

Isolasi fungi endofit daun mangrove *Avicennia marina* dan uji aktivitasnya sebagai antifungi terhadap *Candida albicans* ATCC

Dwi Khalimah^{1*}, Erny Qurotul Ainy²

Program Studi Biologi, UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta,
Jl. Marsda Adisucipto No. 1 Yogyakarta 55281, Indonesia
Telp. (0274) 519739 Fax. (0274) 540971

¹ dwikhalimah27@gmail.com*; ² erny.ainy@uin-suka.ac.id

*korespondensi penulis

Abstrak

Kandidiasis merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh fungi *Candida albicans*. Pengobatan dengan menggunakan antifungi sintetik memiliki kelemahan salah satunya timbulnya resistensi fungi *Candida albicans* terhadap antifungi. Oleh karena itu, penelitian mengenai sumber alternatif untuk bahan antifungi alami perlu dilakukan dengan memanfaatkan fungi endofit daun mangrove *Avicennia marina*. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat fungi endofit daun mangrove *A.marina* dan mengetahui daya hambatnya terhadap pertumbuhan *C.albicans* serta mengetahui metabolit sekunder yang dihasilkan oleh masing-masing isolat. Penelitian ini diawali dengan isolasi fungi endofit dari daun mangrove *A.marina* yang dilanjutkan dengan uji aktivitas antifunginya terhadap fungi *C.albicans* dengan metode Kirby and Bauer. Terdapat 3 isolat fungi endofit daun yang berbeda yaitu isolat DK 7b, DK 6b dan DK 6c dan masing-masing berbeda dalam aktivitas penghambatannya terhadap pertumbuhan fungi *C. albicans*. Secara morfologi, isolat DK 7b, DK6b, dan DK 6c secara berurutan diidentifikasi sebagai *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., dan *Microsporum* sp. Hasil identifikasi metabolit sekunder menunjukkan bahwa fungi endofit *Penicillium* sp. menghasilkan terpenoid dan tannin, *Aspergillus* sp. memproduksi flavonoid, tannin, dan saponin, sedangkan *Microsporum* sp. terdeteksi menghasilkan terpenoid, flavonoid dan tannin.

Kata kunci: antifungi; *Avicennia marina*; *Candida albicans*; fungi endofit

Abstract

Candidiasis is an infectious disease caused by fungi *Candida albicans*. Treatment using synthetic antifungal has a disadvantage, one of which is the emergence of fungal resistance of *Candida albicans* against antifungal. Therefore, research on alternative sources for natural antifungal agents needs to be carried out by utilizing *Avicennia marina* leaf endophytic fungi. The aim of this study was to obtain endophytic fungi isolates of *A.marina* mangrove leaves and to know its inhibitory effect on *C.albicans* growth and to know the secondary metabolites produced by each isolate. The research was begun with the isolation of endophytic fungi from *A.marina* mangrove leaves, followed by testing the antifungal activity against *C. albicans* fungi by the Kirby and Bauer method. There were 3 different isolates of leaf endophytic fungi, isolates DK 7b, DK 6b and DK 6c and each of them differed in their inhibitory activity against *C. albicans* fungal growth. Morphologically, isolates DK 7b, DK6b, and DK 6c were identified as *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., And *Microsporum* sp. The results of identification of secondary metabolites showed that *Penicillium* sp. produce terpenoids and tannins, *Aspergillus* sp. producing flavonoids, tannins, and

saponins, while *Microsporum* sp. detected produce terpenoids, flavonoids and tannins.

Keywords: antifungal; *Avicennia marina*; *Candida albicans*; endophytic fungi

PENDAHULUAN

Kandidiasis merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh fungi *Candida albicans*. Fungi ini menyerang bagian mukosa oral, gastrointestinal, vagina, dan epitel kulit (Engriyani, 2012). Jumlah penderita penyakit ini mengalami peningkatan sekitar 400.000/tahun (Dantas dkk, 2015). Peningkatan jumlah penderita penyakit kandidiasis memicu tingginya permintaan antifungi sintetik guna mengurangi atau menyembuhkan penyakit tersebut. Menurut Astuti (2012), pada saat ini penggunaan antifungi sintetik telah berkembang luas seiring dengan tingginya kasus kandidiasis, salah satunya ketokonazol. Ketokonazol adalah antifungi sintetik yang paling sering digunakan untuk pengobatan penyakit infeksi fungi. Namun, antifungi sintetik tersebut masih mempunyai kelemahan salah satunya yaitu tingkat ketahanan fungi atau resistensi *C. albicans* terhadap antifungi sintetik semakin tinggi (Engriyani, 2012) sehingga perlu perolehan antifungi alami yang dapat diperoleh dari sumber daya alam yang melimpah namun pemanfaatannya belum optimal.

