

***Streptomyces* Penghasil Antibiotik yang Berasosiasi dengan rhizosfer beberapa Spesies Mangrove**

Streptomyces Producing Antibiotic Associated with Rhizosphere some Mangrove Species

Hana Krismawati¹, Langkah Sembiring², Subagus Wahyuono³

¹Balai Penelitian dan Pengembangan Biomedis Papua

²Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada

³Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

Email: hkrismawati@gmail.com

ABSTRAK

ABSTRACT

Kasus resistensi antibiotik semakin meningkat sehingga eksplorasi sumber-sumber baru antibiotik. Penelitian mengenai *Streptomyces* penghasil antibiotik yang berasosiasi dengan rhizosfer beberapa spesies mangrove telah dilakukan. Pengambilan sampel dilakukan di hutan mangrove Karimun Jawa dan Teluk Awur Jepara. Selanjutnya dilakukan isolasi, karakterisasi dan identifikasi isolat yang termasuk dalam anggota genus *Streptomyces*. Isolasi selektif *Streptomyces* dilakukan dengan media *Starch Casein Agar* (SCA) dan *Raffinosa Histidin Agar* (RHA). Koloni *Streptomyces* yang tumbuh diidentifikasi berdasarkan pengenalan karakteristik koloni dan diklasifikasikan dengan metode *color grouping* menggunakan media oatmeal agar. Purifikasi koloni dilakukan dengan *Yeast Pepton Agar* dan *Bealett Agar*. Potensi *Streptomyces* dalam menghasilkan antibiotik ditentukan dengan melakukan uji penghambatan dengan bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Jenis antibiotik diidentifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)). Keanekaragaman isolat yang mampu menghasilkan antibiotik ditentukan dengan pengamatan ornamentasi permukaan rantai spora dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dan pengamatan morfologi rantai spora dengan metode *inclined cover slip*. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 123 isolat *Streptomyces* terkelompok menjadi 3 grup yaitu Group A sebanyak 100, grup B sebanyak 21 dan grup C sebanyak 2 isolat. Hasil screening isolat uji penghambatan dengan bakteri uji didapatkan 16 isolat yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri uji. Pengamatan rantai spora terhadap isolat yang berpotensi menghasilkan antibiotik menunjukkan ada 3 tipe morfologi rantai spora yaitu *flexus*, *folded* dan *curly* dan 3 ornamentasi permukaan yaitu *spiny*, *velvety* dan *flat*. Seleksi strain penghasil antibiotik menunjukkan terdapat 12 strain yang berpotensi menghasilkan antibiotik. Kelompok antibiotik yang dihasilkan diduga jenis *Erythromycin*, *Tetracyclin*, *Rimfampicyn*, *Polymyxin* dan *Chloramphenicol*. Dapat disimpulkan bahwa *Streptomyces* yang berpotensi menghasilkan antibiotik dapat diisolasi dari rhizosfer dan non rhizosfer tanaman mangrove.

Kata kunci : *Streptomyces*, antibiotik, mangrove

Resistance case of antibiotic grows up in number recently, the research of Streptomyces producing antibiotic associated with rhizosphere some mangrove species has been done. Sampling was taken in Karimun Jawa and Teluk Awur Jepara mangrove forest. Isolation, characterization and identification were made. Selective isolation of Streptomyces used Starch Casein Casein (SCA) and Raffinosa Histidin Agar (RHA). The colony of Streptomyces which grew was identified based on colony recognition . The colony of Streptomyces was purified using Yeast Pepton Agar and Bealett Agar. The isolates was identify as Streptomyces using gram staining. Classification was done using

color grouping method on oatmeal agar and tyrosin agar. The potential of *Streptomyces* to produce antibiotic was observed using inhibited test of *Escherichia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and PKS gene detection. Identification of selective isolates in terms of producing antibiotics was run using spore chain morphology and ornamentation spore chain surface observation observation using inclined cover slip for recognizing spore chain morphology and Scanning Electron Microscope (SEM) for analyzing ornamentations of spore chains surface. The sort of antibiotic were identified by thin layer chromatography method. The results of study showed 123 isolates of *Streptomyces* and divided into 3 color group namely: color group A (100 isolates), color group B (21 isolates) and color group C (2 isolates). The screening of potential isolates to produce antibiotic using inhibition test, show 16 isolates potential producing antibiotic. The observation of spore chain morphology showed three types of morphology: flexus, folded and curly, and three types of surface ornaments: spiny, velvety, flat. The group of antibiotic was presumed as Erytromycin, Tetracyclin, Rimfampicyn, Polymyxin and Chloramphenicol. The conclusion of the study that mangroves habitat was potential sources of *Streptomyces* producing antibiotics.

Keywords : *Streptomyces*, antibiotic, mangrove

Naskah masuk : 09-12-2014

Review I : 16-01-2015; Review II : 23-03-2015

Layak terbit : 23-04-2015

PENDAHULUAN

Sejak tahun 1950an bakteri yang termasuk dalam kelompok *Actinomycetes* mendapatkan perhatian yang sangat serius.^{1,2} *Actinomycetes* merupakan bakteri filamentus gram positif yang memiliki nilai *Guanin-Cytosin content* yang tinggi yaitu 70-74 %.³ Menurut Goodfellow *et al* *Streptomyces* adalah genus yang paling mendominasi kelompok *Actinomycetes*. Anggota genus *Streptomyces* ini telah banyak diteliti karena kemampuannya memproduksi berbagai senyawa bioaktif.^{2,4} Senyawa-senyawa bioaktif yang berhasil diisolasi dari *Streptomyces* antara lain antibiotik,⁵ anti kanker,⁶ anti tumor dan immunorepresan⁴ oleh sebab itu, penelitian mengenai keanekaragaman *Streptomyces* perlu dilakukan karena kebutuhan zat-zat bioaktif yang dapat diaplikasikan dalam dunia farmasi, pangan, dan industri terus berkembang.

