

## KEPELBAGAIAN KULAT ENDOFIT DARIPADA *Asplenium nidus*

NAZLINA IBRAHIM\* dan NURUL AINA BINTI JAPRI

Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi  
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia  
Mel-e: nazlina@ukm.edu.my

### ABSTRAK

Pemencilan dan pencirian kulat endofit daripada pelbagai bahagian paku pakis epifit *Asplenium nidus* telah dilakukan. Sebanyak 13 kulat endofit berjaya dipencilkan daripada *A. nidus* dengan lapan pencilan daripada daun, tiga sampel daripada tulang daun dan dua sampel daripada akar. Melalui pengenalpastian secara makroskopik dan mikroskopik, endofit yang berjaya dikenal pasti terdiri daripada kulat *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, dua pencilan *Penicillium* sp., satu pencilan *Phoma* sp., satu pencilan *Fusarium* sp., satu pencilan *Pestalotopsis* sp. dan satu pencilan *Drechslera* sp. Terdapat empat pencilan kulat yang tidak dapat dikenal pasti pada peringkat genus iaitu kulat daripada keluarga *Dematiaceae*, kelas *Sphaeropsidales*, miselium steril dan daripada filum Deutromikota. Penyaringan aktiviti antibakteria kulat endofit juga telah dilakukan. Hanya *A. terreus*, *Phoma* sp. dan pencilan kulat daripada filum Deutromikota menghasilkan zon perencatan yang kecil terhadap bakteria ujian. Kepelbagaian endofit daripada *A. nidus* telah berjaya ditunjukkan dalam kajian ini dengan beberapa pencilan mempunyai aktiviti antibakteria yang lemah.

**Kata kunci:** *Asplenium nidus*, endofit, pencirian, pengenalpastian, aktiviti antibakteria

### ABSTRACT

Isolation and characterization of fungal endophytes from various parts of epiphyte fern, *Asplenium nidus* was done. Thirteen fungal endophytes have been successfully isolated from *A. nidus* from which eight was from the leaf, three from midrib and two from the root. Macroscopic and microscopic identification revealed that the isolates was identified as *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, two isolates from genus *Penicillium*, one isolate each from the genus *Phoma*, *Fusarium*, *Pestalotopsis* and *Drechslera*. Four isolates were unable to be identified at the genus level. However they can be classified as members from Family *Dematiaceae*, Class *Sphaeropsidales*, sterile mycelium and phylum Deutromycota respectively. Screening for antibacterial activity of the fungal endophytes was also done. Only *A. terreus*, *Phoma* sp. and isolate of Phylum Deutromycota produced inhibition zones against the tested bacteria. The diversity of endophytes from *A. nidus* was shown in this study with some of the isolates having low antibacterial activity.

**Key words:** *Asplenium nidus*, endophytes, characterisation, identification, antibacterial activity

### PENGENALAN

Endofit merujuk kepada mikroorganisma yang hidup dalam tisu-tisu tumbuhan yang sihat (Hyde dan Soyong, 2008). Umumnya, kulat endofit tidak mendatangkan sebarang kerosakan kepada pokok sebaliknya memberi keuntungan kepada perumahannya dengan meningkatkan tahap kerintangan pokok terhadap patogen (Reiter *et al.*, 2002) dan parasit (Hallmann *et al.*, 1997), menggalakkan pengikatan nitrogen (Baldani *et al.*, 1986) dan menghasilkan antibiotik (Strobel dan Daisy 2003). Endofit juga

amat penting sebagai sumber sebatian bioaktif semula jadi dengan potensi besar dalam pertanian dan industri makanan (Clay, 1988; Gunatilaka, 2006; Verma *et al.*, 2009).

Aspek-aspek ekologi kulat endofit seperti julat perumah, kaitan evolusi, jangkitan, pengkolonian, corak transmisi, kespesifikan tisu, faedah terhadap kesesuaian mutualisme telah dikaji dalam pelbagai tumbuhan (Arnold *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2009). Penyebaran endofit dan spora kulat endofit dalam hutan hujan tropika adalah melalui air yang bertindak sebagai inokulum untuk pengkolonian pada tisu-tisu hos (Wang dan Guo, 2007).

\* To whom correspondence should be addressed.

