *outgroup* (KP965486.1) (Gambar 4). PKMS 2.2 memiliki kesamaan dengan *Fusarium solani* dengan hasil bootstrap 95% dimana artinya 95% pembentuk cabang pohon filogenetik akan membentuk cabang yang sama. Metode *bootstrap* merupakan analisis pengujian baik atau tidaknya set data model. Artinya, sebagai validitas terhadap penyusunan cabang untuk memprediksi tingkat *resampled* dalam membentuk cabang dan ranting pohon filogenetik. Jarak genetik pada pohon filogenetik menunjukkan nilai sebesar 0.20, dimana nilai ini menunjukkan adanya perbedaan 20 basa dalam setiap 100 basa tiap sekuensnya. Dalam konstruksi filogenetik menggunakan metode *neighbor joining* dan analisis *bootstrap* (10000 kali ulangan) dan menghasilkan nilai sebesar 90% yang berarti sekuens isolat ini berbeda nyata dengan outgrup karena memiliki urutan pasangan basa

yang berbeda jauh (Dharmayanti, 2011). Konstruksi pohon filogenetik adalah hal terpenting untuk menentukan jarak evolusi pada spesies tertentu. Filogenetik dapat diartikan sebagai klasifikasi dari organisme secara taksonomi dan pusat dari evolusi biologi, dimana terdapat paradigma keseluruhan bagaimana organisme berkembang dan hidup di alam. Analisis filogenetik ini dapat dilihat berdasarkan *gap* yang terbentuk setelah proses *multiple alignment*. *Gap* yang terbentuk dapat menunjukkan delusi atau inersi dari satu atau lebih sekuens selama evolusi. Hal ini dapat diartikan pula sebagai mutasi genetik dalam sekuens. Metode *neighbor joining* adalah metode akurat untuk pohon yang memiliki cabang yang pendek. Cabang panjang yang terbentuk bertendensi menurunkan kepercayaan dari prediksi.



Gambar 4. Pohon filogenetik dua isolat kapang asosiasi spons asal ekosistem mangrove (Rekonstruksi dilakukan menggunakan urutan nukleotida pada region parsial 18S, ITS1, 5.8S, ITS 2 dan parsial 26S rDNA)

KESIMPULAN

Identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat MKMS 2.1 adalah *Trichoderma reesei* (MT421898.1) yang mempunyai persamaan *BLAST homology* sebesar 100% dengan *query cover* 100% dan isolat PKMS 2.2. merupakan *Fusarium solani* (MK961121.1) dengan persamaan *BLAST homology* sebesar 99,82% dan *query cover* sebesar 100%.

DAFTAR PUSTAKA

- [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nation. 2017. Sponge and their role in the marine environment.
- Anindyawati, T. 2010. Potensi selulase dalam mendegradasi lignoselulosa limbah pertanian untuk pupuk organik. *Jurnal Selulosa*, 45(02):70-77
- Bell, J.J. 2008. The functional roles of marine sponges. *Estuarine, Coastal, and Shelf Science* 79: 341-353. Doi: 10.1016/j.ecss.2008.05.002.
- Burns, E., Ifrach, I., Carmeli, S., Pawlik, J.R. & Ilan, M. 2003. Comparison of anti-predatory defenses of Red Sea and Caribbean sponges. I. Chemical defense. *Marine Ecology Progress Series*, 252:105-114.
- Dharmayanti, N.L.P.I. 2011. Filogenetika molekuler: metode taksonomi organisme berdasarkan sejarah evolusi. *Wartazoa*, 21(1):1-10.
- Ghazanfar, M.U., Raza, M., Raza, W., & Qamar, M.I. 2018. *Trichoderma* as potential biocontrol

agent, its exploitation in agriculture: a review. *Plant Protection*, 2(3):109-135

- Gultom, J.M., 2008. Pengaruh Pemberian Beberapa Jamur Antagonis dengan Berbagai Tingkat Konsentrasi Untuk Menekan Perkembangan Jamur *Phytium* sp Penyebab Rebah Kecambah pada Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) <http://repository.usu.ac.id.pdf>. Diakses 20 Mei 2020
- Kredics, L., Antal, Z., Dóczy, I., Manczinger, L., Kevei, F. & Nagy, E.. 2003. Clinical Importance Of The Genus *Trichoderma*. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 50(2-3):105-117.
- Kunarso, D.H. 1988. The importance of heterotrophic bacteria in marine ecosystem. *Oseana*
- Loffert, D., Karger, S., Twieling, G., Ulber, V. & Kang, J. 1999. Optimization of multiplex PCR. *Qiagen news*. 2:5-8.
- Miranti, A.K., Rukmi, M.I. & Supriyadi, A. 2015. Diversitas Kapang Serasah Daun Talok (*Muntingia calabura* L.) Di Kawasan Desa Sukolilo Barat, Kecamatan Labang, Kabupaten Bangkalan, Madur. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*, 16(2):58-64.
- Richards, T.A., Jones, M.D.M., Leonard, G. & Bass, D. 2012. Marine fungi: their ecology and molecular diversity. *Annual Reviews of Marine Science*, 4:495-522.
- Sibero, M.T., Tarman, K., Radjasa, O.K., Sabdono, A., Trianto, A. & Bachtiarini, T.U. 2018. Produksi Pigmen dan Identifikasi Kapang Penghasilnya Menggunakan Pendekatan DNA Barcoding. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(1):99-108.
- Sibero, M. T., Sabdaningsih, A., Cristianawati, O., Nuryadi, H., Radjasa, O. K., Sabdono, A., & Trianto, A. 2017. Isolation, identification, and screening antibacterial activity from marine sponge associated-fungi against multidrug-resistant (MDR) *Escherichia coli*. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 55:012028.
- Suanda, I.W. 2019. Karakterisasi Morfologis *Trichoderma* Sp. Isolat Jb Dan Daya Hambatnya Terhadap Jamur *Fusarium* Sp. Penyebab Penyakit Layu Dan Jamur Akar Putih Pada Beberapa Tanaman. *Jurnal Widya Biologi*, 10(02):99-112.
- Thoms, C., Schupp, P.J., Custódio, M.R., Lôbo-Hajdu, G., Hajdu, E. & Muricy, G. 2007. Chemical defense strategies in sponges: a review. *Porifera research: biodiversity, Innovation and sustainability*, 28:627-637.
- Waghunde, R.R., Shelake, R.M., & Sabalpara, A.N. 2016. *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research*, 11(22):1952-1965.