

Kemampuan Ekstrak Etanol Batang Brotowali (*Tinospora crispera* L.) Sebagai Antifungi Terhadap *Candida tropicalis*

Ceny Gloria Larope¹, Suryani Hutomo², Christiane Marlene Sooai³, Maria Silvia Merry²

¹Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia

³Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia
Alamat Korespondensi: suryani_hutomo@staff.ukdw.ac.id

Abstrak

Candida tropicalis adalah salah satu spesies non-*Candida albicans* yang paling umum diisolasi dari berbagai jenis kandidiasis dan infeksi nosokomial. Spesies ini adalah yang paling virulen kedua di antara spesies *Candida*. Meluasnya penggunaan antijamur sebagai profilaksis menjadi penyebab utama resistensi antifungi. Batang brotowali (*Tinospora crispera* L.) digunakan sebagai obat herbal di Asia, termasuk Indonesia. Terdapat lebih dari 65 senyawa fitokimia, dan beberapa di antaranya diidentifikasi sebagai agen antijamur potensial, seperti kelompok flavon, alkaloid, berberin, saponin, dan tanin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antijamur batang brotowali dan menentukan konsentrasi hambat minimum. Batang brotowali terstandar diolah dengan metode maserasi untuk menghasilkan ekstrak etanol. Kerentanan *C. tropicalis* terhadap ekstrak etanol batang brotowali diperiksa dengan uji konsentrasi hambat minimum menggunakan metode mikrodilusi dengan konsentrasi awal 10.000 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa nilai KHM ekstrak etanol batang brotowali berada pada konsentrasi 5.000 µg/ml. Sebagai kesimpulan, ekstrak etanol batang brotowali memiliki aktivitas antifungi yang lemah terhadap *C. tropicalis* dengan konsentrasi hambat minimal 5.000 µg/ml.

Kata Kunci: Antifungi, brotowali, *Candida tropicalis*, konsentrasi hambat minimum, *Tinospora crispera* L.

Antifungal Activity of Brotowali (Tinospora crispera L.) Stem Ethanolic Extract on Candida tropicalis

Abstract

Candida tropicalis is one of the most common non-*Candida albicans* candida (NCAC) species isolated from various clinical types of candidiasis and nosocomial infection. This species is the second most virulent among *Candida* species. The widespread use of antifungals as prophylaxis has led to the major cause of antifungal resistance. Brotowali (*Tinospora crispera* L.) stem is used as herbal medicine in Asia, including Indonesia. There are more than 65 phytochemical compounds, and a few of them are identified as potential antifungal agents, such as the flavone group, alkaloids, berberine, saponins, and tannins. This study aims to explore the antifungal activity of brotowali stems and determine the minimum inhibitory concentration. Standardized brotowali stems were processed by maceration method to produce ethanol extract. The susceptibility of *C. tropicalis* against the ethanolic extract of brotowali stem was examined by minimum inhibitory concentration (MIC) test using broth microdilution method with an initial concentration of 10,000 µg/ml. It showed that the MIC value for brotowali stem ethanolic extract was at a concentration of 5,000 µg/ml. In conclusion, the brotowali stem ethanol extract had antifungal activity against *C. tropicalis* with a minimum inhibitory concentration of 5,000 µg/ml.

Keywords: Antifungal, brotowali, *candida tropicalis*, minimum inhibitory concentration, *tinospora crispera* L.

How to Cite :

Hutomo, S., Larope, C. G., Sooai, C. M., Merry, M. S. The Kemampuan Ekstrak Etanol Batang Brotowali (*Tinospora crispera* L.) Sebagai Antifungi Terhadap *Candida tropicalis* . J Kdokter Meditek, 2023; 29(2), 138-143. Available from: <http://ejournal.ukrida.ac.id/ojs/index.php/Meditek/article/view/2622/version/2633> DOI: <https://doi.org/10.36452/jkdoktermeditek.v29i2.2622>

Pendahuluan

Candida tropicalis (*C. tropicalis*) merupakan salah satu spesies *Candida* yang penting. Secara luas, *C. tropicalis* menjadi spesies *Candida* kedua yang paling virulen setelah *C. albicans*.¹ Spesies ini umumnya diisolasi dari kulit, traktus respiratori, gastrointestinal, dan genitourinaria. Selain dari bagian tubuh manusia, fungi ini dapat ditemui pada permukaan alat-alat medis.^{1,2}

