

PENGHASILAN METABOLIK BIOAKTIF DARIPADA ORGANISMA ENDOFITIK

Istilah endofitik atau endofit ditakrifkan sebagai semua organisma termasuk bakteria, kulat, alga dan serangga tanpa menyebabkan gejala penyakit. Menurut kajian saintis, endofitik ialah mikroorganisma yang mendiami bahagian atau lapisan pada tumbuh-tumbuhan. Pada masa ini, endofit dianggap sumber luar biasa produk semula jadi bioaktif kerana

terdapat banyak daripada organisma ini menduduki jutaan jenis unik biologi, iaitu tumbuh-tumbuhan yang lebih tinggi yang tumbuh di persekitaran yang sangat luar biasa. Oleh sebab itu, endofit kini dianggap sebagai sumber metabolit sekunder baharu yang menawarkan potensi eksploitasi perubatan, pertanian dan perindustrian.

Sejak penemuan endofit di Damel, Jerman, pada tahun 1904, pelbagai kajian telah dijalankan bagi menentukan

endofit dengan cara yang berbeza yang pada kebiasaannya bergantung pada perspektif, iaitu endofit diasingkan dan kemudian diperiksa. Saintis memberikan takrifan endofit yang inklusif serta diterima secara meluas sebagai "mikrob yang menjajah tisu dalaman tumbuhan tanpa menyebabkan sebarang kesan negatif serta-merta".

Walaupun falsafah sifat endofit dalam tisu tumbuhan telah mendorong tumpuan pada hubungan simbiotik



atau mutualisma antara endofit dan perumah mereka, keanekaragaman kehidupan endofit menunjukkannya juga boleh menjadi saprofit agresif atau patogen oportunistik. Kedua-dua kulat dan bakteria adalah mikrob yang paling biasa yang wujud sebagai endofit. Endofit yang paling kerap terencil adalah

kulat. Ternyata kebanyakan tanaman masing-masing mempunyai jenis endofit mereka tersendiri.

Sementara itu, kulat endofitik ialah organisma eukariotik yang mengandungi nukleus yang membrannya terikat di dalam sel-selnya. Dalam taksonomi biologi, kulat endofitik ialah ahli Kingdom Fungi. Disiplin biologi yang berkaitan dengan kajian kulat dikenali sebagai mikologi. Kingdom kulat termasuk lima *phyla* (kelas) atau bahagian, iaitu (1)

Chytridiomycota atau chytrids yang terutamanya hidup dalam air laut; (2) Zygomycota termasuk *Rhizopus stolonifer* atau acuan roti hitam; (3) Glomeromycota atau kulat tanah; (4) Ascomycota atau kulat kantung termasuk *Saccharomyces cerevisiae* atau yis membuat roti, cetakan berwarna pada makanan dan *Penicillium*; dan (5) Basidiomycota atau kulat kelab termasuk cendawan, puffballs dan beberapa penyakit tumbuhan seperti karat (*rust*) dan gosong (*smuts*).

Liken pula ialah perhubungan simbiotik antara Ascomycetes dengan alga hijau tertentu. Liken umumnya dibezakan oleh jenis spora dan struktur badan berbuah yang dihasilkannya untuk pembiakan. Dinding sel liken terdiri daripada kitin dan kebanyakannya ditemukan tumbuh sebagai hifa, filamen bebenang panjang. Hifa ini secara kolektif membentuk bahagian vegetatif daripada kulat yang dikenali sebagai miselium. Kulat jenis ini memilih habitat yang lembap dan kebanyakannya ialah mesofilik, lebih memilih suhu antara 15°C hingga 35°C.

Sistem klasifikasi kulat yang berasaskan morfologi perlu dikemas kini untuk lebih mencerminkan hubungan filogenetik seperti yang ditentukan oleh sistematik molekul. Watak molekul sangat penting untuk analisis filogenetik dalam kes-kes apabila watak morfologi ialah konvergen, dikurangkan atau hilang dalam kalangan taksonomi yang dipertimbangkan. Hal ini benar terutamanya bagi spesies yang tidak pernah membiak secara seksual kerana cara pembiakan ini telah menjadi asas untuk klasifikasi kulat. Penggunaan aksara molekul membolehkan kulat yang membiak secara aseksual diletakkan dalam kalangan famili terdekat mereka.