Salah satu zat bioaktif yang sangat besar peranannya dalam bidang medis adalah antibiotik. Zat ini bermanfaat menanggulangi berbagai jenis infeksi yang disebabkan oleh mikrobia.⁴ *Streptomyces* adalah sumber antibiotik yang sangat berpotensi karena berbagai jenis antibiotik dapat diekstraksi dari *Streptomyces*.^{2,1} Isolasi *Streptomyces* penghasil antibiotik

sudah dilakukan dari berbagai tipe habitat seperti areal hutan, perkebunan⁸ dan sedimen laut.⁹ Eksplorasi *Streptomyces* dari berbagai sumber habitat harus terus dilakukan dengan tujuan mendapatkan strain baru dan bioaktif baru.

Mangrove adalah daerah yang berpotensi menjadi habitat *Actinomycetes*.¹¹ Kui Hong *et al.* berhasil mengisolasi *Streptomyces* dari sedimen mangrove dan beberapa tanaman di Cina.⁶ *Streptomyces* dari sedimen mangrove dan perairan laut berhasil diisolasi di Filipina oleh Parangua *et al.*¹¹ Hal itu menunjukkan bahwa mangrove adalah habitat potensial bagi *Streptomyces*.

Penelitian ini bertujuan mendapatkan isolat *Streptomyces* dari rhizosfer beberapa spesies mangrove yang berpotensi menghasilkan antibiotik. Penelitian ini juga bertujuan mempelajari keanekaragaman strain *Streptomyces* yang dapat menghasilkan antibiotik serta mengetahui jenis antibiotik yang dapat dihasilkan oleh *Streptomyces* yang diisolasi dari rhizosfer beberapa spesies mangrove.

METODE

Pengambilan sedimen mangrove dilakukan pada 2 lokasi di kawasan Hutan

Mangrove Teluk Awur dan Hutan Mangrove Karimun Jawa. Sampel diambil dari bagian perakaran mangrove atau rhizosfer dan sedimen yang lepas dari daerah perakaran. Sedimen ditampung dalam plastik sampel steril 50 ml dan disimpan pada suhu kamar selama ekspedisi. Penyimpanan di laboratorium dilakukan pada suhu 4°C.⁵ Sampel yang sudah dikomposit selanjutnya ditentukan berat kering, kelembaban, suhu, salinitas dan pH.

Perlakuan pemanasan pada suhu 50°C untuk mereduksi jamur dan bakteri lain. Isolasi selektif *Streptomyces* dilakukan dengan menginokulasikan 0,1 ml suspensi sampel dari setiap pengenceran ke dalam medium *Starch Casein Agar* (SCA) dan *Raffinosa Histidin Agar* (RHA) yang mengandung *cyclohexamid* dan *nystatin* sebanyak 50 µgm⁻¹. Inokulasi dilakukan secara *surface plate*. Medium yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 25°C selama 2 minggu.⁵ Masing-masing tipe koloni yang berbeda diisolasi dengan mengambil koloni menggunakan tusuk gigi dan diinokulasi ke dalam medium *Beant Agar* dan *Yeast Pepton Agar* (YPA). Inkubasi dilakukan selama 25°C selama 1-2 minggu.⁵

Karakterisasi dan identifikasi dilakukan berdasarkan morfologi koloni, *color grouping* dan pengecatan gram. Pengamatan dilakukan dengan mengamati bentuk koloni yang tumbuh pada medium SCA dan RHA. Pengamatan *color grouping* dilakukan dengan membiakan *Streptomyces* pada media oatmeal agar. Inkubasi dilakukan pada suhu 25°C selama 1-2 minggu. Pengelompokan dilakukan berdasar warna vegetatif mycelium, aerial mycelium dan pigmen yang terdifusi.⁵

Isolat yang sudah dipurifikasi diuji dengan bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus* dengan metode agar blok. Bakteri uji dikultur dalam cawan petri dengan mengambil 1 ml suspensi bakteri uji dan ditambahkan *Nutrient Agar*. kemudian diratakan dan dipadatkan. Pada petri yang

ditumbuhi bakteri uji dilakukan pembuatan kuadran dengan membuat garis tegak lurus pada sisi bawah petri. Setiap kuadran dilubangi dengan *cork borer*. Dengan cara yang sama dibuat kultur isolat pada petri. Agar blok isolat yang tumbuh ditempatkan pada lubang yang dibuat pada bakteri uji. Selanjutnya potensi isolat dalam menghasilkan antibiotik diamati dengan melihat daerah penghambatan (zona jernih). Isolat yang menunjukkan daerah penghambatan diuji lagi dengan metode yang sama pada uji pendahuluan. Kemudian diukur zona hambat tiap isolat. Pada uji isolat terpilih ini dilakukan tiga pengulangan.¹²

