

Potensi Aktinomisetes Asal Tanah Perakaran Mangrove Segara Anakan Cilacap Sebagai Penghasil Anti-fungi Terhadap *Candida albicans*

Rifqi Aulia Akbar^{*}, Dini Ryandini, Dyah Fitri Kusharyati

Faculty of Biology, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia

^{*}Corresponding author, email: rifqiauliaakbar@gmail.com

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14/07/2017

Received in revised form 12/10/2017

Accepted 12/10/2017

Keywords:

Candida albicans

Actinomycetes

Antifungal

Mangrove root soil

DOI: 10.22146/jtbb.26554

ABSTRACT

Isolation of actinomycetes has been done from mangrove soil sample of Segara Anakan Cilacap. This research aimed to know the potency of actinomycetes as an antifungal producer, and to measure antifungal activity produced by actinomycetes based on diameter zone inhibition and to know the characteristic of the bioactive compound with Thin Layer Chromatography method. The result of the study has been isolated 24 actinomycetes isolates, 15 of them had potential as an antifungal producer, which inhibited the growth of *Candida albicans*. Period of fermentation significantly affected to the activity of the antifungal compound. The highest inhibitory zone was formed by an antifungal extract from actinomycetes C with a range zone 19.7 mm in length at 14th days fermentation, which was extracted with ethyl acetate solvent (1: 1 v / v). The characteristic of a bioactive compound of the actinomycetes C has a Rf value 0.5 in the solvent n-butanol, acetic acid and water (3: 2: 1 v / v / v).

1. Pendahuluan

Aktinomisetes merupakan bakteri Gram positif berbentuk filamentus dan mampu membentuk spora. Dibandingkan dengan kelompok bakteri lain, aktinomisetes mengalami pembelahan kompleks dan dapat menghasilkan beragam senyawa bioaktif (Dewi, 2014). Kelompok utama dari ordo *Actinomycetales* adalah *Actinoplanetes*, *Maduromycetes*, *Nocardioform*, *Actinomycetes* dan *Streptomyces* (Brown-Elliott *et al.*, 2006).

Habitat utama aktinomisetes, terutama *Streptomyces*, adalah di tanah. *Streptomyces* menyusun kurang lebih 70% dari mikroorganisme yang ada di tanah (Rao, 2001). *Streptomyces* dapat diisolasi pada berbagai lingkungan, bahkan dari lingkungan yang tidak biasa (*unusual environment*). Salah satu contoh lingkungan yang dapat menjadi sumber isolat aktinomisetes adalah pada tanah ekosistem mangrove, salah satunya yaitu kawasan mangrove Segara Anakan Cilacap.

Aktinomisetes mempunyai kemampuan menghasilkan senyawa bioaktif berupa anti-fungi. Salah satu senyawa anti-fungi yang dihasilkan memiliki kemampuan untuk

menghambat pertumbuhan *Candida*. Jamur *Candida* merupakan penyebab infeksi oportunistik (Kandidiasis) pada manusia yang disebabkan oleh spesies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, dan *C. dubliniensis* (Brooks *et al.*, 2004). Kandidiasis menyerang rongga mulut, bibir vagina dan saluran pencernaan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi aktinomisetes tanah dari perakaran mangrove di Segara Anakan Cilacap sebagai penghasil senyawa anti-fungi terhadap *C. albicans*.

2. Bahan dan Cara Kerja

2.1. Isolasi Aktinomisetes

Isolasi aktinomisetes dilakukan berdasarkan metode dari Wardana (2012). Sampel tanah diambil dari daerah rhizosfer tumbuhan *Avicennia marina* di kawasan mangrove Segara Anakan Cilacap, Jawa Tengah. Sampel tanah ditimbang sebanyak 1 gram dan dilakukan pengenceran berseri dalam larutan NaCl fisiologis hingga pengenceran 10^{-3} . Dua pengenceran terakhir dari masing-masing sampel ditanam dengan metode tuang secara *duplo* pada medium *Starch Casein Nitrate Agar* (SCNA) dan diinkubasi selama 7 hari.

Koloni yang tumbuh dimurnikan dengan teknik *quadrant streak* pada medium SCNA.

