
KERAGAMAN AKTIVITAS ANTIFUNGI BIOTA LAUT TERHADAP *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*, PENYEBAB BUSUK BATANG VANILI

I Ketut Suada

Laboratorium Bioteknologi Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian
Universitas Udayana, Bali
Email: ketutsuada@yahoo.com

Abstract

The diversity of marine biota resources is very high, therefore it is necessary to be recovered for our life need. The objective of this research is to know the antifungal ability of marine biota derived from Bali Island against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. Samples were collected at the intertidal zone of seven beaches around Bali. Extraction of antifungal substance of raw material extract was conducted using various organic solvents until the best ability was obtained. The dry material extract was then screened using well diffusion method. The method was also used to determine the inhibition indicators to *Fusarium*. The methanolic extract of *Aglaophenia* sp. marine animal was able to suppress the *Fusarium* effectively, with minimum inhibition concentration (MIC) of 0.05%. The extract inhibited the colony growth, total of conidial forming, total of growing colony, total of mycelial dry weight, total of mycelial protein, however, increased fusaric acid production of the pathogen.

Key words: antifungal, marine biota, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*

1. Pendahuluan

Selain biota darat, biota laut merupakan salah satu sumber bahan fungisida nabati yang potensial (Dahuri, 2001). Biota laut dapat dikembangkan menjadi pestisida alami (nabati) sehingga mengurangi penggunaan pestisida sintetis. Bahan alam yang mengandung racun seperti itu dimanfaatkan untuk membuat pestisida yang mudah terurai secara biologis (Anggadiredja, 2004) dan bersifat selektif di samping dapat diproduksi secara lokal.

Produk alami antijamur dari laut dapat dibedakan menjadi empat kelompok yaitu i) poliketida seperti aurantosida, ii) makrolida seperti forboksazol A, halishigamida A, dan halochondramida, iii) alkaloid seperti faspalyisin, meridine, ptilomycalin, haliclondiamine, dan iv) ester asam lemak seperti benzazole (Yan, 2004).

Berbagai antibiotik telah banyak dikembangkan antara lain trikloroetilen dan perkloroetilen yang dihasilkan dari makro dan mikro alga laut (Marasneh *et al.*, 1995). Dahuri (2001) mengemukakan bahwa alga laut sangat berpotensi sebagai sumber senyawa antimikroba baik untuk kesehatan manusia

(antibiotika) maupun untuk mengendalikan penyakit tanaman (fungisida). Untuk antimikroba khususnya antijamur, beberapa ekstrak alga laut seperti *Sargassum despiense*, *Turbinaria decurrense*, *Cystoseira tamariscifolia* telah terbukti mampu menekan pertumbuhan beberapa jenis jamur (Mabrouk *et al.*, 1985; Souhaili *et al.*, 2004).

Spons *Hippospongia communis* mengandung untenospongin B yang bersifat antijamur terhadap *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, juga sanggup menekan pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Saat dibandingkan dengan antijamur amfoterisin B yang umum digunakan, untenospongin B lebih kuat menghambat *F. oxysporum* dan *Candida tropicalis*, namun aktivitasnya sama terhadap *C. albicans* dan *A. niger*. Dalam hal ini, kepekaan *F. oxysporum* terhadap senyawa amfoterisin B (triazol) lebih rendah dibandingkan terhadap untenospongin B yang baru (Tsuda *et al.*, 2005). Oleh karena itu perlu dicari jenis fungisida baru agar lebih efektif terhadap mikroba.

Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap potensi beberapa biota laut yang bersifat antifungi

tehadap pertumbuhan *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanilla* (*Fov*) penyebab busuk batang vanili.

2. Metode Penelitian

2.1 Ekstraksi Bahan Antijamur

Dua gram bahan biota laut dipotong kecil-kecil, digerus dengan alu-lumpang dan ditambah 5 mL pelarut (n-heksan, kloroform, aseton, etanol, metanol, dan air). Setelah didiamkan selama 15 menit, ekstrak yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung *ependorf*, disentrifugasi 5000 rpm satu menit dan *supernatan* dipindahkan ke *ependorf* baru. Ekstrak dikeringanginkan lalu diuji dengan konsentrasi 50% (w/v). Setelah diketahui jenis biota dengan potensi yang besar maka dilakukan ekstraksi bahan kering. Sebanyak 500 g serbuk halus (kadar air 12%) direndam dalam 1 L metanol, distirer 24 jam. Bahan kemudian disaring dengan kertas saring Whatman no 2. Filtrat gabungan dipekatkan dengan penguap vakum berputar pada suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kasar.