Isolat yang menghasilkan zona jernih lebih dari 25 mm diidentifikasi senyawa antibiotik dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada silica gel GF₂₅₄ dengan eluen metano kloroform 9:1. Isolat ditanam pada media *Glucose Yeast Ekstrak* (GY) cair sebanyak 10 ml pada tabung reaksi. Biakan digoyang pada *rotary shaker* pada suhu 25°C pada kecepatan 200 rpm selama 5 hari. Supernatan diambil dengan sentrifugasi 5000 rpm selama 20 menit. Supernatan tersebut digunakan untuk melakukan uji KLT.⁸ Antibiotik pembanding yang digunakan pada uji ini adalah Linkomisin, Eritromisin, Kanamisin, Kloramfenikol dan Tetrasiklin. Penampakan spot diamati dengan sinar UV panjang gelombang 254 nm. Spot sampel dibandingkan dengan spot yang dihasilkan oleh antibiotik pembanding. Pengukuran Rf dilakukan dengan mengukur jarak spot awal dengan batas resapan dari titik awal.

Isolat unggul yang mampu menghasilkan antibiotik diidentifikasi berdasarkan ornamentasi permukaan rantai spora dengan *Scanning Electron Microscop* (SEM) dan morfologi rantai spora dengan *Inclined Cover Slip*. Ornamentasi permukaan spora diamati dengan metode berikut : Agar blok yang mengandung rantai spora ditumbuhkan direndam dalam Glutaraldehyd 2% pada suhu 4°C selama 24 jam, selanjutnya dilakukan dehidrasi

dengan seri etanol bertingkat (air, etanol 5%, etanol 14%, etanol 27,5%, etanol 42%, etanol 52,5%, etanol 69,5%, etanol 80%, etanol 89%, etanol 95,6%, etanol 100%). Selanjutnya dilakukan pengeringan dengan *critical point drying* menggunakan CO₂ cair. Spesimen diletakkan pada stub lalu dilakukan *mounting drying* dengan lem khusus. Langkah berikutnya adalah *coating*, yaitu pelapisan sampel dengan emas murni menggunakan *Gold Sputer*. Hasil preparasi diamati pada SEM.⁵

Morfologi rantai spora dilakukan dengan mengamati rantai spora pada mikroskop fase kontras. *Streptomyces* dibiakan pada medium oatmeal yang sudah diberi *deckglas* pada medium tersebut. Inkubasi 1-2 minggu pada suhu 25°C. Jika pertumbuhan bakteri pada *deckglass* sudah cukup, maka *deckglass* diambil kemudian ditempatkan pada gelas benda dan diamati pada mikroskop fase kontras.⁵

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Selektif dan Enumerasi *Streptomyces*

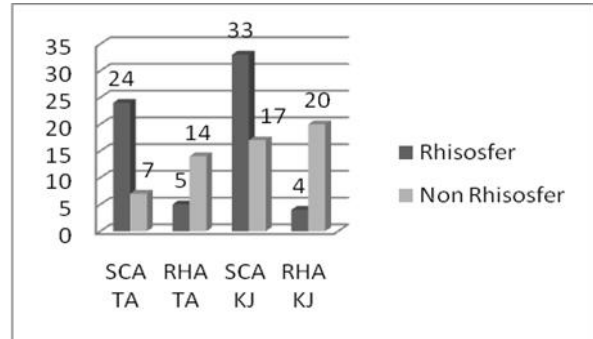
Tabel 1. Densitas *Streptomyces* dengan Metode Plate Count (10⁶ cfu/g)

| Lokasi | SCA | RHA |
|--------|-------|------|
| TA NR | 6,58 | 0,70 |
| KJ NR | 47,21 | 0,84 |
| TA R | 0,33 | 7,66 |
| KJ R | 15,80 | 3,72 |

Keterangan :
 TA : Teluk Awur; KJ : Karimun Jawa; NR : Non rhizosfer; R : Rhizosfer. Densitas menunjukkan estimasi jumlah sel *Streptomyces* yang dapat diisolasi dari setiap 1 gram sampel kering sedimen. Berdasarkan hasil pengamatan strain *Streptomyces* paling banyak diisolasi dari sedimen non rhizosfer mangrove di Karimun Jawa pada media SCA.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi selektif *Streptomyces*. Untuk isolasi digunakan dua media yang selektif untuk menumbuhkan *Streptomyces* yaitu SCA

dan RHA. Hasil enumerasi dengan *plate count* disajikan pada tabel 1 sedangkan data isolat yang dipurifikasi disajikan pada gambar 1.



Gambar 1. Jumlah koloni *Streptomyces* yang berhasil dipurifikasi dari masing-masing media dan titik sampling.

Keterangan :
 SCA TA: Koloni pada media SCA dari sampel Teluk Awur;
 RHA TA : Koloni pada media RHA dari sampel Teluk Awur;
 SCA KJ: Koloni pada media SCA dari sampel Karimun Jawa; RHA KJ : Koloni pada media RHA dari sampel Karimun Jawa.

Karakterisasi dan Identifikasi

Sebanyak 123 isolat yang dipurifikasi selanjutnya dilakukan pengecatan gram dan klasifikasi dengan *colour grouping*. Pengelompokan didasarkan pada warna miselium udara, miselium vegetatif dan warna pigmen yang terbentuk serta pigmen berdifusi. Hasil *colour grouping* selengkapnya disajikan pada Tabel 2.