Studi resistensi tumbuhan terhadap serangan penyakit mendorong penemuan senyawa-senyawa antifungi dari tumbuhan. Adanya fenomena ketahanan tumbuhan secara alami terhadap mikroorganisme menyebabkan pengembangan elusidasi sejumlah senyawa yang mempunyai kandungan antifungi untuk diterapkan dalam pengembangan obat-obatan (Prihatiningsih, 2005). Salah satunya dengan memanfaatkan daun *Avicennia marina*. Daun *A.marina* memiliki efek antifungi sehingga dapat dimanfaatkan untuk menghambat pertumbuhan fungi patogen. Khasiat *A. marina* tersebut disebabkan oleh kandungan bahan-bahan aktif yang dimilikinya. Analisis fitokimia mengungkap bahwa daun *A.marina* memiliki kandungan saponin, tannin, flavonoid dan terpenoid. Kandungan tersebut disebabkan adanya aktivitas fungi endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder di dalam jaringan daun (Asril, 2003). Fungi endofit tumbuh di dalam jaringan tumbuhan hidup tanpa merugikan tumbuhan inangnya. Isolat fungi endofit menghasilkan sejumlah antifungi yang mampu menghambat berbagai fungi patogen seperti *Rizoctonia solani* (Suciatmi *et al.*, 2011). Kemampuan fungi endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sama dengan tanaman inangnya merupakan peluang di bidang kesehatan untuk pencarian bahan baku obat-obatan seperti obat antifungi. Penelitian Sinaga (2009), fungi endofit dari daun waru, daun sirih dan kulit buah manggis dapat digunakan untuk menghambat *C.albicans*. Adapun penelitian

tentang fungi endofit daun mangrove *A.marina* untuk menghambat *C.albicans* ATCC 10231 belum pernah dilakukan. Oleh karena itu, penelitian tentang isolasi fungi endofit daun mangrove *A.marina* dan uji aktivitasnya perlu dilakukan untuk mendapatkan antifungi alami yang diharapkan mampu menghambat pertumbuhan *C.albicans* ATCC 10231.

METODE

Isolasi fungi endofit dari daun mangrove *A.marina*

Isolat fungi endofit diperoleh dari daun *A.marina* yang berasal dari Hutan mangrove Wanatirta Kulonprogo. Isolasi fungi endofit dilakukan di *laminar air flow* (LAF). Sampel daun disterilisasi menggunakan alkohol 70% selama 1 menit dan *sodium hypochlorite* (NaOCl) 99% selama 2 menit. Daun dibilas dengan akuades sebanyak 3 kali kemudian dikeringkan dengan kertas tisu steril serta dilanjutkan dengan penanaman daun di media PDA yang sudah ditambahkan 200 mg/l kloramfenikol untuk mencegah terjadinya kontaminasi bakteri di dalam media. Sampel daun kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 3 hari (Nakagiri *et al.*, 2005).

Isolat fungi endofit yang sudah tumbuh dimurnikan secara bertahap hingga diperoleh biakan murni. Isolat yang telah murni kemudian dibiakkan dalam media PDA dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang untuk dilakukan pengamatan morfologi (Noverita *et al.*, 2009) yang meliputi warna permukaan koloni, tekstur dan arah pertumbuhannya, juga secara mikroskopis yang meliputi tipe hifa dan sporanya.

Fermentasi dan ekstraksi fungi endofit

Fermentasi fungi endofit dilakukan dengan fermentasi cair menggunakan media MEB (*Malt Ekstrak Broth*). Fermentasi dilakukan dengan menginokulasikan tiga keping miselium fungi endofit umur 7 hari yang berukuran 1 cm x 1 cm ke dalam media MEB sebanyak 20 mL. Fermentasi dilakukan di dalam *rotary shaker* selama 18 hari dengan kecepatan putar 140 rpm pada suhu ruang. Hasil fermentasi disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit kemudian disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan miselium. Supernatan diambil kemudian digunakan untuk uji aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans*.