2.2. Penapisan primer

Penapisan primer dilakukan menggunakan metode gores setengah cawan berdasarkan Kang *et al.*, (2010). Isolat yang memiliki ciri kenampakan koloni aktinomisetes digoreskan hingga memenuhi setengah dari permukaan medium PDA, kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang hingga terjadi sporulasi. Isolat *C. albicans* digoreskan tunggal dengan jarak 5 mm secara tegak lurus terhadap isolat aktinomisetes. Biakan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Aktivitas anti-fungi diamati secara kualitatif dengan cara melihat jarak penghambatan pertumbuhan *C. albicans* terhadap koloni bakteri aktinomisetes. Isolat aktinomisetes yang menunjukkan aktivitas penghambatan tertinggi diseleksi lebih lanjut.

2.3. Penapisan sekunder

Penapisan sekunder dilakukan berdasarkan Oskay (2009). Isolat terpilih diperbanyak jumlahnya pada medium SCNA dengan metode *streak* kontinyu rapat dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang untuk dijadikan inokulum. Koloni yang tumbuh diambil 5 *plug* dengan *cork borer* dan ditumbuhkan pada medium SCNB 100 ml. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 7 hari. Filtrat bebas sel diperoleh dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Kertas cakram berukuran 6 mm ditetesi 20 µl filtrat bebas untuk uji penghambatan terhadap *C. albicans*. Biakan diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur diameternya dengan penggaris.

2.4. Karakterisasi isolat Aktinomisetes

Karakterisasi isolat aktinomisetes meliputi pengamatan secara morfologi dan penggunaan sumber karbon. Pengamatan morfologi meliputi pewarnaan Gram, warna miselium aerial, warna miselium substrat, bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni, permukaan koloni dan ukuran koloni. Sumber karbon yang digunakan berupa glukosa, raffinosa, mannose, laktosa, arabinosa, sukrosa, fruktosa, xylosa, dan maltosa. Hasil karakterisasi dibandingkan dengan buku *Bergey's Manual Determinative of Bacteriology* Tahun 1994.

2.5. Produksi senyawa anti-fungi

Senyawa anti-fungi diproduksi menggunakan modifikasi metode Sharma dan Parihar (2010). Inokulum

fermentasi berasal dari isolat aktinomisetes yang ditumbuhkan secara *streak* rapat pada medium SCNA dan diinkubasi selama 7 hari. Sebanyak 5 *plug* inokulum yang telah dilubangi dengan *cork borer* diinokulasi ke dalam 400 ml medium *Starch Casein Nitrate Broth* (SCNB). Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 7, 14 dan 21 hari. Filtrat bebas sel yang mengandung senyawa anti-fungi diperoleh dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring Whatman.

2.6. Ekstraksi senyawa anti-fungi

Filtrat diekstraksi menggunakan pelarut etil-asetat dengan perbandingan antara filtrat dengan pelarut sebesar 1:1 (v/v) dan dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali. Lapisan bagian atas yang mengandung senyawa anti-fungi diuapkan menggunakan alat *rotatory evaporator* pada suhu 70°C (titik didih pelarut) hingga didapatkan ekstrak kasar (Ayari *et al.*, 2016).

2.7. Uji aktivitas penghambatan ekstrak senyawa anti-fungi

Uji aktivitas dilakukan dengan metode difusi kertas cakram berdasarkan modifikasi metode Purwantini dan Wahyuono (2004) serta Prakash *et al.* (2013). Ekstrak kasar sebanyak 20 µl ditetaskan ke dalam kertas cakram berdiameter 6 mm (Whatman No. 1) untuk uji aktivitas penghambatan terhadap *C. albicans*. Biakan kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur diameternya menggunakan penggaris.