*Asplenium nidus* merupakan spesies pokok paku pakis langsuir yang mudah ditemui berbanding spesies *Asplenium* yang lain. Spesies ini merupakan pakis epifit yang hidup secara semulajadi di dalam hutan hujan tropika. Kajian kehadiran dan kepelbagaian endofit atau mikoriza tidak banyak dilaporkan bagi *A. nidus*. Gemma dan Koske (1995) telah memencilkan satu mikoriza arbuskul-vesikel daripada *A. nidus* yang terdapat di Hawaii. Swartzell *et al.* (1996) melaporkan kehadiran endofit pada paku pakis *Schizaea pusilla*.

Paku pakis *A. nidus* digunakan dalam rawatan tradisional seperti sakit perut, sebagai diuretik dan ubat pencegah kehamilan. Setiap tumbuhan perumah mempunyai taburan endofit yang berbeza pada akar, daun, xilem, batang dan bahagian lain yang berliang seperti lamina dan tulang tengah. Kajian ini bertujuan mengkaji kepelbagaian kulat endofit daripada pelbagai bahagian *A. nidus* seterusnya mengenal pasti kulat endofit melalui kaedah pencerapan makroskopi dan mikroskopi. Saringan awal aktiviti antibakteria dilakukan bagi mengenal pasti kehadiran sebatian bioaktif semula jadi.

## BAHAN DAN KAEDAH

### Persampelan dan penyediaan sampel

Pokok *A. nidus* diperoleh daripada Taman Paku Pakis, Universiti Kebangsaan Malaysia. Beberapa bahagian segmen merangkumi akar, daun, dan tulang daun yang sihat diambil secara rawak dan dimasukkan ke dalam beg plastik yang steril seterusnya diproses dalam masa 24 jam. Sampel disediakan dengan melakukan pengsterilan permukaan mengikut kaedah Arnold *et al.* (2000). Kesemua sampel dibilas dengan air paip sebelum dipotong kepada keratan bersaiz 1 cm. Keratan akar, daun dan tulang daun direndam dengan etanol 70% (i/i) selama dua minit diikuti dengan basuhan sodium hipoklorit (NaOCl) (0.525%, i/i) selama lima minit dan etanol 70% (i/i) (larutan berbeza daripada larutan pertama) selama 30 saat. Akhir sekali, keratan-keratan sampel ini dibasuh dengan air suling sebanyak dua kali selama 1 minit dan dibiarkan kering dalam persekitaran yang steril.

Kaedah lain yang digunakan ialah akar dan daun akan dihomogenat bersama dengan dua isipadu larutan 0.85% sodium klorida (NaCl) dalam mortar selepas proses pengsterilan permukaan. Bahan homogenat perlu dilakukan pencarian sehingga pencairan  $10^{-6}$ . Kemudiannya, sebanyak 100  $\mu$ l homogenat daripada pencairan  $10^{-6}$  disebarkan ke atas agar PDA. Piring agar PDA kemudiannya dieram selama tujuh hari pada suhu 30°C. Pencilan kulat yang mewakili pelbagai bentuk morfologi diambil dan dipencilkan secara

rawak. Kultur tulen seterusnya disubkultur pada agar condong PDA dan disimpan pada suhu 4°C.

### Pengkulturan kulat endofit pada medium agar

Sampel yang telah disteril kemudiannya dipindahkan ke atas medium agar pemilihan Rose Bengal Chloramphenicol (RBC) dan Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Semua piring-piring agar ini akan ditutup dengan parafilm sebelum dieram selama 5 hingga 7 hari pada suhu 30°C. Koloni yang hidup disubkultur dalam piring agar PDA yang baru mengandungi antibiotik streptomisin dan kaldu Dektrosa Kentang (PDB) yang seterusnya dieram pada suhu 30°C bagi mendapatkan kultur yang tulen. Untuk mendapatkan kultur stok, spora kulat dipindahkan ke dalam tiub Cryovial dan dicampur dengan gliserol (20%, i/i) untuk penyimpanan kultur jangka panjang. Tiub ini akan disimpan pada suhu -80°C.

### Pencerapan secara makroskopi

Pengenalpastian setiap kulat endofit melalui pencerapan morfologi koloni yang hidup di atas medium agar merangkumi penelitian warna koloni pada medium pertumbuhan PDA, SDA dan RBC, warna koloni di bawah piring medium agar, tekstur miselium, tepian koloni, penghasilan zon dan resapan pigmen di dalam agar. Selain itu, kadar pertumbuhan semua pencilan kulat ini juga dicerap.