Seleksi Isolat penghasil Antibiotik dengan Uji Daya Hambat

Berdasarkan hasil uji pendahuluan potensi isolat sebagai penghasil antibiotik, didapatkan 16 isolat terseleksi yang dapat menghambat bakteri uji. Terdapat 10 isolat yang menunjukkan kemampuan menghambat pada grup A, sedangkan pada grup B sebanyak 5 isolat dan dari grup C sebanyak 1 isolat. Selanjutnya ke 16 isolat tersebut diuji kembali pada bakteri uji yang sama dengan pengulangan sebanyak tiga kali.

Hasil selengkapnya disajikan pada tabel 3.

Tabel 2. Hasil Klasifikasi dengan Colour Grouping Pada Media Oatmeal

| Group | Aereal Mycelium | Vegetatif Mycelium | Pigmen terdifusi | Pigmen tirosin | Strain |
|-------|-----------------|--------------------|------------------|----------------------|---|
| 1 | Putih | Putih Kuning | coklat | - | T 112*, T 202*, T 402*, T 406*, T 408*, T 409*, T 412*, T 414*, K 110*, K 113*, K 119*, K 121*, K 204*, K 202*, K 406*, K 407*, K 408*, K 410*, K 418*, K 123*, K 407* |
| | | | | Tidak dilakukan | T 114, T 115, T 116, T 117, T 118, T 119, T 120, T 121, T 123, T 201, T 203, T 204, T 205, T 301, T 302, T 303, T 304, T 305, T 306, T 401, T 403, T 404, T 405, T 407, T 410, T 411, T 413, K 101, K 102, K 103, K104, K 105, K 106, K 107, K 108, K 109, K 111, K 112, K114, K 115, K 116, K 117, K 118, K 120, K 122, K 124, K 125, K 126, K 127, K 128, K 129, K 130, K 131, K 132, K 133, K 201, K 202, K 203, K 301, K 303, K 304, K 305, K 306, K 401, K 402, K 403, K 404, K 405, K 409, K 419, K 420 |
| 2 | Putih | Putih Kuning | Kuning | - Tidak dilakukan | T 102*, T 103*, T 107*, T 413*, K 308*, K 415*, T 101, T 104, T 106, T 108, T 109, T 110, T 111, T 309, T 310, T 311, T 312, T 313, T 314, T 316, K 317 |
| 3 | Abu-abu | Kuning | Coklat | + | T 105*, T 113* |

Karakterisasi dan Identifikasi Isolat Terpilih

Salah satu tahap perkembangan *Streptomyces* akan membentuk miselium substrat atau *vegetatif mycelium* dan miselium udara atau *aerial mycelium*. Miselium udara yang terbentuk merupakan rangkaian rantai spora. Penelitian ini melakukan pengamatan rantai spora dari seluruh isolat didapatkan 3 tipe rantai spora yaitu *fleksus*, *folded* dan *curly*. Sedangkan berdasar hasil *Scanning Electron Microscop* maka ornamentasi permukaan rantai spora meliputi *spiny*, *velveted* dan *flated* (gambar 2).

Tabel 3. Data Zona Hambat Isolat Terhadap Bakteri Uji *Eschericia coli* ATCC 35218 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25953

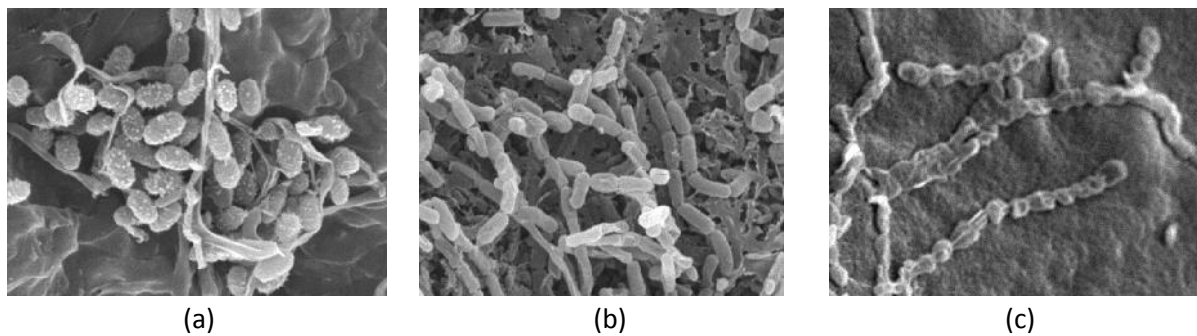
| Strain | Zona Hambat (cm) | |
|--------|-----------------------------------|---|
| | <i>Eschericia coli</i> ATCC 35218 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25953 |
| T 107 | 0,48 | - |
| K 308 | 0,55 | - |
| K 406 | 0,58 | - |
| T 108 | 0,53 | - |
| T 409 | 0,68 | - |
| T 101 | - | 0,58 |
| T 103 | - | 0,35 |
| T 113 | - | 0,38 |
| K 119 | - | 0,38 |

Lanjutan Tabel 3.