Secara genetik, *C. tropicalis* memiliki kesamaan yang paling mendekati *C. albicans*. Berbeda dengan *C. albicans*, *C. tropicalis* tidak memproduksi *germ-tube*. Secara umum, koloni berbentuk ragi dan struktur mikroskopis pada suhu 15° dan 37° C ditemukan blastokonidia dan pseudohifa serta hifa sejati. Struktur ini menjadi gambaran penting dari *C. tropicalis*.^{3,4}

Candida tropicalis umumnya sensitif terhadap antifungi golongan azole, tetapi dalam penelitian Choi dkk melaporkan ada 7 - 40% isolat klinisnya resisten terhadap golongan azole, secara khusus *fluconazole*.⁵ Penggunaan luas dari antifungi sebagai profilaksis menjadi penyebab utama kolonisasi dari spesies *non-candida albicans candida* (NCAC) dan meningkatkan resistensi terhadap obat-obatan antifungi.³ Adanya resistensi terhadap obat antifungi menyebabkan perlunya dilakukan penelitian untuk mendapatkan bahan yang sensitif sebagai antifungi terhadap spesies ini.

Indonesia memiliki sekitar 30.000-50.000 jenis tumbuhan dan 7.500 di antaranya telah dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Tanaman obat yang cukup dikenal masyarakat adalah brotowali (*Tinospora crispa* L.). Tanaman ini mudah ditemukan di pekarangan rumah dan merambat liar, tumbuh dan berkembang dengan baik di negara-negara tropis di Asia termasuk Indonesia.⁶ Lebih dari 65 senyawa telah diidentifikasi dari batang brotowali seperti flavone, alkaloid berberine, lignan dan diterpene. Beberapa di antaranya yang berpotensi sebagai antifungi adalah flavonoid dan berberine.⁷ Aktivitas selain antifungi juga ditemukan seperti analgesik, antipiretik, antiparasit, dan antiseptik.⁸ Penelitian terdahulu untuk melihat aktivitas antifungi ekstrak ini terhadap *C. tropicalis* belum ada. Penelitian aktivitas antifungi batang brotowali terhadap spesies *candida* lainnya dilakukan oleh Islam dkk (2014) terhadap *C.albicans* yang menunjukkan adanya zona hambat dengan menggunakan metode *disc diffusion*. Penelitian lainnya oleh Brillianti (2022) terhadap *C.krusei* juga menunjukkan

aktivitas antifungi ekstrak etanol batang brotowali pada konsentrasi 2.500 µg/ml dan 5.000 µg/ml. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antifungi ekstrak etanol batang brotowali terhadap *C. tropicalis* dengan menentukan konsentrasi hambat minimumnya menggunakan metode *microbroth dilution*.

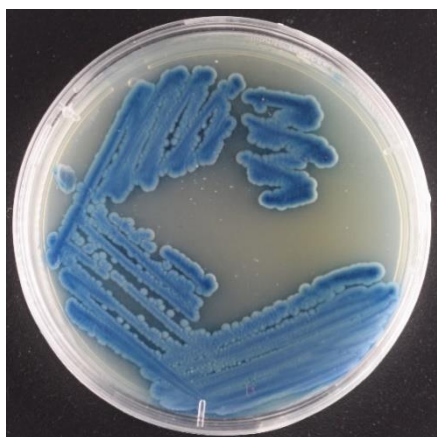
Metodologi

Persiapan Ekstrak

Batang brotowali terstandar (no. surat: 122/MFH-SIMP/IV/2021) yang telah diolah menjadi bentuk simplisia didapatkan dari Merapi Herbal Farma, Yogyakarta dan diolah menjadi ekstrak etanol batang brotowali menggunakan metode maserasi. Simplisia direndam dalam pelarut etanol 96% selama 24 jam lalu disaring. Larutan kemudian diuapkan menggunakan *vacuum evaporator* pada suhu 70°C sampai didapatkan ekstrak kental batang brotowali. Ekstrak pekat etanol batang brotowali kemudian diencerkan menggunakan dimethyl sulfoxide 2% (DMSO, Merck, Germany) lalu dihomogenkan dan disaring menggunakan filter milipore (Sartorius, Germany) untuk mendapatkan konsentrasi 10.000 µg/ml sebagai konsentrasi awal.