### Pencerapan secara mikroskopi

Pencerapan kulat di bawah mikroskop dilakukan melalui kaedah penyediaan basah iaitu dengan mengambil bahagian miselium serta hifa kulat dan dipindahkan ke atas slaid yang telah diletakkan dengan laktofenol biru di atasnya. Seterusnya sisip kaca diletakkan dan spesimen kulat ini dicerap di bawah kanta objektif 100x sehingga 1000x kuasa pembesaran untuk melihat struktur hifa, spora dan septa.

### Ujian penyaringan antibakteria

Aktiviti antibakteria kulat diuji berdasarkan kehadiran dan diameter zon perencatan di atas koloni bakteria ujian iaitu bakteria Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* rintang metisilin (MRSA) ATCC 43300 dan *Streptococcus pyogenes*) serta Gram negatif (*Enterococcus aerogenes* dan *Salmonella typhi*). Pencilan kulat yang telah dieram pada 30°C selama 7 hari pada agar PDA ditebuk membentuk cakera menggunakan penebuk gabus berdiameter 6 mm dan dipindahkan ke atas agar MHA yang telah disebar inokulum bakteria dengan bahagian permukaan miselium menghala ke arah permukaan bakteria ujian. Cakera antibiotik kawalan bagi bakteria Gram negatif adalah kloramfenikol (10 i.u) dan Gram

positif adalah vankomisin (30 i.u) diletakkan di bahagian tengah piring sebaran bakteria ujian. Kesemua piring ujian ini kemudiannya dieram pada 37°C selama 18 hingga 24 jam. Pencerapan dilakukan berdasarkan diameter zon perencatan pada hari berikutnya.

## HASIL

### Ciri pencilan kulat endofit

Sebanyak 29 sampel *Asplenium nidus* yang terdiri daripada 12 sampel daun, 11 sampel tulang daun dan enam sampel akar telah diambil. Sejumlah 13 pencilan kulat endofit telah diperolehi dan dinamakan sebagai K1-K13. Pencilan kulat daripada daun terdiri daripada pencilan yang dinamakan K1, K2, K3, K4, K7, K8, K9 dan K12, pencilan daripada tulang daun terdiri daripada K5, K10, dan K11 manakala daripada akar terdiri daripada K6 dan K13.

Cerapan ciri-ciri makroskopik dan mikroskopik semua pencilan kulat ditunjukkan dalam Jadual 1 dan Jadual 2. Pencirian untuk kesemua tiga belas pencilan kulat berjaya dilakukan berdasarkan perbandingan ciri-ciri makroskopik dan mikroskopik yang dicerap serta rujukan daripada buku *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (Barnett dan Hunter, 1998). Berdasarkan morfologi, kulat-kulat endofit tersebut dikenal pasti sebagai *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, *Phoma* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotopsis* sp., *Drechslera* sp., kulat daripada kelas *Sphaeropsidales*, kulat daripada keluarga *Dematiaceae*, satu pencilan kulat daripada filum Deutromikota serta dua pencilan kulat adalah daripada genus *Penicillium*. Terdapat satu kulat yang tidak dapat dikenal pasti kerana kulat tersebut mempunyai miselium steril. Gambar koloni di atas agar SDA serta ciri hifa dan konidiofor ditunjukkan dalam Rajah 1.