| Strain | Zona Hambat (cm) | |
|--------|--------------------------------------|---|
| | <i>Eschericia coli</i> ATCC 35218 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25953 |
| K 203 | - | 0,55 |
| T 202 | - | 0,33 |
| K 408 | - | 0,30 |
| K410 | - | 0,93 |
| T 412 | - | 0,33 |
| K 418 | - | 0,38 |
| K 204 | - | 0,63 |

Identifikasi Senyawa Antibiotik Yang Dihasilkan Oleh *Streptomyces*

Untuk senyawa yang diduga antibiotik yang dihasilkan oleh 16 isolat terpilih, dilakukan karakterisasi dan identifikasi dengan KLT untuk menilai *Rentention Factor* (Rf) dan warna pendaran dibawah sinar UV 254 dari spot yang dihasilkan. Hal yang sama juga dilakukan pada antibiotik pembanding yaitu *erythromycin*, *tetracycline*, *rimfampicyin*, *polymyxin* dan *chloramphenicol*. Hasil pengukuran RF dan warna pendaran disajikan pada tabel 7. Antibiotik yang dihasilkan diduga jenis *erythromycin*, *tetracycline*, *rimfampicyin*, *polymyxin* dan *chloramphenikol*.



Gambar 2. Ornamentasi permukaan rantai spora dengan Scanning Electron Microscope perbesaran 5000X
a. Strain 43 : *Spiny*, b.Strain 2: *Hairy*, c.Strain 26 : *Gepeng*

Isolasi dilakukan dengan media selektif SCA dan RHA. Penggunaan media selektif bertujuan menghambat mikroorganisme lain yang tidak diinginkan. Media SCA digunakan oleh Arraujol *et.al*¹⁴ untuk mengisolasi *Actynomyces* endofit dari akar dan daun jagung serta Lazarini *et.al*^{13S} yang mengisolasi *Actynomyces* dari tanah. Baik RHA maupun SCA dapat digunakan oleh mikroorganisme, termasuk anggota genus *Streptomyces* sebagai sumber karbon⁷. Untuk mencegah tumbuhnya jamur pada media maka ditambahkan antifungi *Cyclohexamide*.⁵ Untuk mencegah pertumbuhan bakteri lain maka dilakukan *pre treatment regime* dengan memanaskan suspensi sampel tanah pada suhu 50°C selama 10 menit. Purifikasi

dilakukan dengan media *Benneat Agar* dan *Yeast Pepton Agar* (YPA).

Berdasarkan penelitian Ambarwati⁸, *Streptomyces* lebih banyak ditemukan pada daerah perakaran karena daerah rhizosfer karena akar tanaman mengeluarkan eksudat-eksudat yang menjadi nutrisi bagi *Streptomyces*. Hal serupa juga diperoleh pada penelitian terdahulu yang dilakukan di Indonesia⁵ dan di Filipina.¹¹ Namun pada penelitian ini, hasil menunjukkan bahwa daerah rhizosfer justru lebih sedikit ditemukan. Pada vegetasi mangrove, salah satu bentuk adaptasi terhadap lingkungan yang salin adalah dengan mensekresikan garam melalui sistem perakaran. Hal ini yang menjadi faktor tingginya salinitas di daerah

sekitar akar. Salinitas yang terlalu tinggi tidak sesuai bagi pertumbuhan *Streptomyces*.

Menurut Parungao *et.al.*¹¹ daerah laut merupakan daerah yang kurang potensial untuk pertumbuhan beberapa jenis *Actinomycetes* termasuk *Streptomyces*. Goodfellow dan William¹ menyatakan bahwa pada sedimen laut *Actinomycetes* dijumpai lebih sedikit daripada pada lingkungan terestrial. Mangrove adalah lingkungan peralihan laut dan darat. Mangrove memiliki sifat salin

karena pada saat pasang daerah mangrove terendam air. Namun salinitas tidak terlalu tinggi sehingga memungkinkan *Streptomyces* hidup pada lingkungan mangrove. Sekalipun jumlah strain yang diidentifikasi sebagai *Streptomyces* tidak sebanyak yang diisolasi oleh Ambarwati⁸ dan Sembiring⁵, yang keduanya mengisolasi *Streptomyces* dari daerah terestrial, namun penelitian ini menunjukkan bahwa kawasan mangrove merupakan daerah yang potensial bagi pertumbuhan *Streptomyces*.

Tabel 4. Data RF Isolat Yang Mampu Menghasilkan Antibiotik

| Strain | RF (cm) | | | | | |
|----------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------------|------------------------|------|
| | <i>Erytromycin</i> | <i>Tetracyclin</i> | <i>Rimfamicycyn</i> | <i>Polymyxin</i> | <i>Chloramphenicol</i> | |
| Kontrol | 0,71 | 0,79 | 0,61 | 0,93 | 0,88 | 0,86 |
| T 113 | 0,71 | 0,79 | - | | 0,88 | - |
| K 308 | 0,71 | 0,82 | 0,64 | 0,91 | | - |
| K 418 | 0,70 | 0,82 | - | 0,91 | | - |
| K 406 | 0,74 | | - | | 0,87 | - |
| T 202 | 0,69 | | - | | 0,86 | - |
| K 410 | 0,71 | 0,79 | - | | 0,88 | - |
| T 412 | 0,06 | 0,82 | - | 0,90 | | - |
| T 107 | | 0,81 | - | | | - |
| K 408 | | 0,82 | - | | 0,89 | - |
| T 103 | | - | - | | | 0,86 |

Pada penghitungan densitas anggota genus *Streptomyces* diketahui bahwa total koloni pada media SCA lebih tinggi daripada pada media RHA. Hasil ini juga diperoleh pada penelitian yang dilakukan oleh Ambarwati dan Sembiring. SCA adalah media selektif bagi pertumbuhan *Streptomyces*. Pada SCA mengandung Strach yang merupakan sumber C dan KNO₃ yang menjadi sumber N. Kombinasi C dan NO₃ inilah yang hanya bisa dimanfaatkan oleh anggota genus *Streptomyces*.