2.2 Pengujian Ekstrak Kasar

Sebanyak 2 mL suspensi spora jamur *Fov* (2×10^5 konidia/mL) dimasukkan ke dalam cawan Petri, dituangi 20 mL media PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang masih cair. Biakan tersebut digoyang sampai konidia bercampur rata. Setelah beku dibuat lubang sumuran dengan *cork borer* Ø 5 mm lalu sumuran diisi 40 μ L ekstrak, diinkubasi 48 jam dan zona bening yang terbentuk diukur diameternya untuk menentukan zona hambat ekstrak (metode difusi sumur) (Berghe dan Vlietinck, 1991; Rios *et al.*, 1988). Zona hambat d² 5 mm berkategori *lemah*, 6 - 10 mm *sedang*, 11 --- 20 mm *kuat*, dan > 20 mm *sangat kuat*. Zona hambat ekstrak dihitung dari *diameter total zona bening dikurangi diameter sumur*. Dengan cara uji ini ditentukan konsentrasi hambat minimum (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) yaitu konsentrasi ekstrak terendah yang membentuk zona bening.

Koloni jamur umur tiga hari Ø 5 mm diletakkan di tengah media PDA yang telah mengandung ekstrak berbagai konsentrasi lalu diinkubasi pada suhu kamar. Daya hambat ekstrak = ((Diameter koloni kontrol – diameter koloni perlakuan)/diameter koloni kontrol) x 100%.

Setelah pengujian di atas selesai, konidia dipanen dengan menambah 10 mL akuades, jumlah

konidia dihitung dengan haemasitometer. Biakan disaring dengan kertas saring sehingga diperoleh miselia jamur bebas media. Miselia dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C sampai beratnya konstan. Untuk menentukan jumlah koloni yang terbentuk, sebanyak 0,5 mL suspensi konidia dituangkan ke dalam media PDA yang telah padat dalam cawan Petri, diinkubasi 24 jam dan dihitung jumlah koloni yang tumbuh. Pengujian ini juga dilakukan dalam media NB (*Nutrient Broth*). Rancangan pengujian adalah Acak Lengkap dengan uji beda *Duncan Multiple Range Test* (DMRT 5%).

2.3 Pengujian Asam Fusarat

Metode uji untuk penentuan asam fusarat dari *Fov* ini dilakukan mengikuti metode Wu *et al.* (2008), seperti berikut. Ke dalam erlenmeyer volume 250 mL dimasukkan media biakan yang terdiri dari: 10,0 g KNO₃, 5,0 g KH₂PO₄, 2,5 g MgSO₄.7H₂O, 0,01 g FeSO₄.7H₂O, 50,0 g glukosa, 1000 mL air bebas ion dengan pH campuran 4; diautoklaf pada suhu 115°C selama 30 menit. Ekstrak *Aglaophenia* ditambahkan ke dalam media sehingga terbentuk konsentrasi ekstrak: 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,013, 0,0063, dan 0% (w/v). Koloni agar jamur diameter 5 mm diinokulasi pada biakan, kemudian diinkubasi selama 35 hari pada *shaker* dengan kecepatan 125 rpm dan penyinaran 12 jam terang-gelap berseling menggunakan lampu fluorescens. Setelah masa inkubasi, biakan disaring dengan kertas Whatmann nomor 2. *Supernatan* filtrat setelah disentrifugasi merupakan ekstrak asam fusarat untuk ditentukan konsentrasinya.

Dua mL ekstrak asam fusarat yang disiapkan seperti di atas dibuat pH 2,0 menggunakan 2 M asam klorida, ditambahi etil asetat dengan volume yang sama, dikocok dua menit lalu didiamkan satu jam. Lapisan atas campuran ini dipipet dan diukur absorbannya pada panjang gelombang 268 nm. Kurva standar sampel ditentukan dengan asam fusarat (Sigma, St. Louise, Mo., USA).