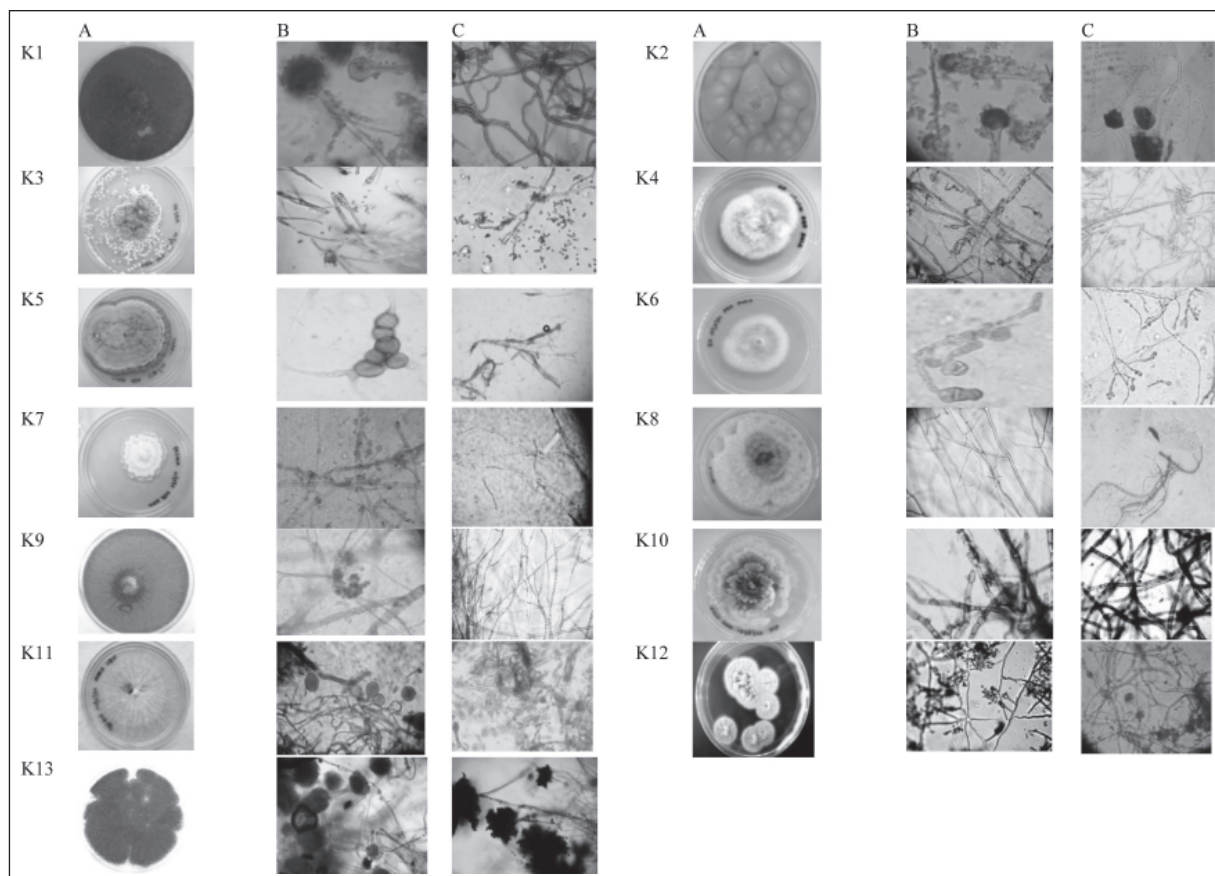
**Jadual 1.** Ciri-ciri makroskopik koloni pencilan kulat endofit daripada *Asplenium nidus* yang dihidupkan atas medium PDA

Pencilan Kulat	Ciri-ciri makroskopik						
	Warna Koloni	Warna di bawah piring	Tepian kolon	Resapan pigmen	Penzonan	Tekstur miselium	Kadar Pertumbuhan*
K1	Hijau tua	Kuning	Tidak rata	Tiada	Tiada	Berserbuk	Cepat
K2	Perang kuning	Kuning	Tidak rata	Kuning	Tiada	Berserbuk	Cepat
K3	Hijau tua dan berjalur putih di bahagian tepi	Putih	Tidak rata	Tiada	Tiada	Berserbuk	Cepat
K4	Koloni bewarna putih merah jambu	Putih merah jambu	Rata	Tiada	Tiada	Berkapas	Cepat
K5	Koloni bewarna koko tua	Koloni bewarna koko tua	Rata	Tiada resapan pigmen	Tiada	Licin, berkapas dan mendatar	Perlahan
K6	Koloni bewarna putih kelabu	Koloni bewarna putih kelabu	Rata	Tiada resapan pigmen	Tiada	Berkapas	Cepat
K7	Koloni bewarna putih	Koloni bewarna putih	Tidak rata	Tiada resapan pigmen	Tiada	Berkapas	Perlahan
K8	Koloni bewarna kelabu-hijau	Koloni bewarna kelabu-hijau	Rata	Tiada resapan pigmen	Tiada	Lembut, licin dan berkapas	Cepat
K9	Koloni bewarna koko hitam	Koloni bewarna koko tua	Rata	Tiada resapan pigmen	Tiada	Licin dan berbulu	Agak cepat
K10	Koloni bewarna putih dan kelabu hijau di tengah	Koloni bewarna putih dan kelabu hijau di tengah	Tidak rata	Tiada resapan pigmen	Ada	Berkapas	Cepat
K11	Koloni bewarna putih kekuningan	Koloni bewarna kuning koko	Rata	Resapan pigmen kuning di keseluruhan agar	Tiada	Berbulu dan mendatar	Cepat
K12	Koloni bewarna hijau muda dan berjalur kuning di tepi	Koloni bewarna kuning	Rata	Tiada resapan pigmen	Tiada	Berkapas	Cepat
K13	Koloni bewarna hitam	Koloni bewarna putih	Rata	Tiada resapan pigmen	Tiada	Berserbuk	Cepat