Koloni isolat *Streptomyces* dapat dikenali secara langsung dengan melihat morfologi koloni atau pengamatan koloni secara mikroskopis. Pada usia pertumbuhan satu sampai dua minggu koloni

Streptomyces dapat berukuran antara 0.5 cm-1cm. Koloni *Streptomyces* memiliki perbedaan dengan mikroorganisme lain karena sifatnya yang khas yaitu: kering, kecil, permukaan seperti berserabut atau beludru. Warna koloni putih, orange atau abu-abu pada media SCA dan RHA. *Streptomyces* juga bisa dikenali dari aroma *geosmine* yang dihasilkan. *Geosmine* adalah aroma tanah yang merupakan hasil metabolit yang dihasilkan oleh *Streptomyces*. Pada penelitian ini 123 isolat (tabel 1) yang diisolasi memiliki kemampuan menghasilkan *geosmine*. Selanjutnya 123 isolat tersebut diambil sebanyak 29 isolat (tabel 2) sebagai isolat representasi berdasarkan ciri morfologi koloni, miselium dasar dan miselium udara.

Identifikasi *Streptomyces* dilakukan dengan pengecatan gram, *colour grouping*, pengamatan morfologi rantai spora dan pengamatan permukaan spora dengan SEM. Pengecatan gram dilakukan untuk mengetahui penggolongan mikroorganisme apakah gram positif atau negatif. *Streptomyces* adalah kelompok gram positif. Sejumlah 123 isolat yang diisolasi menunjukkan warna biru yang merupakan ciri kelompok gram positif.

Colour grouping dilakukan dengan menggolongkan isolat berdasarkan warna miselium udara, miselium substrat dan pigmen terdifusi.⁸ *Streptomyces* dapat menghasilkan pigmen yang khas pada media yang berbeda. Media yang sering digunakan adalah oatmeal agar dan SCA KNO₃. Pada penelitian ini digunakan oatmeal agar sebagai media untuk mengelompokkan isolat berdasarkan warna miselium udara, miselium substrat dan pigmen terdifusi. Hal ini sama seperti penelitian Sembiring.⁵ Dua puluh sembilan isolat *Streptomyces* pada penelitian ini dapat dikelompokkan menjadi 3 kelompok. Grup 1 beranggotakan 21 strain. Grup ini memiliki karakter warna miselium substrat berwarna coklat, miselium udara berwarna putih dan pigmen terdifusi kuning. Grup 2 beranggotakan 6 strain dengan karakter miselium substrat berwarna putih-kuning, miselium udara berwarna putih dan pigmen terdifusi berwarna coklat. Sedangkan grup 3 beranggota 2 strain dengan karakter warna miselium substrat berwarna kuning, miselium udara berwarna abu-abu dan pigmen terdifusi berwarna kuning.

Rantai spora adalah karakter penting dalam proses identifikasi *Streptomyces*. Menurut Gotlieb *et.al*², *Streptomyces* memiliki rantai spora yang disebut sebagai arthrospora. Setiap biakan murni dilakukan pengamatan morfologi rantai spora dengan cara melakukan preparasi rantai spora pada gelas benda. Pertumbuhan rantai spora teramati setelah usia isolat lebih dari 3 minggu. Rantai spora ini yang membentuk miselium udara pada *Streptomyces*.

Pengamatan rantai spora didapatkan bahwa ada tiga tipe rantai spora yaitu: fleksus, *curly* dan *folded*. Fleksus adalah bentuk rantai spora yang paling banyak dijumpai pada seluruh strain *Streptomyces* yang dapat diisolasi pada penelitian ini.

Permukaan rantai spora adalah karakter yang sangat penting dalam proses identifikasi *Streptomyces*. *Scanning Electron Microscope* memungkinkan untuk melakukan pengamatan permukaan rantai spora. Dalam penelitian ini dilakukan SEM pada *Streptomyces* yang diketahui memiliki kemampuan menghasilkan antibiotik dan merupakan perwakilan dari setiap grup. Hasil SEM menunjukkan permukaan rantai spora yang dihasilkan adalah *spiny*, *hairy* dan *smooth*.

Eksplorasi antibiotik dari *Streptomyces* yang diisolasi dari area laut dan mangrove sudah dilakukan oleh Yusnisar.⁹ Untuk mengetahui potensi isolat dalam menghasilkan antibiotik, maka dalam penelitian ini dilakukan uji penghambatan dengan bakteri uji *E. coli* sebagai wakil bakteri gram positif dan *S. aureus* sebagai wakil bakteri gram negatif. Penelitian yang sama dilakukan oleh Neidlkova dan Neidenova¹², Ambarwati⁸ dan Hong *et.al*.⁶

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan 5 isolat yang dapat menghambat bakteri EC yaitu strain TA R 15, KJ NR 45, KJ NR n9, KJ R n18 dan TA R 1 2. Pada penelitian ini juga didapatkan 11 isolat yang dapat menghambat SA yaitu strain TA R 2, KJ NR 4, TA R 5, TA R 26, KJ R 53, TA R n20, KJ NR n21, KJ NR n23, TA R 1 5, KJ NR 1 10 dan KJ R m5. strain-strain yang menunjukkan penghambatan terhadap bakteri uji dilakukan uji ulang masing-masing strain terhadap bakteri uji yang dapat dihambat.