Uji aktivitas antifungi terhadap pertumbuhan *C.albicans*

Uji aktivitas antifungi dilakukan dengan metode difusi *Kirby-Bauer* atau yang disebut dengan kertas cakram (Harmita and Radji, 2004). Kertas cakram steril direndam di dalam supernatan fungi endofit selama 5 menit kemudian diletakkan di atas permukaan kultur *C.albicans* yang sebelumnya telah diinokulasi ke dalam media MHA (*Malt Hinton Agar*) kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu 37°C. Kontrol positif menggunakan ketokonazol 0,5%. Zona hambat yang terbentuk diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong. Terbentuknya zona hambat disebabkan karena adanya metabolit sekunder yang telah disekresikan oleh fungi endofit daun mangrove *A.marina* pada saat fermentasi. Metabolit sekunder tersebut kemudian diidentifikasi secara kualitatif, meliputi uji terpenoid, flavonoid, tannin, dan saponin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini diperoleh 3 isolat fungi endofit dari daun mangrove *A.marina*. Hasil karakterisasi secara makroskopis isolat fungi endofit dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Isolasi dan Identifikasi Morfologi Fungi Endofit dari daun mangrove *A.marina*

No	Isolat	Karakteristik Koloni					Taksa Fungi secara Morfologi
		Warna	Tekstur Permukaan	Tepian	Bentuk	Arah Pertumbuhan	
1.	DK 7b	Hijau tua, putih tulang	Powdery	Tidak Rata	Asimetris	Radial	Penicillium
	DK 6b	Kuning, kuning kecoklatan	Powdery	Rata	Asimetris	Radial	Aspergillus
3.	DK 6c	Putih kekuningan, kuning kecoklatan	Cottony	Rata	Asimetris	Radial	Microsporum

Pada Tabel 1 tampak bahwa secara morfologi diperoleh tiga isolat fungi endofit terseleksi dari daun mangrove *A. marina* dari hutan Mangrove Wanatirta yaitu DK 7b, DK 6b dan DK 6c yang secara dan teridentifikasi sebagai anggota genus *Penicillium*, *Aspergillus* dan *Microsporum*.

Ciri-ciri spesifik *Penicillium* sp adalah hifa bersekat dan bercabang, biasanya tidak berwarna, konidiofora bersekat atau septet dan muncul di atas permukaan yang berasal dari hifa di bawah permukaan hifa bercabang atau tidak bercabang, kepala hifa yang membawa spora berbentuk seperti sapu, dengan sterigmata muncul dalam kelompok, konidium berbentuk rantai karena muncul satu per satu dari sterigmata. Konidium berwarna hijau

kusam (Fardiaz, 1992) dan berbentuk bulat dan tersusun membentuk untaian seperti rantai serta berwarna abu-abu hijau. Pola pertumbuhan *Penicillium* sp. radial dan berlangsung cepat. *Penicillium* merupakan fungi yang dapat berkembang biak secara aseksual dengan membentuk konidium yang berada di ujung hifa. Fungi tersebut dapat tumbuh pada suhu 35°C-37°C. Setiap konidium dapat tumbuh di makanan, roti, buah-buahan busuk, kain, sayuran dan kulit. *Penicillium* sp. penting dalam mikrobiologi industri salah satunya untuk memproduksi antifungi. Contoh spesies penghasil senyawa antifungi yaitu *Penicillium chrysogenum* yang menghasilkan protein PAF yang dapat menghambat pertumbuhan beberapa jenis fungi, seperti *Neurospora crassa* (Samson, 2016).

Menurut Schlegel (1994), *Aspergillus* mempunyai hifa bersekat yang muncul di atas permukaan yang merupakan hifa fertil, koloninya berkelompok, konidiofor bersekat yang muncul dari sel kaki, konidium tersusun seperti mutiara. Konidium-konidium ini berwarna (hitam, coklat, kuning tua, atau hijau) yang memberi warna tertentu pada fungi. *Aspergillus* sp. merupakan fungi yang tersebar secara kosmopolitan karena spora fungsinya mudah disebarkan oleh angin dan mudah tumbuh pada bahan-bahan organik seperti produk-produk pertanian (Praja & Yudhana, 2017). Selain peran yang merugikan, salah satu spesiesnya yaitu *Aspergillus niger* diketahui mampu menghasilkan beberapa jenis enzim seperti α -amilase, selulase, lactase, pectinase, protease, interfase, dan amiloglukosidase (UI Haq *et al.*, 2003). Selain itu, *Aspergillus flavus* juga diketahui menghasilkan senyawa flavonoid dan saponin yang bersifat antifungi (Nurhidayah dkk., 2014).