\* Kadar pertumbuhan (miselium memenuhi piring): Agak cepat: <5 hari, Cepat 5-7 hari; Perlahan Selepas 7 hari pengeraman

**Jadual 2.** Ciri-ciri mikroskopik pencilan kulat endofit daripada *Asplenium nidus* yang dihidupkan atas medium PDA

Pencilan Kulat	Ciri-ciri makroskopik				Kelas, Famili Filum, Spesies Jangkaan
	Struktur hifa	Struktur konidiofor	Struktur fialid	Struktur spora atau jasad buah	
K1	Bersepta	Konidiofor terbentuk secara tunggal di atas sel akar dan mempunyai penghujung vesikel yang tidak bercabang dan berdingin licin.	Fialid uniseratia yang menutupi sebahagian atas permukaan vesikel dan disokong oleh sel metula	Fialokonidia iaitu konidia dalam bentuk rantaian atas fialid uniseratia pada vesikel	<i>Aspergillus fumigatus</i>
K2	Bersepta	Konidiofor terbentuk secara tunggal di atas sel akar dan mempunyai penghujung vesikel yang tidak bercabang dan berdingin licin dan hialin.	Fialid biseratia yang menutupi sebahagian atas permukaan vesikel dan disokong oleh sel metula	Fialokonidia iaitu konidia dalam bentuk rantaian atas fialid biseratia pada vesikel	<i>Aspergillus terreus</i>
K3	Bersepta	Konidiofor bercabang	Fialid terkumpul seperti bentuk berus berumpun dan bercabang	Fialokonidia iaitu konidia dalam bentuk rantaian pada fialid	<i>Penicillium</i> sp.
K4	Bersepta	Tiada struktur konidiofor	Fialid panjang, berbentuk silinder tetapi tidak bercabang dan mempunyai collarette yang dapat dicerap pada bahagian puncak fialid bercabang	Makrokonidia melengkung, multisel dan mempunyai sel kaki (foot cell)	<i>Fusarium</i> sp.
K5	Bersepta	Bercabang, hialin dan berdingin licin	Tiada struktur fialid	Konidia berbentuk silinder dan sedikit melengkung dengan tiga atau lebih sel tengah berdingin tebal dan berwarna kecoklatan. Sel hujung adalah hialin dengan satu atau lebih dari satu ekor (seta).	<i>Pestalotopsis</i> sp.
K6	Bersepta	konidiofor gelap dan hialin, bercabang	Tiada struktur fialid	Porokonidia dihasilkan pada konidiofor	<i>Drechslera</i> sp.
K7	Bersepta	Konidiofor bercabang	Tiada struktur fialid	Miselium steril tanpa kehadiran konidia dan terdapat pembentukan klamidospora	Tidak dapat dipastikan
K8	Bersepta	Konidiofor lurus dan panjang	Tiada struktur fialid	Picnidia iaitu jasad buah aseksual yang menghasilkan konidia kecil	<i>Phoma</i> sp.
K9	Bersepta	Konidiofor panjang, hialin dan tidak bersepta	Tiada struktur fialid	Konidia berbentuk tidak tetap dan bergumpal atau terkumpul dengan banyak pada hujung struktur konidiofor	Filum Deuteromikota
K10	Bersepta dan berpigmen	Tiada cerapan konidiofor dapat dilihat	Tiada struktur fialid	Konidia bulat dan berwarna perang	Famili <i>Dematiaceae</i> .
K11	Bersepta	Koniofor tidak bercabang	Tiada struktur fialid	Konida dihasilkan di dalam jasad buah picnidia berbentuk bulat atau sedikit bujur, hialin dan berdingin tebal	Kelas <i>Sphaeropsidales</i>
K12	Bersepta	Koniofor tidak bercabang	Fialid terkumpul seperti bentuk berus berumpun dan bercabang	Fialokonidia iaitu konidia dalam bentuk rantaian pada fialid	<i>Penicillium</i> sp.
K13	Bersepta	Konidiofor terbentuk secara tunggal di atas sel akar dan mempunyai penghujung vesikel yang tidak bercabang dan berdingin licin dan hialin	Fialid biseratia yang menutupi seluruh permukaan vesikel dan disokong oleh sel metula	Fialokonidia iaitu konidia dalam bentuk rantaian atas fialid biseratia pada vesikel	<i>Aspergillus niger</i>