Isolat yang diisolasi dari daerah rhizosfer Karimun Jawa terdapat 1 strain yang menghambat EC dan 1 strain menghambat SA. Strain yang mampu menghambat EC adalah strain KJ NR 45 dengan zona hambat 21 mm. Strain yang

mampu menghambat SA adalah strain KJ R m5 dengan zona hambat 22 mm. Sedangkan dari daerah non rhizosfer Karimun Jawa didapatkan 1 strain yang memiliki kemampuan menghambat EC dan 4 strain yang mampu menghambat SA. Strain yang menunjukkan penghambatan pada EC adalah strain KJ NR n9 dengan zona hambatan 21 mm. Strain yang memiliki kemampuan menghambat SA adalah strain KJ R 53 dengan zona hambat 17 mm, strain N21 zona hambat 16 mm, strain KJ NR n23 zona hambat 28 mm dan KJ NR 1 10 zona hambat 16 mm.

Isolat yang diisolasi dari daerah mangrove Teluk Awur didapatkan 6 isolat yang memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri uji. Strain 15 adalah isolat dari daerah rhizosfer yang memiliki kemampuan menghambat EC dengan zona hambatan 19 mm. Sedangkan strain rhizosfer Teluk Awur yang memiliki kemampuan menghambat SA adalah strain 2 dengan zona hambat 21 mm, strain 5 zona hambat 17 mm, strain TA R 26 zona hambat 17 mm strain TA R n20 zona hambat 16 mm. *Streptomyces* yang diisolasi dari daerah non rhizosfer yang memiliki kemampuan menghambat EC adalah strain TA NR 2 dengan zona hambat 23 mm. Sedangkan strain dari daerah non rhizosfer yang berkemampuan menghambat SA adalah strain TA NR 1 5 dengan zona hambat 16 mm.

Berdasarkan pengelompokan yang dilakukan oleh Neidenova dan Neidelkova¹² maka jika strain menghasilkan zona hambat 7-15 mm memiliki daya hambat lemah, 16-25 mm daya hambat sedang dan 25 mm keatas daya hambat kuat. Pada penelitian ini dari 16 strain yang memiliki kemampuan menghambat terdapat 1 strain yang memiliki hambatan kuat yaitu strain KJ NR n 23 dengan zona hambat 29 mm. Sedangkan 15 strain yang lain memiliki daya hambat sedang dengan kemampuan menghambat antara 16-23 mm.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah teknik untuk mengidentifikasi senyawa berdasarkan kelarutannya. Pada teknik KLT terdapat dua fase yaitu fase diam yaitu plate silica gel dan fase bergerak yaitu Methano-Clorofom (9:1).¹³ Penelitian ini menggunakan standar antibiotik yaitu *Erytromycin*, *Tetracyclin*, *Rimfampycin*, *Polymyxin* dan *Chloramphenicol*. Faktor retensi atau Rf adalah jarak yang ditempuh oleh komponen dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh eluen. Nilai Rf 16 isolat yang menunjukkan daya hambat pada bakteri uji sebagian besar memiliki nilai Rf yang sama dengan *Erytromycin* dan warna yang sama yaitu coklat tua. Strain-strain yang memiliki Rf dan warna bercak mirip dengan *Erytromycin* adalah strain 26, 45, L10, N9, N20, N23, L5, 25, 15, 8, N18 dan N21.

Erytromycin adalah antibiotik jenis *macrolide*. Aktivitas *erytromycin* adalah menghambat pertumbuhan dengan cara berikatan pada sub unit 50S ribosomal sehingga mencegah translokasi peptidil tRNA yang diperlukan untuk sintesis protein. Penghambatan bersifat bakteriostatik, tetapi dalam dosis yang tinggi dapat bersifat bakterisidal.¹⁴ Pada penelitian ini strain yang menunjukan Rf yang dekat dengan antibiotik *erytromycin* menunjukkan kemampuan menghambat baik *E. coli* yang merupakan wakil bakteri gram negatif maupun *S. aureus* yang merupakan wakil bakteri gram positif.

Strain yang memiliki Rf mendekati *Tetracyclin* adalah strain 45. Strain 45 memiliki kemampuan menghambat *E.coli* yang merupakan bakteri gram negatif. *Tetracycline* merupakan antibiotik bakteriostatik yang berikatan dengan subunit ribosomal 16S-30S dan mencegah pengikatan aminoasil-tRNA dari situs A pada ribosom, sehingga dengan demikian akan menghambat translasi protein.

Strain L10 dan L5 adalah strain yang memiliki kemampuan menghambat bakteri gram positif. Berdasarkan pengukuran Rf, kedua bakteri ini memiliki

nilai yang mendekati nilai Rf Rifampicin. Rifampicin merupakan antibiotik bakterisidal yang bekerja dengan cara berikatan dengan β -subunit dari RNA polymerase sehingga menghambat transkripsi RNA dan pada akhirnya sintesis protein. Rifampicin umumnya menyerang bakteri spesies *Mycobacterium*.

