

UJI AKTIVITAS ANTIFUNGI ISOLAT ACTINOMYCETES YANG BERASOSIASI DENGAN RIZOSFER PADI (*Oriza sativa*)

Ambarwati^a, Tanti Azizah S^b, Langkah Sembiring^c, dan Subagus Wahyuono^d

^aProdi Kesehatan Masyarakat FIK Universitas Muhammadiyah Surakarta

^bFakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

Jl. A. Yani Tromol Pos I Pabelan Surakarta

^cFakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Jl. Teknika Selatan Yogyakarta

^dFakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Jl. Sekip Utara Yogyakarta

Abstract

Candida albicans and *Aspergillus fumigatus* are two fungi that can cause health problems. *C. albicans* can lead to thrush while *A. fumigatus* can cause aspergillosis. The purpose of this study was to discover the diversity of Actinomycetes isolated from the rhizosphere of rice (*Oriza sativa*) as well as to test the resistance to *C. albicans* and *A. fumigatus*. Results of this study indicated that there were 14 different isolates of actinomycetes that were isolated from the rhizosphere and non-rhizosphere of rice. Among the 14 isolates, three isolates, could inhibit the growth of *C. albicans*, which were RPR 8 isolates with diameter 20 mm (moderate), 42 RPR isolates with diameter 18.33 mm (moderate) and NRPR 6 isolates with diameter 24 mm (medium). However, none of the isolates were able to inhibit the growth of *A. fumigatus*. Based on the results of this study, it could be concluded that the Actinomycetes isolated from the rhizosphere of rice yield were potential as antifungal agent for the treatment of candidiasis.

Key words: Actinomycetes, Rhizosphere Rice, Antifungal Agents, *C.albicans* and *A. fumigatus*

PENDAHULUAN

Munculnya penyakit-penyakit infeksi yang membutuhkan antibiotik serta adanya sifat resistensi mikroorganisme patogen terhadap antibiotik yang ada, telah mendorong penelitian untuk menemukan antibiotik baru dari bakteri (Suarsana *et al.*, 2001) dari fungi (Worang,

2003, Prihatiningtias *et al.*, 2005) dan dari Actinomycetes (Oskay *et al.*, 2004, Nedialkova and Naidenova, 2005). Penyakit infeksi sering disebabkan oleh bakteri maupun jamur. *Candida albicans* (*C.albicans*) dan *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) merupakan dua contoh jamur yang dapat menimbulkan infeksi.

Candida albicans merupakan salah satu contoh fungi dari kelas ascomycetes. *Candida* sesungguhnya merupakan mikrobiota normal tubuh, namun demikian anggota khamir ini dapat menyebabkan penyakit oportunistik, artinya jika sistem imun inang menurun maka *Candida* dapat menyebabkan candidiasis (Budiyanto, 2004). Candidiasis merupakan penyakit pada selaput lendir mulut, vagina dan saluran pencernaan. Infeksi yang lebih gawat dapat menyerang jantung, darah dan otak. *Candida* dapat hidup sebagai saprofit pada selaput-selaput lendir tersebut pada kebanyakan orang tanpa menyebabkan penyakit. Tetapi apabila inangnya lemah karena suatu penyakit atau karena bakteri saingannya tertekan karena adanya pengobatan dengan antibiotik, maka *Candida* dapat menimbulkan penyakit (Pelczar dan Chan, 2007). Sedangkan *Aspergillus fumigatus* merupakan kapang anggota dari kelas deuteromycetes. Kapang jenis ini patogen terhadap manusia dan dapat menyebabkan aspergillosis. Salah satu bentuk aspergillosis adalah aspergilloma atau mycetoma, yang merupakan manifestasi dari pertumbuhan jamur pada daerah yang kekurangan aliran darah di paru-paru (Budiyanto, 2004).

Saat ini banyak penelitian yang difokuskan pada kelas Actinomycetes, terutama *Streptomyces* yang diindikasikan sebagai bakteri yang mampu menghasilkan antibiotik terbanyak. Sebanyak lebih dari 500 jenis antibiotika

telah dihasilkan oleh anggota genus *streptomyces* (Madigan *et al.*, 2003).