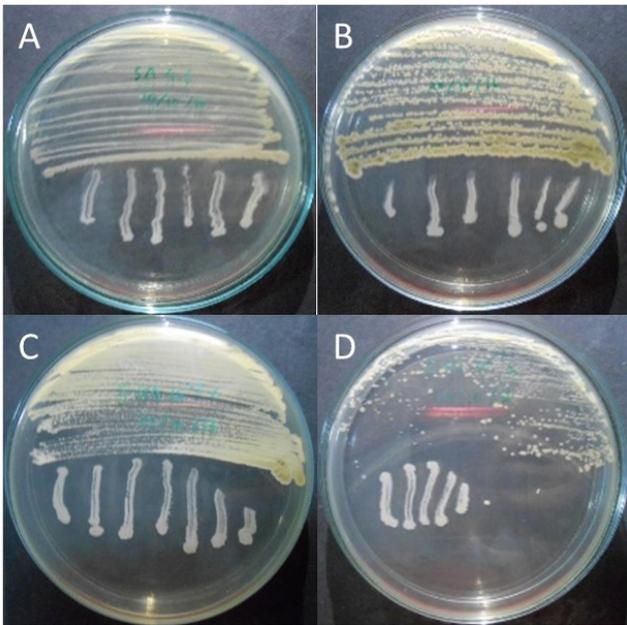
2.8. Karakterisasi senyawa anti-fungi

Karakterisasi dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) berdasarkan modifikasi metode Ayari *et al.* (2016). Sebanyak 10 µl ekstrak senyawa anti-fungi ditetaskan pada lempeng kromatografi (*TLC aluminium sheet silica gel 60 F₂₅₄*). Lempeng direndam dalam larutan eluen berupa campuran n-butanol, asam asetat dan akuades dengan perbandingan 3:2:1. Lempeng dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama 2 jam. Lempeng kemudian diamati menggunakan UV Transilluminator dengan panjang gelombang 254 nm dan disemprot dengan larutan ninhidrin (0,2 %). *Spot* yang terbentuk diukur nilai Rf.

3. Hasil

3.1. Isolasi Aktinomisetes dan skrining aktivitas anti-fungi

Isolasi menggunakan medium selektif SCN menghasilkan 24 isolat yang diduga sebagai aktinomisetes berdasarkan ciri morfologi koloni berupa adanya miselium



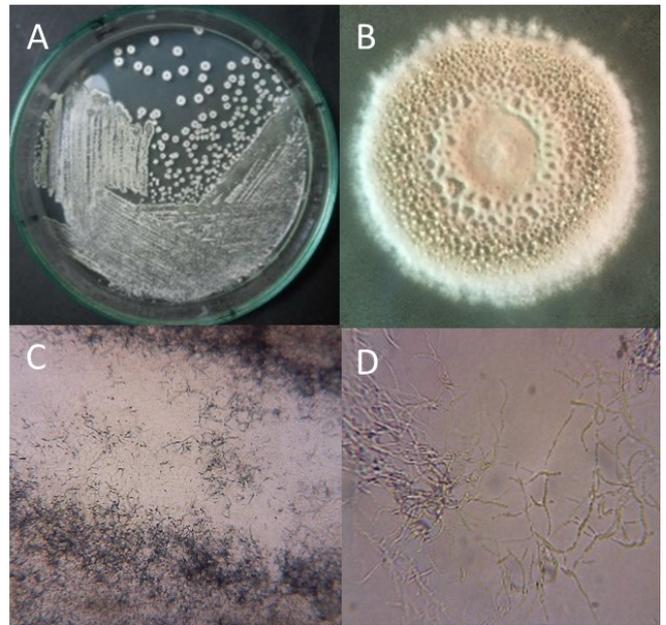
Gambar 1. Hasil Skrining Primer Aktivitas Anti-fungi Isolat Aktinomisetes. A (-), B (+), C (++), dan D (+++).

aerial dan substrat (Gambar 2). Setelah dilakukan skrining primer, ditemukan 15 isolat yang menunjukkan potensi sebagai penghasil senyawa anti-fungi, dan dipilih 1 isolat dengan aktivitas penghambatan tertinggi (Tabel 1, Gambar 1). Hasil skrining sekunder dari isolat C juga menunjukkan adanya aktivitas anti-fungi membentuk zona hambat di sekitar kertas cakram dengan diameter 8 mm.

Tabel 1. Pengamatan Skrining Primer.

No.	Kode Isolat	Aktivitas Penghambatan
1	A	++
2	B	++
3	C	+++
4	D	-
5	E	+
6	F	+
7	G	+
8	H	++
9	I	-
10	J	+
11	K	-
12	L	+
13	M	+
14	N	-
15	O	-
16	P	-
17	Q	-
18	R	++
19	S	+
20	T	-
21	U	++
22	V	-
23	W	+
24	X	++

Keterangan : (-) = tidak berpotensi; (+) = cukup berpotensi; (++) = berpotensi; (+++) = sangat berpotensi



Gambar 2. Karakter Kultur (A), Morfologi Koloni (B), miselium substrat dan aerial (C), dan Tipe Rantai Spora (D) Isolat Aktinomisetes C