**Rajah 1.** Cerapan makroskopik K1-K13 pada agar SDA (A), cerapan mikroskopik dengan pembesaran 1000x (B) dan 400x (C).

### Aktiviti antibakteria

Hanya pencilan kulat K2, K8 dan K9 menunjukkan zon perencatan terhadap bakteria ujian. Pencilan kulat K2 menunjukkan zon perencatan terhadap bakteria ujian *S. pyogenes* (diameter 11 mm). Diameter zon perencatan pencilan kulat K9 dan K8 masing-masing terhadap *S. typhi* adalah 10 mm dan 8 mm. Secara keseluruhannya, diameter perencatan yang ditunjukkan oleh ketiga-tiga pencilan kulat di atas lebih kecil berbanding dengan diameter zon perencatan yang ditunjukkan oleh cakera antibiotik kawalan vankomisin dan kloramfenikol.

### PERBINCANGAN

Dalam kajian ini, terdapat kepelbagaian pencilan kulat endofit yang berjaya dipencilkan pada pelbagai bahagian tisu *A. nidus*. Suryanarayanan dan Vijaykrishna (2001) melaporkan bahawa terdapat perbezaan dari segi kekerapan kualitatif dan kuantitatif pengkolonian serta kespesifikan tisu dan organ oleh endofit dalam organ-organ tumbuhan hos yang berlainan spesies. *Aspergillus fumigatus* (K1), *A. terreus* (K2), *A. niger* (K13) serta

K9 merupakan ahli dalam genus *Aspergillus* dalam filum Deuteromikota. Spesies tersebut sering terdapat dalam persekitaran dan bertindak sebagai saprotrof yang penting dalam penyahkomposan tumbuhan termasuk dalam fungsi mengitar karbon dan nitrogen. Walaupun *A. fumigatus* disifatkan sebagai patogen pada manusia, hasil fermentasi dalam makmal menunjukkan ianya mengandungi alkaloid indol dengan aktiviti antimetabolit (Cui, 1996). Dalam kajian ini, pencilan *A. terreus* dan K9 yang diperoleh daripada endofit mempunyai aktiviti antibakteria yang lemah. Mathan *et al.* (2013) pernah memencilkan *A. terreus* KC 582297 daripada endofit dengan aktiviti antimikrob dengan julat luas. *Aspergillus niger* dikulturkan untuk kegunaan industri bagi menghasilkan asid sitrik (E330) dan asid glukonik (E574) serta telah dinilai sebagai boleh diterima untuk pengambilan harian (Schuster *et al.*, 2002). Selain itu, *A. niger* juga boleh menghasilkan beberapa enzim seperti glukoamilase dan pektinase.

Pencilan K3 dan K12 merupakan ahli dalam genus *Penicillium* berjaya dipencilkan daripada daun. Oliveira *et al.* (2009) melaporkan bahawa dua pencilan *Penicillium* sp. yang dipencilkan daripada daun *Alibertia macrophylla* menghasilkan

bahan bioaktif antikulat dan penindas aktiviti asetilkolinesterase.