Penelitian Augustine, *et al* (2005) berhasil mengisolasi 312 Actinomycetes dari air dan tanah, 22% diantaranya mampu menghasilkan zat antifungi. Satu spesies, yaitu *Streptomyces albidoflavus* PU 23 mampu menghambat pertumbuhan *Aspergillus spp*, lebih kuat dari pada jenis fungi lainnya, yaitu *Candida albicans*, *penicillium sp*, *Fusarium oxysporum*, dan *Cryptococcus spp*. Jain and Jain (2007) juga berhasil mengisolasi *Streptomyces* GS 1322 dari tanah kebun yang identik dengan *Streptomyces samponii* dan dapat menghambat pertumbuhan fungi *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Microsporium gypseum* dan *Trichophyton sp*. Penelitian lain berhasil mendapatkan 445 isolat Actinomycetes yang diisolasi dari 16 tanah rizosfer tanaman obat-obatan. Diketahui pula bahwa 89%nya merupakan genus *Streptomyces*. Dua puluh tiga isolat *Streptomyces* tersebut dapat menghasilkan zat antifungi dan dapat menghambat pertumbuhan minimal satu dari 5 fungi uji yang meliputi *Alternaria brassicicola*, *Collectotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitarum* dan *Sclerotium rolfsii* (Khamma, *et al*, 2009).

Tanah merupakan habitat Actinomycetes. Populasi *Streptomyces* pada tanah mencapai 70% (Rao, 2001), sedangkan populasi Actinomycetes pada tanah yang subur mencapai 700.000 (Budiyatno, 2004). Pada umumnya mi-

kroorganisme yang hidup di wilayah rizosfer lebih banyak dari pada di tanah yang bukan rizosfer (Rao, 2001).

Tanaman Padi (*Oriza sativa*) merupakan salah satu tanaman budidaya yang banyak ditanam di Indonesia, hal ini dikarenakan sebagian besar penduduk Indonesia mengkonsumsi beras sebagai makanan pokok. Penelitian tentang isolasi Actinomycetes yang pernah dilakukan pada rizosfer tanaman budi daya adalah penelitian Ambarwati, *et al* (2010) yang berhasil menemukan 23 isolat Streptomyces dari rizosfer Jagung (*Zea mays*) dan 10 isolat diantaranya mampu menghambat bakteri gram positif dan satu isolat (RNJ14) mampu menghambat *S. aureus* dengan kuat (32,33 mm).

Untuk mengetahui keanekaragaman Actinomycetes yang berasosiasi dengan perakaran tanaman Padi (*Oriza sativa*) perlu dilakukan penelitian, sedangkan untuk mengetahui kemampuannya sebagai penghasil zat antifungi dapat diujikan pada fungsi uji. Fungsi uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *Candida albicans* sebagai wakil khamir serta *Aspergillus fumigatus* sebagai wakil dari kapang.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menemukan keanekaragaman Actinomycetes yang diisolasi dari rizosfer padi (*Oriza sativa*) serta melakukan uji hambatan terhadap *C. albicans* dan *A. fumigatus*.

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian dan Sampel tanah

Jenis penelitian ini adalah eksplorasi dengan pemeriksaan laboratorium. Sampel tanah diambil dari rizosfer Padi di lima titik yang berbeda di sawah Rojoniten, Ngemplak Boti, Kartasura, Sukoharjo.

B. Isolasi dan Purifikasi

Dilakukan pengenceran dari sampel sampai 10^{-5} . Dari tingkat pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-5} diambil 1 ml dan diinokulasikan secara *pour plate* pada media Starch-casein Agar dan media Raffinosa-histidin Agar, dilakukan replikasi sebanyak 2 kali untuk masing-masing tingkat pengenceran. Media yang telah diinokulasi diinkubasikan pada suhu 25°C selama empat hari sampai dua minggu (Sembiring *et al.*, 2000). Dari koloni yang menunjukkan kenampakan berbeda dipurifikasi pada media Starch-casein Agar.