3. Hasil Penelitian dan Pembahasan

3.1 Jenis Biota Laut yang Menunjukkan Aktivitas Antijamur

Biota laut yang menunjukkan aktivitas antijamur dari alga laut adalah *G. arcuata* dan *Eucheuma cottonii*, jenis spons di antaranya *Haliclona* sp., *Tedaria ignis*, dan *Spongilla* sp. sedangkan dari jenis terumbu karang adalah *Aglaophenia* sp. (Tabel

1). Menurut kategori Davis Stout ditemukan sembilan biota yang memiliki daya hambat dengan kategori kuat sampai sangat kuat namun delapan biota nilai MICnya besar (>0,1% (w/v) sehingga hanya *Aglaophenia* sp. yang nilai MICnya 0,05% saja dapat diuji lebih lanjut. Menurut standar Hoffmann *et al.* (1993) dan Andrews (2006), bahwa ekstrak yang layak diuji untuk keperluan antibiotika/fungisida adalah ekstrak dengan nilai MIC d'' 0,1% (w/v).

Daya hambat ekstrak *Aglaophenia* sp. yang diekstrak dengan berbagai pelarut menunjukkan aktivitas yang tinggi yaitu berkisar dari sedang sampai sangat kuat (Tabel 2). Ekstrak dengan pelarut metanol menunjukkan aktivitas tertinggi (diameter zona hambat 58 mm). Hal ini menunjukkan zat aktif dari ekstrak bersifat polar sebab pelarutnya bersifat polar. Menurut Harborne (1984), zat yang diekstrak

Tabel 1. Diameter Zona Hambat dan Nilai MIC Ekstrak Beberapa Jenis Biota Laut yang Menunjukkan Efek Antijamur Terhadap *Fov*

No.	Nama spesies	Diameter zona hambat (mm)	Nilai MIC (%)	Pantai asal sampel
Alga laut dengan pelarut etanol				
1	<i>Eucheuma cottonii</i>	9 (sedang)	0,3	Serangan
2	<i>Gracilaria arcuata</i>	18 (kuat)	0,2	Serangan
3	<i>Gracilaria arcuata</i>	19 (kuat)	0,2	Batu Bolong
4	<i>Gracilaria arcuata</i>	17 (kuat)	0,2	Tanah Lot
Spons (Porifera) dengan pelarut metanol				
1	<i>Amorphinopsis</i> sp.	15 (kuat)	0,5	Tukad Abu
2	Famili: Tetillidae	10 (sedang)	7,0	Menjangan
3	<i>Haliclona</i> sp.	18 (kuat)	0,2	Tukad Abu
4	Famili: Raspailiidae	19 (kuat)	0,5	Menjangan
5	<i>Tedaria ignis</i>	18 (kuat)	0,2	Tukad Abu
6	<i>Spongilla</i> sp.	23 (sangat kuat)	0,3	Tukad Abu
7	<i>Clathrina</i> sp.	9 (sedang)	5,0	Tukad Abu
Terumbu karang (Cnidaria) dengan pelarut metanol				
1	<i>Aglaophenia</i> sp.	58 (sangat kuat)	0,05	Tukad Abu

Keterangan: Kategori dalam tanda () merupakan kekuatan daya hambat antimikroba menurut kriteria Davis Stout (Ardiansyah, 2005).

Table 2. Zona hambat dan nilai MIC ekstrak *Aglaophenia* sp. dengan berbagai pelarut terhadap *F. oxysporum* f.sp. *vanillae*

Pelarut ekstrak	Diameter zona hambat (mm)	Nilai MIC (%)
Heksan	7 (sedang)	0,40
Aseton	16 (kuat)	0,20
Kloroform	17 (kuat)	0,20
Etanol	18 (kuat)	0,20
Metanol	58 (sangat kuat)	0,05
Akuades	13 (kuat)	0,20

Keterangan: Zona hambat diukur berdasarkan konsentrasi 50%; zona hambatan (zona hambatan dikurangi diameter lubang) pada PDA setelah 24 jam; Kategori () berdasarkan kategori Davis Stout (Ardiansyah, 2005); Nilai dalam tabel merupakan rata-rata 5 ulangan; Standar MIC yang digunakan adalah d'' 0.1% (w/v) (Hoffmann *et al.*, 1993; Andrews, 2006).

oleh suatu pelarut berkaitan dengan tingkat kepolaran pelarut. Zat polar akan terekstrak oleh pelarut polar dan zat non polar akan paling banyak diekstrak oleh pelarut non polar.