Chloramphenicol merupakan antibiotik bakteriostatik yang menghambat sintesis protein dan biasanya digunakan pada penyakit akibat kuman *Salmonella*. Pada penelitian satu-satunya strain yang memiliki Rf yang mendekati Rf Chloramphenicol adalah strain 5. Strain 5 memiliki kemampuan menghambat bakteri gram positif.

Angka resistensi terhadap antibiotik pada saat ini semakin meningkat seiring dengan peningkatan kasus-kasus penyakit infeksi. Eksplorasi pencarian sumber obat baru harus terus dilakukan. Hasil pada penelitian ini harus dikembangkan pada aspek pengenalan senyawa bioaktif dan uji efektifitas. Sumber antibiotik yang berasal dari mikroorganisme memiliki keunggulan dapat diproduksi oleh sel yang tingkat reproduksinya tinggi.

KESIMPULAN

Streptomyces dapat diisolasi dari sedimen risosfer dan non risosfer vegetasi mangrove. Faktor yang membatasi pertumbuhan *Streptomyces* di habitat mangrove adalah salinitas. Penelitian ini berhasil mendapatkan beberapa isolat *Streptomyces* yang diisolasi dari hutan mangrove yang mampu menghambat bakteri uji dan diduga memiliki potensi menghasilkan antibiotik. Ekosistem mangrove merupakan daerah yang potensial sebagai sumber *Streptomyces* yang berpotensi menghasilkan antibiotik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada seluruh staf Laboratorium

Bakteriologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada.

DAFTAR PUSTAKA

1. Goodfellow, M., Williams, S.T. & Mordarski, M.. *Actinomycetes* in Biotechnology. Academic Press. San Diego, 1988
2. Gotlieb, D.. General Consideration and Implication of *Actinomycetes*. The Society for Applied Bacteriology Symposium series no2 : Actinomycetales Characteristic & Practical Importance. Academic Press. London, 1973
3. Benigni, R., Antonov, P. & Carere, A. Estimate of the Genom Size by Renaturartion Studies of *Streptomyces* . *Aplied Microbiology*, 1975. 30: 324-326
4. Metsä-Ketelä M., Halo L., Munukka E., Hakala J., Mäntsälä P., & Ylihonko K..Molecular Evolution of Aromatic Polyketides and Comparative Sequence Analysis of Polyketide Ketosynthase and 16S Ribosomal DNA Genes from Various *Streptomyces* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4472-4479
5. Sembiring,L. Selective Isolation And Characteritaton of *Streptomyces* Associated With rhizosfer of The Tropical Legume, *Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen. Ph.D Thesis University of Newcastle, Newcastle upon Tyne. United Kingdom, 2000
6. Hong Kui, Gao An-Hui, Xie Qing-Yi, Gao Hao, Zhuang Ling, Lin Hai-Peng, Yu Hai-Ping, Jia Li, Yao Xin-Sheng, Goodfellow Michael, and Ruan Ji-Sheng. *Actinomycetes* for Marine Drug Discovery Isolate from Mangrove Soils and Plants in China. *Marine Drugs Discovery Journal* , 2009, 7 (1): 24-44
7. Korn- Wendisch, F.&Kutzner, H.J. The Familiy *Streptomycetaceae* In Prokaryotes, A Handbook of the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification and Aplication.

- (A. Balows, H.G Truper, M. Dworkin, W. Harder & Karl-Heinz Schlefer). Springer Verlag, London, New York, Tokyo, 1992
8. Ambarwati.. Streptomisetes penghasil Antibiotik Yang Berasosiasi Dengan rhizosfer Rumpun Teki (*Cyperus rotundus* L.) Dan Tanaman Jagung (*Zea mays* L.). Tesis Program Pasca Sarjana Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta, 2008
 9. Yusnizar. Screening of *Streptomyces* sp. Isolate From Black Water Ecosystem And Antagonism Assay to *Rhizoctonia solani* And *Hemiosporium oryzae*. www.Icbb.org/english/research/research12.htm, 2006
 10. Asad. Daya Hidup Mikroorganisme Sedimen Mangrove Dalam Seresah Daun *Acacia mangium* Wild. dan Kemampuan Dekomposisinya Terhadap Lignoselulosa. Tesis Program Pasca Sarjana Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta, 2001
 11. Paranguo M., Macea E.B.G., Villano M.A. Screening of Antibiotic Producing *Actinomycetes* from Marine, Brackish and terrestrial Sediments of Samar Island Philippines. *Journal of Research in Science, computing, and Engineering*, 2007, 4(3) : 29-38
 12. Neidilkova, D. & Neidinova, M. Screening the Antimicrobial Activity of *Actinomycetes* Strains Isolated from Antarctica. *Journal of Culture Collection*. 2005, 4:29-35
 13. Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., & Marinelli, F. Rare Genera of *Actinomycetes* as Potential Producers of New Antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, 78 (3-4): 399-405
 14. de Araujo, J.M., Silva, A.C & Azevedo, J.L. Isolation of Endophytic *Actinomycetes* from Roots and Leaves of Maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2000, 43(4): 52-58.