C. Pewarnaan Gram

Pada isolat yang telah dipurifikasi dilakukan pewarnaan gram. Caranya : diambil obyek glass dan difiksasi dengan melidah apikan di atas bunsen sebanyak 2-3 kali secara cepat. Selanjutnya diambil 1 ose biakan koloni yang diduga Actinomycetes dan diletakkan di atas obyek glass. Kemudian biakan diratakan dengan jarum ose. Setelah itu dilakukan fiksasi dengan melidah apikan bagian yang tidak ada biakannya

di atas bunsen 2-3 kali dengan cepat. Langkah selanjutnya dituangkan pewarna Carbol gentian violet, dibiarkan selama 1 menit, setelah 1 menit preparat dicuci dengan air mengalir. Setelah itu preparat dikeringanginkan dengan membiarkan di udara terbuka. Selanjutnya dituangkan pewarna lodium, dibiarkan selama 2 menit. Setelah 2 menit preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan di udara terbuka. Berikutnya preparat dipucatkan dengan alkohol 95% (sampai warna ungu hilang), lalu dibilas dengan air mengalir. Langkah terakhir dituangkan pewarna Safranin sebagai warna pembanding, dan dibiarkan selama 30-45 detik. Setelah 30-45 detik preparat dicuci dengan air mengalir. Setelah itu preparat dikeringkan dengan meletakkan diantara 2 buah kertas isap. Kemudian preparat dilihat di bawah mikroskop, digunakan pembesaran lemah dulu (100X) baru pembesaran kuat (1000X) dengan terlebih dahulu menambahkan minyak imersi (Prescott *et al.*, 1999).

D. Uji Potensi Isolat sebagai Penghasil Zat Antifungi

Isolat-isolat yang telah dipurifikasi diuji cobakan pada fungi uji, yaitu *Candida albicans* sebagai wakil khamir serta *Aspergillus fumigatus* sebagai wakil

kapang. Media yang digunakan adalah PDA (*Potatoes Dextro Agar*) sedangkan metode yang digunakan adalah agar blok. Caranya dibuat kultur agar cawan dari fungi uji. Setelah itu, agar cawan dilubangi dengan *cork borer*. Dengan cara yang sama dibuat agar blok biakan isolat Actinomycetes. Agar blok yang terbentuk ditempatkan pada lubang agar cawan. Hal ini dilakukan terhadap semua koloni yang diduga Actinomycetes. Langkah selanjutnya, semua biakan diinkubasikan pada suhu 30°C selama empat hari (Nedialkova and Naidenova, 2005). Setelah empat hari diamati pertumbuhan fungi uji dan terbentuknya daerah hambatan (daerah jernih yang tidak ditumbuhi fungi uji).

HASIL DAN PEMBAHASAN

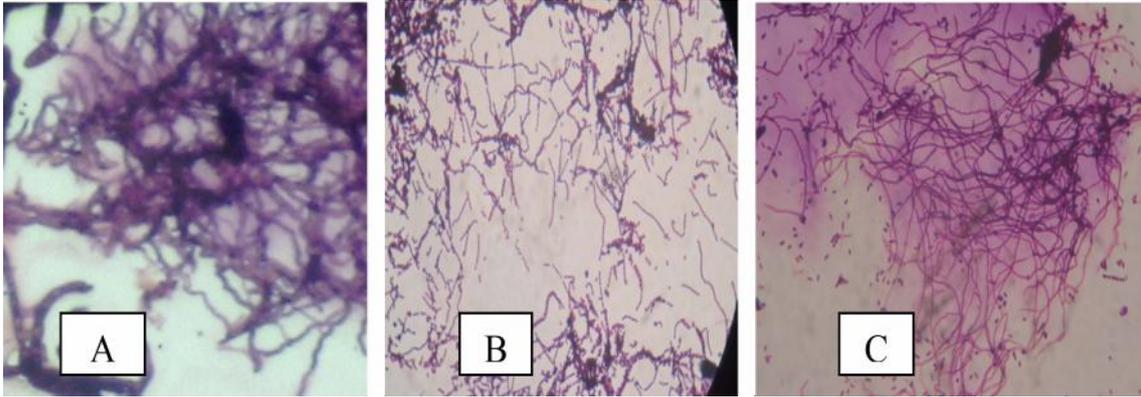
Hasil

A. Hasil isolasi dan purifikasi

Berdasarkan hasil isolasi dilakukan purifikasi pada koloni yang menunjukkan kenampakan berbeda. Berdasarkan hasil purifikasi diperoleh sebanyak 14 isolat.

B. Hasil pewarnaan gram

Hasil pewarnaan gram disajikan pada Gambar 1. berikut.