Menurut penyelidik yang lain, mereka turut bersependapat dengan menyatakan bahawa endofit ialah sebarang kulat yang diasingkan daripada tisu tumbuhan tanpa gejala dalaman. Terdapat penyelidik juga yang mendedahkan bahawa "endofit benar" ditakrifkan ialah kulat yang penjajahannya tidak pernah menghasilkan gejala penyakit yang boleh

dilihat. Kulat yang dikaitkan dengan akar orkid biasanya dipanggil *mycorrhizae*, tetapi terdapat juga penyelidik lain yang mendedahkan bahawa endofit sebenar mungkin juga terdapat dalam akar dan tisu lain. Sementara itu, analisis filogenetik untuk menyiasat komuniti kulat dalam akar dan daun pokok orkid, *Bletilla ochracea* di barat daya China telah dilaporkan oleh saintis.

Di Jepun, kajian berkenaan kulat endofitik telah dijalankan pada pokok konifer, rumput dan tumbuhan yang menghasilkan minyak. Keputusan hasil pengkajian oleh para penyelidik menunjukkan bahawa beberapa kulat endofitik daripada tumbuhan monokotiledon menghasilkan bahan yang beracun kepada lembu dan serangga yang memakan rumput pada perumah. Sementara itu, terdapat juga kumpulan penyelidik yang berjaya memisahkan kulat endofitik daripada batang pokok koko yang berbeza untuk mengenal pasti agen biokontrol yang mungkin dapat mengawal penyakit jangkitan kulat tumbuhan berkayu yang berbahaya atau dikenali sebagai

"penyapu penyihir". Berdasarkan laporan sebelumnya, kulat endofitik dapat melindungi pokok koko terhadap fitopatogen. Kulat ini ialah agen penyebab penyakit "penyapu penyihir" pokok koko, *Theobroma cacao* L. yang merupakan satu daripada faktor utama masalah dalam pengeluaran koko.

Pada Februari 2006, kulat endofit di dalam benih dan duri pokok *Pinus monticola* berjaya diasingkan oleh penyelidik. Mereka mengasingkan kulat endofit sejak tahun 2003 daripada 800 duri permukaan yang disteril. Sebaliknya hanya 16 sampel pengasingan endofitik diperoleh daripada 800 biji buah-buahan yang disteril. Keputusan yang dijalankan oleh sekumpulan penyelidik mendapati bahawa *Endophytesataceous endophytes* dominan di dalam duri pokok *Pinus monticola*, tetapi kelihatan tidak hadir di dalam biji benih dan penjajah tisu perumah yang mempunyai limitasi oleh gas nitrogen seperti apoplast.

Dalam laporan lain, kulat endofitik juga diperoleh daripada pokok *Juniperus communis* L. Horstmann. Selain itu, terdapat laporan oleh penyelidik



Kulat endofitik ialah agen penyebab penyakit "penyapu penyihir" pada pokok koko yang menjadi faktor utama masalah dalam pengeluaran koko.