Microsporium memiliki tepian koloni rata, miselium berwarna putih sampai krem, dengan permukaan seperti kapas yang lebat yang mungkin memperlihatkan beberapa lekukan radial. Koloni biasanya berwarna kuning keemasan hingga kecoklatan, tetapi jenis yang tidak berpigmen juga dapat ditemukan. Konidia biasanya berbentuk *spindle* dengan 5-15 sel dan berdinding tebal. *Microsporium* sp. termasuk ke dalam kelas fungi imperfecti, yang terbagi dalam 3 genus, yaitu *Microsporium*, *Trichophyton*, dan *Epidermophyton* (Ajello, 1959). Fungi ini dapat menghasilkan metabolit sekunder berupa terpenoid, flavonoid dan tannin.

Masing-masing isolat fungi endofit selanjutnya difermentasi selama 18 hari untuk memperoleh metabolit sekunder fungi yang dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans*. Proses fermentasi fungi endofit dilakukan dengan menggunakan media cair karena pada media ini produksi senyawa bioaktif lebih efektif bila dibandingkan dengan media padat (Pokhrel & Ohga, 2007). Dalam fermentasi media cair terdapat agitasi yang memungkinkan nutrisi dalam media dapat terus homogen sehingga mikroba dapat lebih optimal

mengabsorpsi nutrisi tersebut. Agitasi bertujuan untuk meningkatkan suplai oksigen dalam medium (Nurhidayah dkk., 2014). Tahap fermentasi dilanjutkan dengan tahap sentrifugasi kultur fungi endofit untuk memisahkan supernatant dengan pellet. Supernatant kemudian digunakan untuk uji antifungi dengan hasil ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Uji Aktivitas Antifungi Isolat Endofit Daun Mangrove *A. marina* terhadap *Candida albicans* ATCC 10231

Isolat	Rata-rata Zona Hambat (mm)	Kategori Penghambatan
Kontrol +	3,1	Lemah
DK 7b	6,2	Sedang
DK 6b	3,0	Lemah
DK 6c	1,0	Lemah

Hasil uji antifungi tiga isolat fungi endofit daun mangrove *A.marina* terhadap fungi *Candida albicans* menunjukkan adanya perbedaan kekuatan penghambatan dari masing-masing isolat. Hal ini tampak dari perbedaan ukuran diameter zona bening yang terbentuk. Ketokonazol 0,5 % yang digunakan sebagai kontrol positif menghasilkan zona hambat sebesar 3,1 mm yang termasuk dalam kategori lemah. Sebagai rujukan penghambatan positif setelah dibandingkan dengan ketokonazol, isolat DK 7b menunjukkan diameter zona hambat sebesar 6,2 mm yang masuk dalam kategori sedang. Adapun isolat DK 6b dan DK 6c masing-masing menghasilkan zona hambat sebesar 3,1 mm dan 1,0 mm yang termasuk kategori penghambatan yang lemah karena masih di bawah Ketokonazol sebagai acuan penghambatan positif. Menurut Davis & Stout (1971), kategori diameter zona hambat yang terbentuk sangat kuat untuk diameter > 20 mm; kategori kuat 10-20 mm; dan kategori sedang untuk diameter 5-10 mm; serta kategori lemah untuk diameter < 5 mm. Identifikasi senyawa metabolit sekunder dilakukan untuk mendeteksi adanya metabolit sekunder yang terkandung dalam supernatant secara kualitatif. Hasil uji identifikasi metabolit sekunder supernatant fungi endofit daun mangrove jenis *A.marina* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Senyawa Metabolit Sekunder yang Dihasilkan oleh Fungi Endofit Daun Mangrove *A.marina*

Senyawa	Isolat fungi endofit		
	DK 7b	DK 6b	DK 6c
Terpenoid	-	+	+
Flavonoid	+	-	+
Tannin	+	+	+
Saponin	-	+	-

Keterangan:

(-): hasil uji negatif, (+): hasil uji positif

Masing-masing isolat menghasilkan metabolit sekunder yang berbeda-beda dengan mekanisme antifungi yang spesifik. Flavonoid memiliki mekanisme kerja dengan melisiskan membran sel, terpenoid menghambat sintesis kitin, saponin menghambat sintesis dinding sel dan tannin dapat menghambat enzim glikosiltransferase yang berperan dalam sintesis kitin. Isolat DK 7b, DK 6b dan DK 6c yang diisolasi dari daun mangrove *A.marina* mengandung flavonoid, terpenoid, saponin dan tannin. Menurut Pratiwi (2008), senyawa-senyawa tersebut bersifat antifungi. Antifungi ini dapat dikembangkan dalam bidang kesehatan untuk bahan antifungi alami. Keuntungan fungi endofit yaitu siklus hidup fungsinya lebih singkat dibandingkan dengan siklus hidup tanaman, dan senyawa yang diproduksi dapat dibuat dalam skala yang besar dengan menggunakan proses fermentasi (Prihatiningsih, 2006).

SIMPULAN

Hasil isolasi fungi endofit daun mangrove *A. marina* dari hutan Mangrove Wanatirta berupa tiga isolat yaitu DK 7b, DK 6b dan DK 6c yang secara morfologi teridentifikasi sebagai anggota genus *Penicillium*, *Aspergillus* dan *Microsporium*. Terdapat perbedaan aktivitas antifungi dari setiap jenis isolat dalam menghambat pertumbuhan fungi *C.albicans* dan daya hambat tertinggi dihasilkan oleh isolat DK 7b. Uji metabolit sekunder pada isolat fungi endofit menunjukan bahwa DK 7b mengandung terpenoid dan tannin, DK 6b mengandung flavonoid, tannin dan saponin, sedangkan DK 6c mengandung terpenoid, flavonoid dan tannin. Simpulan ditulis dalam bentuk paragraf.

REFERENSI

- Asril, Bahar. 2003. *Fungi, Buku Ajar Penyakit Dalam*. Jakarta: UI.
- Engriyani, R. 2012. Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp) terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* secara In Vitro. [Skripsi]. Bandung: Universitas Pendidikan Indonesia.
- Gandjar, I., Samson, A. Robet., Tweel-Vermeulen, K., Oetari, A., Santoso, I., (1999). *Pengenalan Kapang Tropik Umum*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Nakagiri A, Okane I, Ito T, Kramadibrata K, Suciatmih, Retnowati A. 2005. *A Guidebook to identification of fungi inhabiting mangrove and surrounding area in Indonesia. A report of GTI pilot study on fungal taxonomy*.
- Nurhidayah., Hasanah, U. & Idramsia. (2014). *Pengaruh Ekstrak Metabolit Sekunder Fungi Endofit Tumbuhan *Cotylelobium melanoxylon* dalam Menghambat Pertumbuhan Mikroba Patogen*. Medan: Universitas Negeri Medan.

- Noverita, Dinah Fitria, dan Ernawati Sinaga. 2009. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit dari Daun dan Rimpang *Zingiber ottensii* Val. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 4: 171 -176.
- Pelczar, M. J. & Chan, E. C. S. (2005). *Dasar - Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Pokhrel CP and S Ohga. 2007. Submerged culture conditions for mycelial yield and *products*. *Microb Mol Biol Rev*: 491-502. polysaccharides production by *Lyophyllum decastes*. *Food Chemistry*. 105,641-646.
- Pratiwi. (2008). *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Prihatiningtias, W. (2005). *Senyawa bioaktif Fungi Endofit Akar Kuning (Fibraurea chloroleuca Miers) sebagai senyawa antimikroba*. [Thesis]. Yogyakarta: Sekolah Pascasarjana UGM.
- Purwanto, R. 2008. Peranan Mikroorganisme Endofit sebagai Penghasil Antibiotik. www.kabarindonesia.com. Diakses Februari 2019.
- Radji, M. 2005. *Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit dalam Pengembangan Obat Herbal*. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, II(3): 113–126.
- Samson, A. R. (2016). *Training Course for The Identification of Aspergillus, Penicillium and Talaromyces*. Netherlands: Westerdijk Fungal Biodiversity Institut, Utrecht.
- Sinaga E, Noverita dan Fitria D. 2009. *Daya antibakteri jamur endofit yang diisolasi dari daun dan rimpang lengkuas (Alpinia galangal Sw.)*. *Jurnal Farmasi Indonesia*;4(4):161-70.
- UI Haq, I. S., Ali, M. A. Qadeer & Iqbal, J. (2003). Control of *Aspergillus niger* Morphology to Enhance Citric Acid Production Under Liquid Culture. *Pakistan Journal Botany*, 35(4): 533-539.