Persiapan Fungi

Isolat *C. tropicalis* merupakan isolat klinik pasien RS Bethesda Yogyakarta yang telah diidentifikasi dengan metode menggunakan media *chrom agar* (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Koloni *C. tropicalis* pada *chrom agar* berwarna biru. Sebanyak dua koloni *C. tropicalis* dari media agar *Yeast Pepton Dextrose* (YPD, Sigma, Missouri, USA) dikultur pada media *Yeast Pepton Dextrose* (YPD, Sigma, Missouri, USA) cair lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Kultur *C. tropicalis* pada media cair dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, fungi pada dasar tabung diresuspensi dengan pepton cair (Oxoid, USA) sehingga kekeruhan sama dengan larutan McFarland 0,5.⁸



Gambar 1. *C. tropicalis* pada chrom agar

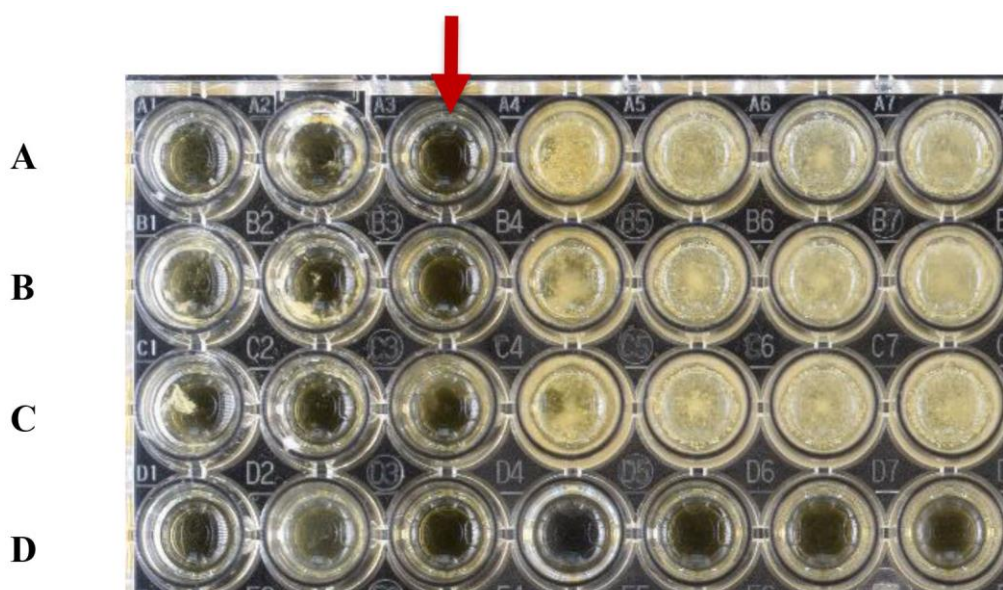
Uji antifungi

Uji aktivitas antifungi ekstrak etanol batang brotowali dilakukan menggunakan metode *microdilution* pada *96 well plate* (Iwaki, Japan). Pada tiap *well*, 10 μ l *C. tropicalis* dikultur pada 80 μ l media YPD cairan dipapar dengan ekstrak etanol batang brotowali. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 10.000 μ g/ml, 5.000 μ g/ml, 2.500 μ g/ml, 1.250 μ g/ml, 625 μ g/ml,

dan 312,5 μ g/ml. Volume ekstrak yang ditambahkan pada masing-masing *well* adalah 10 μ l. Sebagai kontrol positif digunakan fluconazole 2 mg/ml sebanyak 10 μ l. Kultur pada *96-well plate* diinkubasi pada suhu 37° C selama 2 x 24 jam. Konsentrasi hambat minimal ditentukan dengan mengamati kultur dengan konsentrasi terkecil yang kejernihannya sama dengan atau mendekati kejernihan kultur kontrol positif.⁹ Pengamatan dilakukan oleh 3 orang yang berbeda.