Pencilan K4 dikenalpasti sebagai genus *Fusarium*. Kulat dalam genus ini mempunyai ciri berfilamen, bersifat saprofit, terdapat dalam tanah dan sering didapati bersekutu dengan tumbuhan. Endofit dalam genus ini banyak dipencilkan daripada daun *Nothapodytes foetida* iaitu sejenis tumbuhan ubatan dengan aktiviti antibakteria (Musavi dan Balakrishnan, 2013). Namun dalam kajian ini, pencilan *Fusarium* yang diperolehi tidak mempunyai aktiviti antibakteria.

Pencilan K5 dikenalpasti sebagai *Pestalotopsis* sp. adalah askomiset yang selalunya dikaitkan sebagai patogen tumbuhan. *Pestalotiopsis microspora* adalah satu spesies endofit yang boleh memecahkan dan mencerna poliuretana (Russell *et al.*, 2011). Kulat ini berpotensi besar dalam proses degradasi plastik. Pencilan K6 yang dipencilkan daripada akar adalah daripada genus *Drechslera* yang sering dikaitkan sebagai patogen tumbuhan. Namun begitu, beberapa aktiviti lain seperti amilolitik, pektinolitik, selulolitik dan lipolitik pernah ditunjukkan oleh genus ini (Sunitha *et al.*, 2013).

Pencilan K8 yang dikenal pasti sebagai *Phoma* sp. dipencilkan daripada bahagian daun *A. nidus*. *Phoma* sp. merupakan endofit mikoriza yang sering dipencilkan daripada akar dan dikaitkan dengan kesihatan tumbuhan (Macia'-Vicente *et al.*, 2008). *Phoma sorghina* iaitu sejenis kulat endofit yang dipencilkan daripada daun *T. diversifolia* dilaporkan menghasilkan 3 terbitan baru anthraquinon yang berpotensi dalam aktiviti antimikrob (Borges dan Pupo, 2006). Pencilan K8 didapati merencat bakteria *S. typhi* dalam saringan awal. Kehadiran terbitan kimia baru harus dikaji seterusnya dalam pencilan *Phoma* tersebut.

Ketiadaan struktur pembiakan serta spora yang boleh dikenal pasti melalui ciri makroskopik merumitkan pengenalanpastian sehingga peringkat genus bagi pencilan kulat K7, K10 dan K11. Kumpulan Fungi Imperfecti atau Deuteromikota kebanyakan spesiesnya lebih merupakan patogen tumbuhan. Kajian sebelum ini bagi memencilkan mikrob daripada tanah di Taman Paku Pakis, UKM mendapati bahawa sebanyak tujuh pencilan kulat daripada kumpulan Deuteromikota telah dapat dipencilkan (Mohamad Razid *et al.*, 2010). Pengenalpastian lebih tepat genus dan spesies bagi ahli dalam kumpulan ini menggunakan sistematik molekul adalah digalakkan berbanding pengenalanpastian makroskopik dan mikroskopik.

Aktiviti antimikrob yang dihasilkan oleh pencilan-pencilan kulat K2, K8 dan K9 didapati terhad dan lemah. Hal ini demikian kerana kulat endofit yang menghasilkan bahan metabolit sekunder dalam medium pengkulturan tertentu

mungkin tidak dapat menghasilkan bahan aktif yang sama dalam medium pengkulturan lain setelah dipencilkan (Schulz *et al.*, 1995). Selain itu, kulat endofit yang dipencilkan bukan daripada hos semulajadinya boleh menyebabkan perubahan corak penghasilan bahan metabolit sekunder (Giménez *et al.*, 2007).

Kajian ini telah sedikit sebanyak menyumbang kepada maklumat kepelbagaian endofit yang terdapat pada paku pakis langsuir atau *A. nidus*. Potensi sebagai antibakteria adalah lemah namun aktiviti biologi yang mungkin dimiliki oleh pencilan yang diperolehi masih terbuka untuk dikaji. Penghargaan kepada geran penyelidikan DPP-2014-021.

## PENGHARGAAN

Pembekalan paku pakis *A. nidus* dari Taman Paku Pakis, Universiti Kebangsaan Malaysia yang diselenggara oleh Encik Muhd. Ruzi Abd Rahman dan Prof. Madya Dr. Noraini Talip amat dihargai.