3.2. Karakterisasi morfologi dan penggunaan sumber karbon isolat Aktinomisetes C

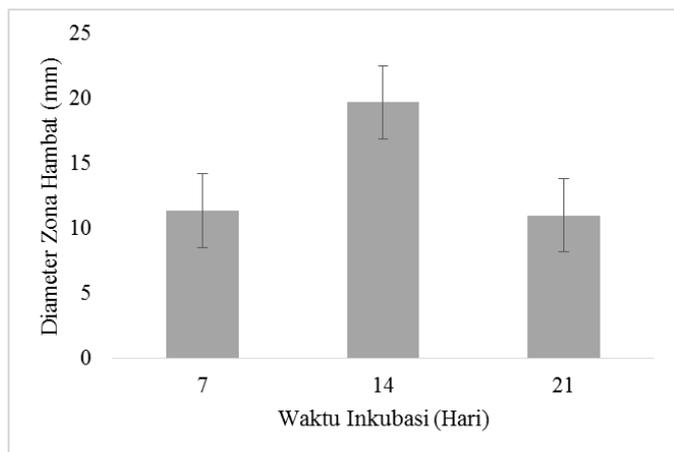
Isolat Aktinomisetes C memiliki karakter dinding sel Gram positif, miselium substrat berwarna kuning muda, miselium aerial berwarna krem, bentuk koloni sirkuler, tepi koloni filiform, elevasi koloni *raised*, permukaan koloni *powdery*, ukuran koloni antara 4-6 mm, memiliki tipe rantai spora *straight* (Gambar 2), dan kemampuan menggunakan sumber karbon yang dirangkum pada Tabel 2.

Tabel 2. Penggunaan jenis sumber karbon oleh isolat Aktinomisetes

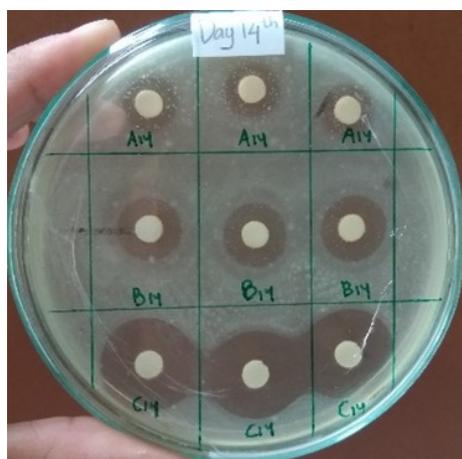
Jenis Gula	Penggunaan Sebagai Sumber Karbon
Fruktosa	+
Sukrosa	-
Xylosa	+
Maltosa	+
Laktosa	+
Mannosa	+
Raffinosa	-
Arabinosa	+
Glukosa	+

3.3. Pengaruh periode waktu inkubasi terhadap aktivitas anti-fungi

Terdapat pengaruh periode waktu inkubasi terhadap aktivitas senyawa anti-fungi yang dihasilkan oleh aktinomisetes C (Gambar 3). Diameter zona hambat dari aktivitas ekstrak senyawa yang diperoleh dari ekstraksi medium fermentasi hari ke-7, 14 dan 21 berturut-turut sebesar 11.3 mm, 19,7 mm, dan 11 mm. Aktivitas penghambatan tertinggi ditunjukkan oleh ekstrak senyawa anti-fungi yang diperoleh dari ekstraksi medium fermentasi hari ke-14 menggunakan pelarut etil asetat (Gambar 4).



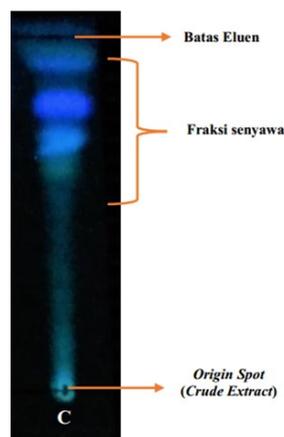
Gambar 3. Efek Periode Inkubasi terhadap Aktivitas Anti-fungi Isolat Aktinomisetes C dalam menghambat *C. Albicans*



Gambar 4. Aktivitas Ekstrak Anti-fungi Isolat Aktinomisetes C yang menghambat *C. albicans*

3.4. Karakterisasi Senyawa Anti-fungi

Senyawa anti-fungi yang diekstrak menggunakan pelarut etil asetat menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap isolat uji, dan setelah dianalisis menggunakan KLT dengan menghitung perbandingan antara jarak *spot* yang terbentuk terhadap jarak tempuh eluen didapatkan 4 fraksi senyawa dengan masing-masing nilai Rf sebesar 0,64; 0,72; 0,83; dan 0,95 (Gambar 5).