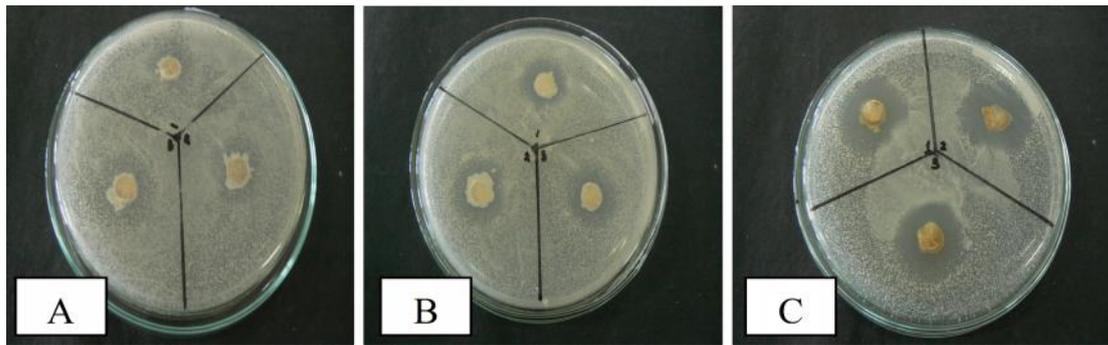


Gambar 1. Hasil Pewarnaan Gram
 A. Isolat RPR8, B. Isolat RPR42, C. Isolat NRPR6

C. Hasil uji potensi isolat sebagai penghasil zat antifungi

Acti-nomycetes disajikan pada Gambar 2 dan Tabel 1 berikut:

Hasil uji antifungi dari isolat



Gambar 2. Penghambatan Isolat terhadap Fungi Uji
 A. Penghambatan Isolat RPR 8 terhadap *C. albicans*
 B. Penghambatan Isolat RPR 42 terhadap *C. albicans*
 C. Penghambatan Isolat NRPR 6 terhadap *C. albicans*

Tabel 2. Hasil Uji Potensi Isolat sebagai Penghasil Antifungi

No	Kode isolat	Diameter daerah hambatan (mm) yang dihasilkan oleh isolat terhadap bakteri uji							
		<i>Escherichia coli</i>				<i>Bacillus subtilis</i>			
		Ulangan ke-		Rerata		Ulangan ke-		Rerata	
1	RPR3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	RPR8	0,00	0,00	0,00	0,00	20,00	20,00	20,00	20,00
3	RPR24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	RPR25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	RPR35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	RPR36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	RPR38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	RPR42	0,00	0,00	0,00	0,00	18,00	19,00	18,00	18,33
9	NRPR6	0,00	0,00	0,00	0,00	25,00	25,00	22,00	24,00
10	NRPR9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	NRPR14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12	NRPR26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13	NRPR53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	NRPR75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Pembahasan

Actinomycetes merupakan bakteri yang memiliki morfologi mirip dengan fungi karena bakteri ini juga memiliki miselium. Untuk mengisolasi Actinomycetes diperlukan media yang selektif untuk menumbuhkan Actinomycetes. Pada penelitian ini digunakan media Raffinosa-histidin Agar (RhA). Raffinosa dapat digunakan oleh Actinomycetes sebagai sumber karbon (Antonova-Nikolova *et al.*, 2005). Untuk mencegah pertumbuhan bakteri lain, maka suspensi sampel tanah dipanaskan dulu pada suhu 50°C selama 10 menit (Sembiring, 2002). Selain itu untuk mencegah pertumbuhan kapang maka ditambahkan cyclohexamide yang berfungsi sebagai antifungi untuk

mencegah pertumbuhan jamur (Sembiring, *et al.*, 2000).

Berdasarkan hasil isolasi dan purifikasi diperoleh sebanyak 14 isolat. Identifikasi selanjutnya dilakukan dengan pewarnaan gram untuk mengetahui morfologi sel. Berdasarkan hasil pewarnaan gram diketahui bahwa isolat yang didapatkan berbentuk batang bercabang, berwarna ungu dan termasuk gram positif yang merupakan ciri dari Actinomycetes. Langkah selanjutnya dilakukan uji antifungi. Jamur uji yang digunakan adalah *Candida albicans* sebagai wakil khamir dan *Aspergillus fumigatus* sebagai wakil dari kapang. Fungi ini dipilih karena keduanya bisa bersifat patogen pada saat kondisi imun manusia menurun. *C.*

albicans dapat menyebabkan kandidiasis dan *A. fumigatus* dapat menyebabkan aspergillosis.