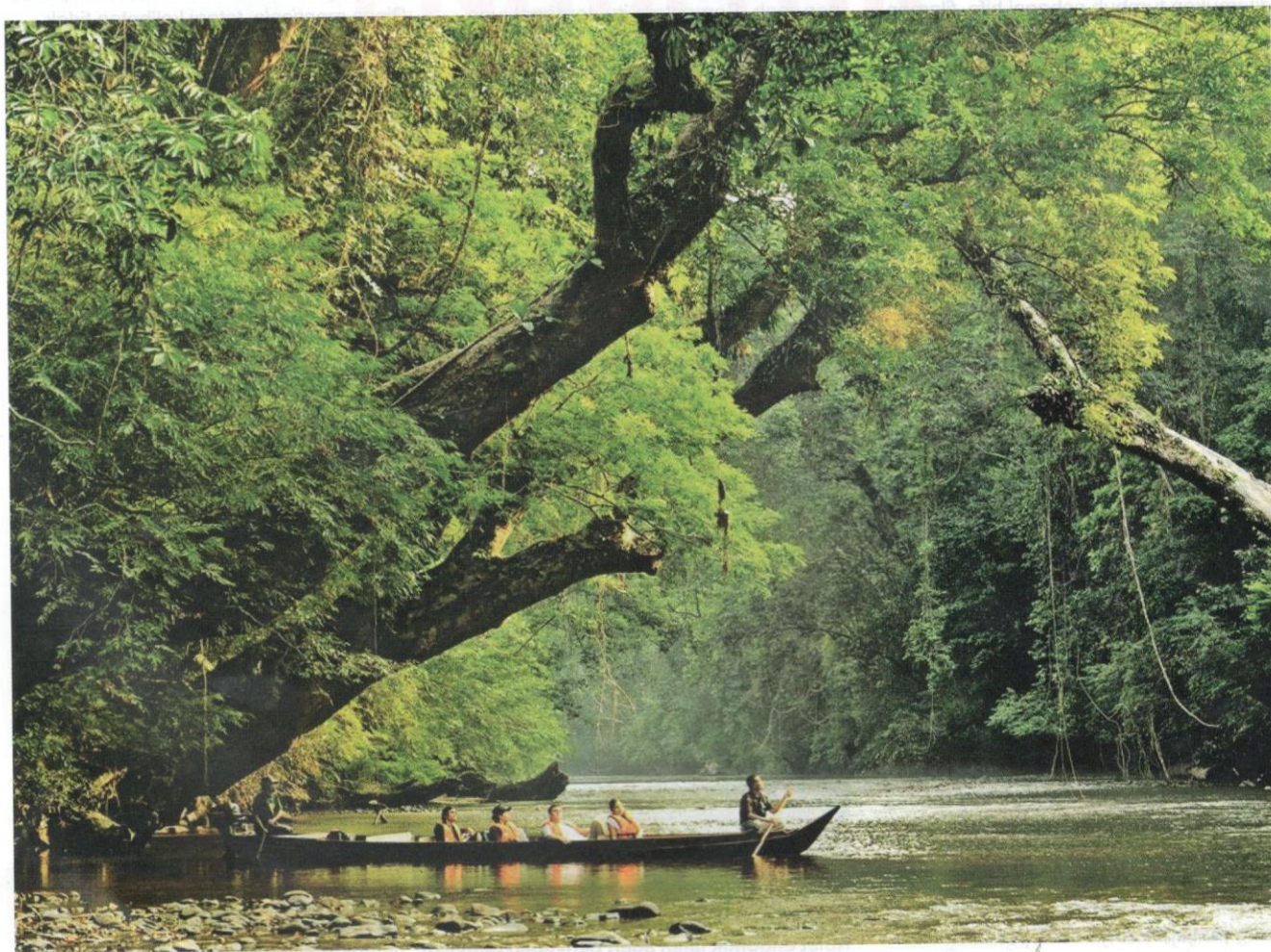
yang menyatakan bahawa kulat juga bertindak sebagai sumber novel bagi sebatian deoxypodophyllotoxin, iaitu sebatian prodadah yang mempunyai agen antikanser yang telah dikenal pasti daripada kulat *Aspergillus fumigates* Fresenius. Sebatian deoxypodophyllotoxin ini turut dikenal pasti dan dikira oleh LC-MS resolusi tinggi. Keberkesanan antimikrobial terhadap sebatian deoxypodophyllotoxin oleh kulat terhadap panel bakteria patogen juga telah dikenal pasti. Pengeluaran sebatian deoxypodophyllotoxin yang telah dijumpai dalam perumah oleh kultur endofit ialah pemerhatian yang enigmatik yang menunjukkan pemindahan gen-gen untuk pengumpulan cara mendarat

daripada loji perumah kepada rakan endofitiknya.