Gambar 5. Profil KLT pemisahan senyawa aktif dari ekstrak kasar isolat aktinomisetes menggunakan fase gerak (eluen) kloroform, etil asetat, dan asam asetat (3:3:1 v/v)

4. Pembahasan

Berdasarkan karakter morfologi dan penggunaan sumber karbon yang telah dibandingkan dalam buku *Bergey's Manual Determinative of Bacteriology*, isolat aktinomisetes C yang memiliki aktivitas anti-fungi tertinggi teridentifikasi ke dalam genus *Streptomyces*. Identifikasi aktinomisetes hingga tingkat genus dapat meliputi beberapa karakter diantaranya, morfologi miselium, morfologi konidia, morfologi sporangia, dan struktur lainnya. Genus *Streptomyces* mempunyai karakter miselium dengan berbagai macam bentuk diantaranya *straight*, *flexuous*, *Retiflexible*, *spiral* dan *Loop* (Goodfellow *et al.*, 2012). Menurut Holt *et al.*, (1994), salah satu ciri khas dari genus *Streptomyces* adalah koloninya ditutup dengan miselium udara bebas dan hifa dikelilingi oleh selubung inti (*sheath*) hidrofobik mengarah dari permukaan koloni ke udara.

Seleksi isolat aktinomisetes yang berpotensi sebagai penghasil anti-fungi ditentukan berdasarkan zona penghambatannya terhadap isolat uji. Menurut Arifuzzaman *et al.*, (2010) penentuan dapat diamati secara kualitatif dengan memberi skor dari zona hambat yang terbentuk, yaitu cukup (+), potensial (++) , dan sangat potensial (+++). Aktivitas penghambatan oleh senyawa anti-fungi yang dihasilkan isolat aktinomisetes dapat dilihat dari pertumbuhan koloni *C. albicans* yang kurang baik, bahkan hingga tidak tumbuh sama sekali (Gambar 1). Menurut Oskay (2009), berdasarkan zona hambat yang terbentuk pada penapisan primer (*Primary Screening*) dapat dilanjutkan penapisan sekunder (*Secondary Screening*) untuk memastikan aktivitas senyawa anti-fungi yang dihasilkan oleh isolat aktinomisetes.

Diameter zona hambat dibentuk oleh aktivitas senyawa anti-fungi berbeda-beda disebabkan oleh perbedaan periode waktu inkubasi. Waktu inkubasi optimal untuk menghasilkan anti-fungi diperoleh setelah 14 hari (Gambar 3). Besar kecilnya diameter zona hambat dipengaruhi oleh berbagai hal antara lain jenis medium, jenis isolat, ketersediaan sumber karbon, pH medium, suhu inkubasi, dan lama waktu inkubasi. Ayari *et al.*, (2016), menyatakan bahwa aktivitas anti-fungi isolat *Streptomyces* sp. AA13 terhadap pertumbuhan *C. albicans* dipengaruhi oleh lama waktu inkubasi, sumber karbon, dan suhu inkubasi. terdapat beberapa genus dari aktinomisetes yang mempunyai waktu maksimal untuk memproduksi senyawa metabolit dan selanjutnya akan mengalami penurunan aktivitas. Genus *Streptomyces* mempunyai aktivitas menghasilkan senyawa metabolit khususnya senyawa anti-fungi sebelum waktu fermentasi 14 hari. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Maataoui (2014), bahwa laju kinetika produksi dari senyawa

aktif oleh *Streptomyces* menunjukkan terjadinya produksi maksimal antara hari ke-7 hingga ke-10. Bouras *et al.*, (2013) juga melaporkan bahwa waktu maksimal aktivitas antimikroba oleh *Streptomyces* sp. PP14 diperoleh setelah 7, 8 atau 9 hari fermentasi. Dapat diambil kesimpulan bahwa produk senyawa metabolit dihasilkan pada waktu pertumbuhan optimal.

Hasil karakterisasi senyawa aktif menggunakan metode KLT diperoleh nilai Rf sebesar 0,64; 0,72; 0,83; dan 0,95 yang divisualisasi menggunakan sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm. Menurut Prakash *et al.*, (2013) pemurnian secara parsial dari ekstrak kasar dari medium kultur aktinomisetes (*Streptomyces rochei* MSA14) melalui TLC dengan sistem pelarut yang bertingkat menunjukkan beragam spot dari suatu senyawa aktif, menunjukkan nilai Rf antara 0.22 hingga 0.99.