Berdasarkan Tabel 1. diketahui bahwa terdapat 14 isolat Actinomycetes yang berbeda yang berhasil diisolasi dari rizosfer dan non rizosfer padi, tiga isolat diantaranya mampu menghasilkan zat antifungi dan dapat menghambat pertumbuhan fungi uji. Ketiga isolat tersebut mampu menghambat pertumbuhan *C. albicans*, yaitu isolat RPR 8 dengan diameter daerah hambatan rata-rata 20 mm, isolat RPR 42, dengan diameter 18,33 mm dan isolat NRPR 6 dengan diameter 24 mm. Namun demikian tidak ada satupun isolat yang mampu menghambat pertumbuhan *A. fumigatus*.

Menurut Nedialkova dan Naidenova (2005), bila diameter daerah hambatan sebesar 7 - 15 mm maka aktivitas penghambatannya dikategorikan lemah, 16 - 25 mm dikategorikan sedang, dan lebih dari 25 mm dikategorikan kuat. Oleh karena itu tiga isolat tersebut tingkat penghambatannya terhadap *C. albicans* dikategorikan sedang.

Berdasarkan hasil penelitian Augustine, et al (2005) diketahui bahwa *Streptomyces albidoflavus* PU 23 mampu menghambat pertumbuhan *Aspergillus fumigatus* dengan MIC 20 µm /ml dan menghambat *Candida albicans* dengan MIC 40 µm /ml. Penelitian ini menunjukkan hal yang berbeda dengan penelitian tersebut karena pada penelitian

ini *A. fumigatus* lebih resisten dari pada *C. albicans* yang ditunjukkan dengan MIC yang lebih rendah. Sedangkan pada penelitian ini isolat Actinomycetes dapat menghambat *C. albicans* namun tidak dapat menghambat *A. fumigatus*. Penelitian Augustine, et al menggunakan metode sumuran sehingga dapat diketahui nilai MIC, sementara pada penelitian ini menggunakan metode agar blok sehingga tidak bisa diketahui nilai MICnya.

Penelitian Helbert (2010) berhasil menguji aktivitas 10 isolat *Streptomyces* dari rizosfer rumput teki dan tanaman jagung sebagai penghasil antifungi. Fungi uji yang digunakan adalah *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *A. niger* dan *A. terreus*. Hasilnya menunjukkan 4 isolat mampu menghambat *C. albicans* dengan kategori lemah. Enam isolat mampu menghambat *S. cerevisiae* dengan kategori lemah dan sedang serta 4 isolat mampu menghambat *A. niger* dengan kategori lemah. Bila dibandingkan dengan hasil penelitian tersebut daya hambat isolat Actinomycetes pada *C. albicans* dari penelitian ini lebih baik tingkat penghambatannya karena tergolong penghambatan sedang. Secara umum antifungi yang dihasilkan *Streptomyces* dapat digolongkan menjadi dua, yaitu golongan polyene dan non polyene. Ada 3 macam mekanisme kerja zat antifungi yang dihasilkan oleh *Streptomyces* yaitu : merusak dinding sel dengan menghambat sintesis chitin dan menghambat sintesis

protein (Franklin and Snow, 1998) serta merusak membran sel dengan cara berinteraksi dengan ergosterol atau bereaksi dengan mannoprotein (Srivastava, *et al.*, 1991).

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan di atas dapat disimpulkan bahwa dari rizosfer Padi dapat ditemukan isolat 3 isolat Actinomycetes yang berpotensi sebagai penghasil zat anti-fungi yang dapat menghambat *C. albicans* yaitu RPR 8, RPR 42 dan NRPR 6 dengan kategori sedang.