Sejumlah 300 kulat endofit berjaya diasingkan daripada pelbagai bahagian tumbuhan dari Taman Negara, Pahang, Malaysia. Ekstrak daripada sel kultur keadaan pepejal diuji untuk ketoksikan terhadap beberapa sel kanser menggunakan kaedah 3(4, 5-dimetilthiazol-2-yl)-2, diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Aktiviti antibakteria endofit telah ditentukan menggunakan kaedah penyebaran cakera. Hasilnya ekstrak *Streptomyces* sp. yang diasingkan daripada batang tumbuhan Malaysia telah didapati berkesan seperti antibiotik oksasilin. Berikutan itu, penyelidik

menyimpulkan bahawa pemeriksaan awal endofit kepada spesies kulat hutan telah mendedahkan potensi untuk menghasilkan sebatian bioaktif yang unik serta berkualiti untuk program penemuan sumber dadah.

Terdapat banyak kajian tentang endofit pelbagai tumbuhan di merata negara. Endofit termasuk kulat telah diasingkan daripada semua tumbuhan yang dikaji hingga kini. Tumbuhan terlibat terdiri daripada pokok besar, palma, rumput laut dan liken. Menurut sepasukan penyelidik, selepas loji dipilih untuk kajian, hal ini akan dikenal pasti, kemudian lokasinya diplot dengan menggunakan peranti kedudukan global. Potongan batang kecil dipotong daripada



Sejumlah 300 kulat endofit berjaya diasingkan daripada pelbagai bahagian tumbuhan dari Taman Negara.

kilang dan diletakkan di dalam kantung plastik yang tertutup setelah kelembapan berlebihan dikeluarkan. Setiap percubaan dibuat untuk menyimpan bahan pada suhu 4°C sehingga prosedur pengasingan dimulai.

Di makmal, pensterilan bahan serta tumbuhan dilakukan secara menyeluruh dengan etanol 70 peratus, kadangkala teknik yang lain pensterilan adalah seperti bahan serta tumbuhan pensampelan dipanaskan dengan api penunu bunsen, dan akhirnya pensterilan menggunakan udara kering di dalam kebuk aliran laminar. Teknik ini dilakukan terhadap kebanyakan endofit termasuk kulat untuk menghilangkan serta menyahkan mikroorganisma lain yang mencemari permukaan bahan serta tumbuhan pensampelan.

Teknik yang paling biasa digunakan dalam pengesanan kulat endofitik dalam tumbuhan melibatkan tiga langkah, iaitu (1) sterilisasi permukaan tisu tumbuhan; (2) inkubasi cakera dipotong daripada tisu tumbuhan pada agar dan pengasingan endofit yang tumbuh; dan (3) pengenalpastian kultur sporulasi oleh kaedah tradisional. Ada saintis yang memperkenalkan kaedah untuk menguji sama ada kaedah pensterilan permukaan yang berkesan bagi menghapuskan epifit atupun sebaliknya. Hal ini melibatkan kaedah membuat cetakan daun pada permukaan agar. Jika tiada kulat tumbuh, maka protokol pensterilan boleh dianggap berkesan. Para saintis menyimpulkan bahawa protokol ini ialah kaedah yang sangat baik untuk mengasingkan kajian endofit.

Banyak endofit yang terisolasi daripada tisu tumbuhan yang sporulasi pada media tiruan yang berbeza di bawah keadaan kultur yang berbeza. Namun demikian, terdapat juga endofit yang tidak melakukan sporulasi. Keadaan ini dikenali sebagai miselia steril, namun jarang-jarang ditemukan. Terdapat sekumpulan penyelidik lain yang melaporkan bahawa kira-kira 15 peratus endofit yang diasingkan daripada tumbuhan semak samun malar hijau di barat Oregon tidak melakukan sporulasi.

Saintis lain mendapati bahawa kira-kira 26.9 peratus endofit yang diasingkan daripada pokok redwood pantai ialah miselia steril. Terdapat juga pasukan saintis menyatakan bahawa terdapat pelbagai frekuensi isolasi miselia steril daripada pokok *Quercus ilex* daripada laman web yang berbeza dan tisu yang berbeza.