Hasil

Gambar 1 menunjukkan gambaran *well plate* yang telah diinkubasi selama 2 x 24 jam. Kontrol positif berada pada kolom 1 (A1, B1, C1) terlihat jernih pada media. Baris D merupakan kelompok *blank*. Kolom 2 berisi kultur perlakuan dengan konsentrasi awal 10.000 μ g/ml dan dilakukan pengeceran serial ke arah kanan dengan urutan konsentrasi 5.000 μ g/ml, 2.500 μ g/ml, 1.250 μ g/ml, 625 μ g/ml, 312,5 μ g/ml. Kultur jernih yang mendekati kontrol positif tampak pada kultur dengan paparan ekstrak konsentrasi 10.000 μ g/ml dan 5.000 μ g/ml.



Gambar 2. Hasil Uji Antifungi Ekstrak Etanol Batang Brotowali

Keterangan : Ekstrak etanol batang brotowali (*Tinospora crisper* L.) terhadap *C. tropicalis* pada *96 well plate* setelah inkubasi selama 2x 24 jam. Kolom 1 merupakan kontrol positif (Fluconazole), kolom 2-7 merupakan kelompok perlakuan. Baris D merupakan kelompok *blank* (*Well* hanya berisi media kultur.)Tanda panah merah merupakan konsentrasi hambat minimum ekstrak etanol batang brotowali pada 5.000 μ g/ml.

Konsentrasi hambat minimum ditentukan dengan kultur jernih yang mendekati kontrol positif dalam konsentrasi terkecil, sehingga konsentrasi hambat

minimum pada penelitian ini adalah 5.000 μ g/ml. Hasil representatif dari 3 kali pengamatan.

Pembahasan

Ekstrak etanol batang brotowali (*Tinospora crispa* L.) memiliki aktivitas antifungi terhadap *C. tropicalis* dimulai pada konsentrasi 5,000 µg/ml yang ditentukan sebagai konsentrasi hambat terkecil. Belum ada studi terdahulu yang meneliti ekstrak etanol batang brotowali terhadap *C. tropicalis*. Penelitian Warsinah dkk (2015) yang menggunakan ekstraksi dan fraksinasi batang brotowali, menunjukkan fraksi etanol memiliki daya hambat yang paling baik karena kemampuan etanol untuk mengekstraksi senyawa antifungi tanaman seperti fenol, grup asam lemak, dan terpenoid dibandingkan dengan fraksi kloroform, etil asetat, n-hexane, dan air distilasi terhadap *C. albicans*. Etanol sering digunakan sebagai pelarut untuk ekstraksi senyawa antifungi pada tanaman.¹⁰

Mekanisme resistensi yang terjadi pada *C. tropicalis* pada isolat klinis dikarenakan adanya *overexpression* dari gen ER11 yang diasosiasikan dengan mutase missense.⁵ *Overexpression* dari target obat akan meningkatkan konsentrasi lanosterol 14 α -demethylase yang merupakan bagian dari gen ER11 yang diregulasi oleh UPC2,¹¹ yang merupakan jalur biosintesis ergosterol. Ergosterol memiliki peranan penting dalam fungsi selular seperti integritas sel, aktivitas adekuat enzim seperti protein yang berfungsi sebagai transport makanan. Peningkatan ini menyebabkan sintesis ergosterol yang terus menerus dan memperkuat integritas sel.¹

Berkaitan dengan resistensi, terdapat respon stress pada *Candida* yang dikenal dengan calcineurin. Calcineurin dan Crz1 dibutuhkan dalam pertumbuhan hifa, toleransi micafungin, dan virulensi. Selain itu, calcineurin juga berperan dalam resistensi azole dan mempertahankan integritas dinding sel dengan menenebalnya lapisan kitin dinding sel.¹²