B. Saran

Sebaiknya dilakukan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada isolat RPR 8, RPR 42 dan NRPR 6 untuk mengetahui jenis senyawa kimia yang berpotensi sebagai penghasil zat antifungi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Artikel ini merupakan bagian kecil dari penelitian Skim Hibah Pe-kerti. Oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada DIKTI lewat Kopertis wilayah VI Jateng yang telah mendanai penelitian ini dengan SK No. 007/O06.2/PP/SP/2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati, C.J. Soegihardjo dan Sembiring L, 2010. Isolasi dan Identifikasi (*Zea mays* L.) yang Berpotensi sebagai Penghasil Antibiotik. *Jurnal Biota*. ISSN 0853-8670. Terakreditasi Dikti Vo. 15, No. 1, Februari 2010
- Antonova-Nikolova, S., Tzekova, N., and Yocheva, L. 2005, Taxonomy of *Streptomyces* sp. Strain 3B, *Journal of Culture Collection*, 4 : 36-42.
- Augustine, S.K., Bhavsar, S.P., and Kapadnis, B.P., 2005. A Non-Polyene Antifungal Antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *J. Biosci.* 30(20): 201-211.
- Budiyanto, M. A. K. 2004. *Mikrobiologi Terapan*. Malang, UMM Press.
- Franklin, T.J. and Snow, G.A., 1998. *Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action 5th Edition*. England, Kluwer Academic Pub.
- Helbert, 2010. *Potensi isolat Streptomyces dari Rhizosfer Rumput Teki (Cyperus rotundus) dan Jagung (Zea mays) sebagai Penghasil Antifungal*. Skripsi, Fakultas Biologi, Yogyakarta, Universitas Gadjah Mada.

- Jain, P. K., and Jain, P.C., 2007. Isolation, Characterization and antifungal Activity of *Streptomyces samponii* GS 1322. *Indian Journal of Experimental Biology* : Vol. 45: 203-206.
- Khamma, S., Yokota, A and Lumyong, S., 2009. Actinomycetes Isolated from Medicinal Plant Rhizosphere Soils: Diversity and Screening of Antifungal Compounds, Indole-3-Acetic Acid and Siderophore Production. *World J Microbiol Biotechnol*, 25: 649-655.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. Tent Edition. Prentice Hall, USA.
- Nedialkova, D. and Naidenova, M. 2005. Screening the Antimicrobial Activity of *Actinomycetes* Strains Isolated from Antarctica. *Journal of Culture Collections*, 4 : 29-35.
- Oskay, M., Tamer, A. U. and Azeri, C. 2004. Antibacterial Activity of some Actinomycetes Isolated from Farming Soil of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 3(9) : 441-446.
- Pelczar, M. J. & Chan, E. C. S. 2007. *Dasar-Dasar Mikrobiologi 2*. Alih Bahasa Hadioetomo, R. S., Imas, T., Tjitrosomo, S. S., dan Angka, S. L. UI Press, Jakarta.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. 1999. *Microbiology*. Fourth Edition. Boston, WCB McGraw-Hill.
- Prihatiningtias, W., Widyastuti, S. M. dan Wahyuono, S. 2005. Senyawa Antibakteri dari *Thievalia polygonoperda* Fungi Endofit Tumbuhan Akar Kuning (*Fibraurea chloroleuca*. Miers). *Jurnal Farmasi Indonesia Pharmacoin*, 6(1): 19-22.
- Rao, N. S. S. 2001. *Soil Microbiology*. Fourth Edition of Soil Microorganism and Plant Growth. USA, Science Publishers, Inc. Enfield (NH).
- Sembiring, L., Ward A. C. and Goodfellow, M. 2000. Selective Isolation and Characterisation of Members of the *Streptomyces violaceusniger* Clade Associated with the Roots of *Paraserianthes falcataria*. *Antonie van Leeuwenhoek Journal* 78 (3-4) : 353-366.
- Sembiring, L. 2002. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi untuk Mahasiswa S2*. Laboratorium Mikrobiologi. Fakultas Biologi. Yogyakarta,UGM.
- Srivastava, O.P., Khan, Z.K., and Wahap, S., 1991. *Medically Important Antifungal Drug*. In *Handbook of Applied Mycology; Human, Animals and Insects*. Vol. 2 (Arora, D.K, Ed.). New York, Marcel Dekker, Inc.

- Suarsana, I. N., Utama, I. H. dan Suartini, N. G. A. A. 2001. Aktivitas In vitro Senyawa Antimikroba dari *Streptococcus lactis*. *Jvet 2(1)*. *Jurnal veteriner* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana. Bali.
- Worang, R. L. 2003. *Fungi Endofit sebagai Penghasil Antibiotika*. Tesis S2 Fakultas Biologi Yogyakarta, UGM.