Lapan belas peratus daripada kepekatan endofit daripada daun di Switzerland ialah jenis miselia steril, manakala 17.5 peratus terencil daripada daun di Sepanyol. Kekerapan miselia yang lebih tinggi, iaitu sebanyak 41.3 peratus telah diasingkan daripada rantingan *Quercus ilex* di Switzerland. Perkara ini telah menunjukkan bahawa kajian dengan kaedah yang dibangunkan untuk mempromosikan sporulasi miselia steril bagi tujuan pengenalan adalah amat penting. Pensterilan miselia boleh dikenal pasti dengan mempromosikan sporulasi dengan pelbagai cara atau menggunakan teknik molekul.

Kulat endofit mungkin menjadi satu daripada sumber utama yang berpotensi untuk penghasilan metabolit yang berguna. Kulat endofit ini sangat berpotensi sebagai pengeluar produk aktif biologi yang mempunyai nilai noveltinya yang tersendiri. Hingga tahun 2003, kira-kira 4000 metabolit sekunder dengan aktiviti biologi telah diperolehi daripada kulat. Kebanyakan metabolit ini dihasilkan oleh "kulat kreatif" termasuk spesies *Aspergillus*, *Fusarium* dan *Penicillium*. Terdapat pasukan saintis mengisolasi kira-kira 6500 kulat endofit untuk menguji potensi biologinya. Mereka berjaya menganalisis 135 metabolit sekunder dan mendapati bahawa 51 peratus sebatian bioaktif yang diasingkan daripada kulat endofitik ialah produk semula jadi yang baharu.

Produk semula jadi daripada mikroorganisma endofitik telah dikaji oleh para saintis untuk menghalang serta membunuh pelbagai jenis agen penyebab penyakit berbahaya, tetapi tidak terhad kepada fitopatogen,

bakteria, kulat, virus, dan protozoan yang memberikan kesan kepada manusia dan haiwan. *Cryptosporiopsis quercina* ialah contoh endofit yang tergolong dalam kategori ini yang diperolehi daripada pokok *Pezicula cinnamomea*, kulat yang biasanya dikaitkan dengan spesies kayu keras di Eropah. Kulat ini juga telah diasingkan secara besar-besaran oleh sebuah kilang perubatan sebagai endofit daripada pokok *Tripterigeum wilfordii*. Ada dalam kalangan para penyelidik yang melakukan kajian terhadap plat petri terhadap spesies *C. quercina* yang telah menunjukkan aktiviti antikulat yang sangat baik terhadap beberapa patogen kulat manusia yang penting.

Sesetengah spesies kulat endofit didapati menghasilkan sejenis ubat-ubatan yang serupa kepada perumah sebagai sumber antikanser, antidiabetik, insektisidal dan sebatian immunosupresif. Penyaringan kumpulan kulat ini boleh menghasilkan produk tanaman ubatan yang berharga. Sebagai contoh, banyak ubatan tradisional telah diperolehi daripada mikroorganisma dari negara China telah dikomersialkan secara skala besar-besaran. Berikutan itu, terdapat banyak laporan mengenai pengeluaran metabolit bioaktif yang mungkin berpotensi untuk tujuan terapeutik oleh kulat endofitik daripada tumbuhan ubatan Cina.

Beberapa kajian juga telah meneroka hubungan antara endofit dengan peranannya sebagai saprobes. Endofit mungkin membangun hubungan intim dengan perumahnya semasa evolusi dan boleh menjadi perumah, bahkan tisu khusus. Kebanyakan endofit dalam daun dan tisu berkayu ialah perumah, perumah genus atau keluarga tertentu perumah.

Sebagai kesimpulannya, hingga kini penghasilan metabolit bioaktif berpotensi daripada organisma endofitik masih dikaji dari sehari ke sehari oleh para penyelidik juga saintis bagi memperoleh dapatan kajian yang terbaik, tepat serta berkualiti tinggi bagi memberikan manfaat yang semaksimumnya terhadap kehidupan sejagat. 