3.2 Daya Hambat Ekstrak terhadap *Konidia Jamur*

Hambatan ekstrak *Aglaophenia* sp. terhadap jumlah konidia terbentuk dan koloni tumbuh, baik pada media padat maupun cair melebihi 50% (Tabel 3). Menurut Sudana (1997), senyawa kimia yang dapat menghambat jamur patogen untuk membentuk konidia sangatambat baik digunakan sebagai bahan aktif fungisida. Fungisida seperti itu akan menekan penyebaran penyakit dari suatu daerah ke daerah lainnya dan dapat sangat menekan laju infeksi penyakit, mengikat spora biasanya terbentuk dalam jumlah besar sebagai organ yang potensial untuk penyebaran penyakit ke daerah lain yang berjauhan.

3.3 Pengaruh Ekstrak terhadap Asam Fusarat Jamur

Ekstrak dapat meningkatkan produksi asam fusarat patogen (Tabel 4). Makin tinggi ekstrak yang diberikan (0-0,1% ekstrak), makin tinggi asam fusarat terbentuk. Konsentrasi 0,1% ekstrak mampu meningkatkan asam fusarat sebesar 194% dibanding kontrol.

Respons peningkatan pembentukan asam fusarat ini merupakan reaksi terhadap tekanan kimia yang terjadi pada *Fov*. Menurut Lindsey dan Yeoman (1983), tanaman atau mikroba yang hidup pada daerah kritis atau berada dalam keadaan stres akan mengakumulasi metabolit stres sebagai hasil dari metabolisme sekunder. Dalam keadaan stres pertumbuhan sel terhenti, aktivitas metabolisme primer berkurang namun aktivitas metabolisme sekunder meningkat dan menghasilkan senyawa kimia yang beberapa di antaranya toksik terhadap

Tabel 3. Daya hambat ekstrak *Aglaophenia* sp. terhadap jumlah konidia dan jumlah koloni tumbuh

Kon-sen-trasi (%)	Diuji pada media padat (PDA)				Diuji pada media cair (NB)			
	Konidia		Koloni		Konidia		Koloni	
	Jumlah per mL (x 10 ⁴)	Daya hambat (%)	Jumlah per mL (x10 ⁴ CFU)	Daya hambat (%)	Jumlah per mL (x 10 ⁴)	Daya hambat (%)	Jumlah per mL (x10 ⁴ CFU)	Daya hambat (%)
0,00	165,00 a	0,00 a	152,00 a	0,00 a	336,50 a	0,00 a	324,40 a	0,00 a
0,05	67,20 b	59,27 b	64,00 b	57,89 b	73,50 b	78,16 b	62,40 b	80,76 b
0,10	18,20 c	88,97 c	16,40 c	89,21 b	1,60 c	99,52 c	1,20 c	99,63 c
0,15	0,00 d	100,00 d	0,00 d	100,00 b	0,00 d	100,00 c	0,00 d	100,00 c
0,20	0,00 d	100,00 d	0,00 d	100,00 b	0,00 d	100,00 c	0,00 d	100,00 c

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda berdasarkan uji DMRT 5%. Data dianalisis setelah ditransformasi log (x+1).

Tabel 4. Pengaruh ekstrak terhadap produksi asam fusarat *Fov*

Konsentrasi ekstrak (%)	Jumlah asam fusarat yang terbentuk pada media tumbuh jamur (µg/mL)	Peningkatan asam fusarat terhadap kontrol (%)
0	82,23 a	0
0,0063	99,51 a	21
0,0125	161,99 b	97
0,025	166,18 b	102
0,05	188,52 c	129
0,1	241,92 d	194
0,2	0,00 e	-

Keterangan : Angka-angka pada kolom sama yang diikuti oleh huruf yang sama tidak menunjukkan perbedaan pada taraf uji Duncan 5%.

organisme lain. Menurut Nisbeth (1982), keadaan stres dapat berupa suhu tinggi, rendahnya oksigen, adanya senyawa toksik, dan keadaan hara yang tidak seimbang.