Flavonoid adalah metabolit sekunder, juga merupakan kelas polyphenol terbesar yang terdapat luas pada tanaman.¹³ Flavonoid bekerja dengan stimulasi akumulasi ROS (*Reactive Oxygen Species*) intraselular, disfungsi mitokondria, apoptosis, depolarisasi mitokondrial, dan fragmentasi DNA pada *C. tropicalis*. Peningkatan produksi ROS menyebabkan stres oksidatif pada sel.¹⁴ Pada jalur signaling *C. tropicalis*, *Cyr1* mengubah ATP menjadi cAMP untuk mengikat subunit PKA (Bcy1) dan membebaskan subunit katalitik (Tpk1 dan Tpk2) yang berperan dalam respon stress fungi, toleransi obat, pertumbuhan filamen.¹⁵ Disfungsi

mitokondria menyebabkan morfogenesis dan jalur cAMP dalam respon stress fungi akan gagal. *Candida tropicalis* mensekresikan enzim hidrolitik sebagai salah satu faktor virulensinya saat menginvasi yang merusak jaringan inang. Flavonoid bekerja meregulasi sistem biologik fungi dengan menghambat sekresi enzim hidrolitik, sehingga patogenisitas fungi akan berkurang dan fungi tidak dapat menghidrolisis sel inang.¹⁶ Beberapa komponen aktif flavonoid akan bekerja sinergis dengan farnesol sebagai inhibitor *quorum sensing* sehingga penghambatan pembentukan biofilm dapat terjadi.¹⁷

Berberine adalah isoquinoline alkaloid natural yang terdapat pada tanaman herbal. Berberine memiliki warna kuning dan memiliki rasa yang pahit.¹⁸ Berberine dan derivatnya memiliki potensi antifungi, antibakteri, dan anti inflamasi.¹⁹ Berberine menyebabkan perubahan pada potensial membrane mitokondria ($\Delta\psi_m$). Kerusakan ($\Delta\psi_m$) akan membuka pori pada membran dan mengganggu integritas dinding sel, sehingga memicu mekanisme apoptosis fungi.²⁰ Peran mitokondria dalam fungi adalah sebagai jalur metabolik yang penting saat virulensi dan infeksi pada inang serta pertahanan ketika terjadi stres oksidatif.²¹ Pada penelitian ini diperkirakan senyawa flavonoid dan berberine pada batang brotowali (*Tinospora crispa* L.) dapat menghambat pertumbuhan dan invasi *C. tropicalis* dengan memicu kematian fungi dan menghambat sekresi enzim. Faktor virulensi yang saling berkaitan dapat menyebabkan penyakit pada manusia. Dengan disfungsi mitokondria dan penghambatan sekresi enzim, maka invasi *C. tropicalis* pada sel inang akan terhambat. Berdasarkan hasil penelitian, batang brotowali memiliki aktivitas antifungi terhadap *C. tropicalis*.

Simpulan

Berdasarkan hasil yang telah didapatkan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol batang brotowali (*Tinospora crispa* L.) memiliki aktifitas antifungi yang lemah dengan menghambat pertumbuhan *C. tropicalis*. Konsentrasi hambat minimum ekstrak etanol batang Brotowali (*Tinospora crispa* L.) terhadap *C. tropicalis* adalah 5.000 µg/ml.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti berterima kasih kepada Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana

Yogyakarta untuk bantuan dalam penyediaan fasilitas selama penelitian ini berlangsung.