5. Kesimpulan

Tanah perakaran tanaman mangrove Segara Anakan Cilacap merupakan salah satu habitat bakteri aktinomisetes khususnya genus *Streptomyces* yang berpotensi sebagai sumber anti-fungi untuk menghambat pertumbuhan *C. albicans*. Periode waktu inkubasi berpengaruh terhadap aktivitas anti-fungi yang dihasilkan oleh isolat aktinomisetes. Karakter senyawa aktif yang dihasilkan mempunyai nilai Rf beragam.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian merupakan bagian dari hibah peningkatan kompetensi Tahun 2017. Penulis menyampaikan terima kasih kepada Dra. Dini Ryandini, M.Si. dan Dra. Dyah Fitri Kusharyati, M.P dan segenap crew Lab. Mikrobiologi Fakultas Biologi UNSOED atas bantuan dan kerja samanya selama pelaksanaan penelitian.

Acuan

Arifuzzaman, M., Khatun, M.R. dan Rahman, H. 2010. Isolation and Screening of Actinomycetes from Sundarbans Soil for Antibacterial Activity. *African Journal of Biotechnology*, 9(29), pp. 4615-4619.

Ayari, A., Morakchi, H., dan Djamila, K.G. 2016. Isolation of Antifungal Activity of Novel Marine Actinomycete, *Streptomyces* sp. AA13 Isolated from Sediments of Lake Ougeria (Algeria) Against *Candida albicans*. *African Journal of Microbiology Research*, 10(6), pp. 156-171.

Bouras, N., Meklat, A., Toumatia, O., Mokrane, S., Holtz, M.D., Strelkov, S.E.m., dan Sabaou, N. 2013. Bioactive Potential of a New Strain of *Streptomyces* sp. PP14 Isolated from Canadian Soil. *African Journal of Microbiology Research*, 7(25), pp. 3199-3208.

Brooks, G.F., Butel, J.S., dan Morse, S.A. 2004. *Jawetz, Melnick, dan Adelberg's Medical Microbiology*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG.

Brown-Elliott, B.A., Brown, J.M., Coville, P.S., dan Wallace, R.J. Jr. 2006. Clinical and laboratory Features of the *Nocardia* spp. Based on Current Molecular Taxonomy. *Clin Microbiol Rev*, 19(2), pp. 59-82.

Dewi, A.K. 2014. Aktivitas Antifungal Isolat Actinomycetes dari Sampel Pasir Gunung Merapi dengan Lama Fermentasi yang Berbeda Terhadap *Candida albicans*. *Skripsi*. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan UMS: Surakarta.

Goodfellow, M., Kampfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W., dan Whitman, W.B. 2012. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 2nd Edition*. Springer, USA.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., dan Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia USA.

Kang, M.J., Strap, J.L. dan Crawford. 2010. Isolation and Characterization of Potent Antifungal Strains of the *Streptomyces violaceusniger* Clade Active Against *Candida albicans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37, pp. 35-41.

Maataoui, H., Iraqui M., Jihani, S., Ibensouda, S., dan Haggoud, A. 2014. Isolation, Characterization and Antimicrobial Activity of a *Streptomyces* Strain Isolated from Deteriorated Wood. *African Journal of Microbiology Research*, 8(11), pp. 1178-1186.

Oskay, M. 2009. Antifungal and Antibacterial Compounds from *Streptomyces* Strains. *African Journal of Biotechnology*, 8(13), pp. 3007-3017.

Prakash, S., Ramasubburayan, R., P. Iyappara, C. Kumar., C.J. Mary., A. Palavesam., dan G. Immanuel. 2013. Screening and Partial Purification of Antifungal Metabolite from *Streptomyces rochei* MSA14: an Isolate from Marine Mining Soil of Southwest Coast of India. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 42(7), pp. 888-897.

- Purwantini, I. dan Wahyuono, S. 2004. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antijamur (*Candida albicans*) dari Kulit Buah Delima (*Punica granatum* L.). *Majalah Farmasi Indonesia* hal 10-14. Universitas Gajah Mada.
- Rao, N.S.S. 2001. *Soil Microbiology, Fourth Edition of Soil Microorganism and Plant Growth*. USA: Science Publisher, Inc.
- Sharma, H., dan Parihar, L. 2010. Antifungal Activity of Extract Obtained from Actinomycetes. *Journal of Yeast and Fungal Research*,1(10), pp. 197-200.
- Wardana, R.S. 2016. Aktivitas Penghambatan Isolat Streptomyces dari Rizosfer *Avicennia marina* Kawasan Segara Anakan Terhadap Bakteri Patogen. Skripsi. Universitas Jenderal Soedirman.