4. Simpulan

Berbagai jenis biota laut seperti alga laut, spons, dan terumbu karang menunjukkan aktivitas antifungi terhadap *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*. Ekstrak metanol terumbu karang *Aglaophenia* sp. (Cnidaria/Coelenterata) sangat efektif menekan *Fusarium* dengan nilai MIC 0,05%. Biota ini mampu menekan pertumbuhan koloni, pembentukan spora, dan jumlah

koloni tumbuh, namun meningkatkan produksi asam fusarat jamur.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Bapak Sekar dari Banjar Tukad Abu Karangasem atas bantuannya mencari sampel biota laut dan Dirjen DIKTI atas bantuan dana sehingga penelitian ini dapat kami kerjakan. Terima kasih pula penulis sampaikan kepada Prof. Masayuki Nozue dari Universitas Shinshu atas saran yang amat berharga dan bantuan teknik kuantitasi asam fusarat sehingga kami dapat menyelesaikan penelitian ini dengan baik.

Daftar Pustaka

- Andrews, J. M. 2006. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC). Department of Microbiology Birmingham. 19p.
- Anggadiredja, J. T. 2004. Diversity of antibacterial substances from selected Indonesian seaweeds (*Dissertation*). UI-Jakarta.
- Ardiansyah. 2005. Daun beluntas sebagai bahan antibakteri dan antioksidan. Berita IPTEK. Com. Melalui <<http://www.beritaipetek.com/cetak-berita.php?kat=beritaandid=60>> [16/12/2006].
- Berghe, D.A.V. and A.J. Vlietinck. 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agent from higher plant *In* Dey, P.M. and J.B. Harborne (*Eds.*): *Methods in plant biochemistry* Vol. 7. Academic Press, London.
- Dahuri, R. 2001. Paradigma Baru Pembangunan Indonesia Berbasis Kelautan (*Orasi Ilmiah*). Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan IPB, Bogor.
- Hoffmann, J.J., B.N. Timmermann, B.N. Meclaughlin, and H. Punnapayak. 1993. Potential antimicrobial activity of plant from Southwestern United States. *Int. J. Pharmacog.*, 31(2):101-115.
- Lindsey, K. and M.M. Yeoman. 1983. Novel experimental system for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. *In*: Mantell, S.H. and H. Smith (*Eds.*): *Proc. Symp. Int. on Plant Biotechnology at the Univ. of Leicester, January 5-7, 1983*. Cambridge University Press, London, p:39-61.
- Marasneh, I., M. Jamal, M. Kashasneh, & M. Zibdeh. 1995. Antibiotic activity of marine algae against multi-antibiotic resistant bacteria. *Microb.*, 83:23-26.
- Nisbeth, L. J. 1982. Current strategies in the search for bioactive microbial metabolites. *J. Chem. Tech. Biotechnol*, 32:251-270.
- Rios, J.L., M.C. Recio, and A. Villar. 1988. Screening methods for natural product with antimicrobial activity (*A Review of Literature*). *Jour. of Ethnopharmacology*, 23:127-149.
- Souhaili, Z, M. Lageouli, M. Faid, & Fella. 2004. Inhibition of growth and mycotoxin formation moulds by marine alga *Cystoceira tamariscifolia*. *African Jour. of Biotechnology*, 3(1):71-75.
- Sudana, I.M. 1997. Metabolit sekunder baru dari *Pseudomonas fluorescens* efektif mengendalikan *Ceratocystis paradoxa* pada tanaman kelapa (*Disertasi*). ITB, Bandung.
- Tsuda, M., Y. Takahashi, J. Fromont, Y. Mikami, and Kobayashi. 2005. Dendridine A, a bis-indole alkaloid from a marine sponge *Dictyodendrilla* sp. *J. Nat. Prod.*, 68(8):1277-1278.
- Wu, H.S., W. Raza, D.Y. Liu, C. L. Wu, Z.S. Mao, Y.C. Xu, and Q.R. Shen. 2008. Allelopathic impact of artificially applied coumarin on *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24:1297-1304.
- Yan, H. Y. 2004. Harvesting drugs from the sea and hoh Taiwan cold contribute to first effort. *Changhua J. Med*, 9(1).