Daftar Pustaka

1. Zuza-Alves DL, Silva-Rocha WP, Chaves GM. An Update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. *frontiers in microbiology*. 2017;8(1927). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01927/full>.
2. El-Kholy MA, Helaly GF, Ghazzawi EFE, El-Sawaf G, Shawky SM. Virulence factors and antifungal susceptibility profile of *C. tropicalis* isolated from various clinical specimens in Alexandria, Egypt. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*. 2021;7(5):351. Available from: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/5/351>.
3. Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*. 2010;59(8):873-80. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.013227-0#tab2>.
4. Lukisari C, Harijanti K. Penatalaksanaan infeksi *Candida tropicalis* pada penderita median rhomboid glossitis. *Journal of Dentomaxillofacial Science*. 2011;10(1):13. Available from: <https://jdmfs.org/index.php/jdmfs/article/view/File/246/246>.
5. Choi MJ, Won EJ, Shin JH, Kim SH, Lee WG, Kim MN, et al. Resistance mechanisms and clinical features of fluconazole nonsusceptible *Candida tropicalis* isolates compared with fluconazole-less-susceptible isolates. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2016;60(6):3653-61. available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4879413/>.
6. Haque A, Islam A, Mohammad S. Antimicrobial, cytotoxicity and antioxidant activity of *Tinospora crispa*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Science*. 2011; 12(13). Available from: https://www.jpbums.info/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=353&Itemid=41.
7. Ahmad W, Jantan I, Bukhari SNA. *Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson: A review of its ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological aspects. *Frontiers in Pharmacology*. 2016;7(59). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2016.00059/full>.
8. Warsinah, Harwoko, Nuryanti. Screening of volatile compounds of brotowali (*Tinospora crispa*) and antifungal activity against *Candida albicans*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2015;7(1):132-6. Available from: <http://impactfactor.org/PDF/IJPPR/7/IJPPR,Vol7,Issue1,Article20.pdf>.
9. Hutomo S, Putri DU, Welviyanda BC, Susilowati H. Inhibition effect of garlic (*Allium sativum*) extract on *Streptococcus sanguinis* biofilm formation involving bacterial motility mechanism. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*. 2021; 17(2): 169-174. Available from: https://medic.upm.edu.my/upload/dokumen/2021040613134123_MJMHS_0582.pdf.
10. Fathmah EN, Pujiyanto S, Raharjo B. Aktivitas Antibakteri ekstrak etanol dan etil asetat batang tanaman brotowali (*Tinospora crispa*, L. Miers) terhadap bakteri *Escherichia coli* enteropatogenik (EPEC) penyebab penyakit diare. *Bioma*. 2019;21(1):1-8. Available from: <https://ejournal.undip.ac.id/index.php/bioma/article/view/24431>.
11. Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi-a review. *Medical mycology*. 2012;50(4):337-45. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4294699/>
12. Chen YL, Yu SJ, Huang HY, Chang YL, Lehman VN, Silao FGS, et al. Calcineurin controls hyphal growth, virulence, and drug tolerance of *Candida tropicalis*. *Eukaryotic cell*. 2014;13(7):844-54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4294699/>.
13. Lourenço RMDC, Melo PdS, de Almeida ABA. Flavonoids as antifungal agents. In Razzaghi-Abyaneh M, Rai M, editors. *Antifungal metabolites from plants*. Germany: Springer, Berlin, Heidelberg; 2013. p. 1-469. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-38076-1_10.
14. da Silva CR, de Andrade Neto JB, de Sousa Campos R, Figueiredo NS, Sampaio LS, Magalhães HIF. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(3):1468-78.

- Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3957875/>.
15. Lin CJ, Chen YL. Conserved and divergent functions of the cAMP/PKA signaling pathway in *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland). 2018; 4(2): 68. Available from: <https://www.mdpi.com/2309-608X/4/2/68>.
 16. Al Aboody MS, Mickymaray S. Anti-fungal efficacy and mechanism of flavonoids. antibiotics (Basel, Switzerland). 2020;9(2):45. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/2/45>.
 17. Ćirić AD, Petrović JD, Glamočlija JM, Smiljković MS, Nikolić MM, Stojković DD, et al. Natural products as biofilm formation antagonists and regulators of quorum sensing functions: A comprehensive review update and future trends. *South African Journal of Botany*. 2018;120:65-80. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629918309256>.
 18. Gan RY. Bioactivities of Berberine: An Update. *International Journal of Modern Biology and Medicine*. 2012;1(1):48-81. Available from: https://www.researchgate.net/publication/296384677_Bioactivities_of_Berberine_An_Update.
 19. Wang K, Feng X, Chai L, Cao S, Qiu F. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects. *Drug Metabolism Reviews*. 2017;49(2):139-57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28290706/>.
 20. da Silva, de Andrade Neto, da Silva R, de Sousa Campos, Silva AC, Freitas DD, et al. Berberine antifungal activity in fluconazole-resistant pathogenic yeasts: Action mechanism evaluated by flow cytometry and biofilm growth inhibition in *Candida* spp. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2016;60(6):3551-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4879420/>.
 21. Shingu-Vazquez M, Traven A. Mitochondria and fungal pathogenesis: Drug tolerance, virulence, and potential for antifungal therapy. *Eukaryotic Cell*. 2011;10(11):1376-83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209048/>.