## RUJUKAN

- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D. & Kursar, T.A. 2000. Are tropical fungi endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, **3**: 267-274.
- Arnold, A.E., Mejia, L.C., Kyllö, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N. & Herre, E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Ecology*, **100**: 15649-15654.
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Seldin, L. & Döbereiner, J. 1986. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **36**: 86-93.
- Barnett, H.L. & Hunter, B.B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Macmillan Publishing Co., New York. 218 pp.
- Borges, W.S. & Pupo, M.T. 2006. Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **17(5)**: 929-934.
- Clay, K. 1988. Fungal Endophytes of Grasses: Their Potential As Biocontrol Agents. *Ecology*, **69**: 2-9.
- Cui, C.B., Kakeya, H. & Osada, H. 1996. Spirotryprostatin B, a novel mammalian cell cycle inhibitor produced by *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of Antibiotics*, **49(8)**: 832-835.

- Gemma, J.N. & Koske, R.E. 1995. Mycorrhizae in Hawaiian Epiphytes. *Pacific Science*, **49(2)**: 175-180.
- Giménez, C., Cabrera, R., Reina, M. & González, C. 2007. Fungal endophytes and their role in Plant Protection. *Current Organic Chemistry*, **1**: 707-720.
- Gunatilaka, A.A.L. 2006. Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products*, **69**: 509-526.
- Hallmann, J., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W. & Quadthallmann, A. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, **43**: 895-914.
- Hyde, K.D. & Soyong, K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, **33**: 163-173.
- Macia'-Vicente, J.G., Jansson, H.B., Mendgen, K. & Lopez-Llorca, L.V. 2008. Colonization of barley root by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Canadian Journal of Microbiology*, **54**: 600-609.
- Mathan, S., Subramanian, V. & Nagamony, S. 2013. Optimization and antimicrobial metabolite production from endophytic fungi *Aspergillus terreus* KC 582297. *European Journal of Experimental Biology*, **3(4)**:138-144.
- Mohamad Razid, B.A.S., Herryawan Ryadi, B.E.D. & Nazlina, I. 2010. Kepelbagaian mikroorganisma tanah daripada Taman Paku Pakis, Universiti Kebangsaan Malaysia. *Malaysian Applied Biology*, **39(2)**: 31-39.
- Musavi, S.F. & Balakrishnan, R.M. 2013. Biodiversity, antimicrobial potential and phylogenetic placement of an endophytic *Fusarium oxysporum* NFX 06 Isolated from *Nothapodytes foetida*. *Journal of Mycology*, Article ID 172056. 10 pgs
- Oliveira, C.M., Silva, G.H., Regasini, L.O., Zanardi, L.M., Evangelista, A.H., Young, M.C., Bolzani, V.S. & Araujo, A.R. 2009. Bioactive metabolites produced by *Penicillium* sp. 1 and sp. 2, two endophytes associated with *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C (Journal of Biosciences)*. **64(11-12)**: 824-830.
- Reiter, B., Pfeifer, U., Schwab, H. & Sessitsch, A. 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 2261-2268.
- Rodriguez, R.J., White, J.F.J., Arnold, A.E. & Redman, R.S. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, **182**: 314-330.
- Russell, J.R., Huang, J., Anand, P. & Kucera, K. 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, **77(17)**: 6076-6084.
- Schulz, B., Sucker, J., Aust, H.J., Krohn, K., Jones, P.G. & Doring, D. 1995. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* spp. *Mycological Research*, **99**: 1007-1015.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C. & Van Dijck, P.W. 2002. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59(4-5)**: 426-435.
- Strobel, G. & Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**: 491-502.
- Sunitha, V.H., Nirmala Devi, D. & Srinivas, C. 2013. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World Journal of Agricultural Sciences*, **9(1)**: 1-9.
- Suryanarayanan, T.S. & Vijaykrishna, D. 2001. Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*. *Fungal Diversity*, **8**: 155-161.
- Swatzell, L.J., Powell, M.J. & Kiss, J.Z. 1996. The relationship of endophytic fungi to the gametophyte of the fern *Schizaea pusilla*. *International Journal of Plant Sciences*, **157**: 53-62.
- Verma, V.C., Kharmar, R.N. & Strobel, G.A. 2009. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. *Natural Product Communications*, **4**: 1511-1532
- Wang, Y. & Guo, L.D. 2007. A comparative study of endophytic fungi in needles, bark, and xylem of *Pinus tabulaeformis*. *Canadian Journal of Botany*, **85**: 911-917.

