

# Isolasi dan Karakterisasi Aktinomisetes Penghasil Antibakteri Enteropatogen *Escherichia coli* K1.1, *Pseudomonas pseudomallei* 02 05, dan *Listeria monocytogenes* 5407

Dwi N. Susilowati<sup>1</sup>, Ratih D. Hastuti<sup>2</sup>, dan Erny Yuniarti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

<sup>2</sup>Balai Penelitian Tanah, Jl. Ir. H. Djuanda No. 98, Bogor 16123

## ABSTRACT

**Isolation and Characterization of Actinomycetes Producing Antibacterial Compound into Enteropatogenik *Escherichia coli* K1.1, *Pseudomonas pseudomallei* 02 05 and *Listeria monocytogenes* 5407. Dwi N. Susilowati, Ratih D. Hastuti, and Erny Yuniarti.** The resistance of bacterial pathogens to some antibacterial agents and side effects of the antibacterial usage demanded discovery of new effective, safe, and active antibacterial compounds. Some pathogenic bacteria, such as enteropathogen *Escherichia coli* (EPEC) that cause diarrhoea on children and infants, *Pseudomonas pseudomallei* that cause melioidosis on human and animal, and *Listeria monocytogenes* that cause listeriosis on newly born babies mortality and death of pregnant woman. Actinomycetes is the largest bacterial group that produce antibiotics. More than 10,000 antibacterial compounds had been discovered, two-third of them were produced by this bacterial group. A study was done to isolate and characterize Actinomycetes producing antibacterial compounds effective against EPEC K1.1 and *P. pseudomallei* 02 05. Soil samples were taken from 39 locations in Indonesia and 115 actinomycetes isolates were obtained. Two of the isolates, i.e., isolate A3.5 that was effective against *P. pseudomallei* 02 05 and isolate F6.1 that was effective against EPEC K1.1 evaluated further. The isolate A3.5 had an optimum time 72 hours to produce antibacterial compound, while F6.1 took 96 hours. The antibacterial compounds produced by both isolates were dissolve in the a 70% ethyl acetate solution, but not in a 40°C warm methanol solution because it is very dissolved. The antibacterial compound extracted from the isolate A3.5 had a similar effectiveness to antibiotics bacithracyn 10 unit and neomycin 30 µg. On the other hand, the antibacterial compound extracted from isolate F6.1 had a similar effectiveness to antibiotics colistin 10 µg and doxycyclin 30 µg. Further identification of the isolates suggested that both of them belongs to the genera *Streptomyces*.

**Key words:** Actinomycetes, antibacterial compound, *Escherichia coli* K1.1, *Pseudomonas pseudomallei* 02 05, *Listeria monocytogenes* 5407.

## PENDAHULUAN

Kebutuhan antibiotik baru masih sangat tinggi, terutama yang efektif melawan mikroba patogen yang resisten terhadap beberapa jenis antibiotik. Antibiotik mempunyai nilai ekonomi tinggi dibidang kesehatan, karena kegunaannya untuk mengobati berbagai jenis penyakit infeksi. Usaha memodifikasi antibiotik yang sudah ada guna mendapatkan senyawa turunan antibiotik baru telah dilakukan, namun kenyataannya mikroorganisme memiliki kemampuan untuk bermutasi, sehingga memiliki mekanisme resistensi terhadap turunan antibiotik tersebut (Suwandi 1993).

Beberapa bakteri patogen yang memperlihatkan fenomena tersebut di antaranya adalah enteropatogen *Escherichia coli*, *Pseudomonas pseudomallei*, dan *Listeria monocytogenes*. Enteropatogen *E. coli* merupakan salah satu dari 6 serotipe *E. coli* yang dapat menyebabkan diare, terutama pada bayi dan anak-anak. *P. pseudomallei* menyebabkan *melioidosis* pada manusia dan hewan; sedangkan *L. monocytogenes* menyebabkan *listeriosis* pada janin, bayi baru lahir, dan ibu hamil yang dapat mengakibatkan keguguran kandungan atau kematian bayi (Yuniarti 2003, Ramli dan Pamoentjak 1997, Gibbon 1972).

Aktinomisetes dikenal sebagai bakteri penghasil antibiotik, karena lebih dari 10.000 antibiotik yang telah ditemukan, dua pertiganya dihasilkan oleh bakteri ini (Miyadoh dan Misa 2004). Sebagai penghasil senyawa antibiotik, aktinomisetes banyak digunakan dalam industri obat, pakan ternak atau unggas, pengawetan makanan, pertanian, dan perikanan (Ryandini 2001).

Menurut Strobel (2002, 2003) aktinomisetes, khususnya genus *Streptomyces* juga merupakan mikroba endofitik yang menjanjikan sebagai penghasil antibiotik. Akhir-akhir ini, telah ditemukan strain *Streptomyces* endofitik penghasil antibiotik pertama dari jenis munumbicin yang diisolasi dari tanaman obat *snake vine* (*Kennedia nigricans*) yang digunakan oleh suku aborigin Australia untuk mengobati dan membalut luka pendarahan (Castillo *et al.* 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk (1) mendapatkan sejumlah isolat aktinomisetes asal Indonesia penghasil antibakteri terhadap bakteri enteropatogen *E. coli* K1.1, *P. pseudomallei* 02 05, dan *L. monocytogenes* 5407, (2) mendapatkan informasi umur kultur dan pelarut senyawa aktif antibakteri tertentu yang memberikan daya hambat maksimum terhadap pertumbuhan ketiga bakteri patogen tersebut, dan (3) mengkaraktisasi isolat aktinomisetes terpilih.

## BAHAN DAN METODE

### Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil dari berbagai daerah di Indonesia, di antaranya dari Lembang (pertanaman kresmen, terung-terungan, dan benalu api), Malang (pertanaman jagung dan rerumputan), Bandung, Banten, Temanggung (pertanaman tembakau Kemlaka), dan Medan (pertanaman markisa, pisang, kubis, kopi, kentang, pertanian organik), Makasar (pertanaman jali-jali dan jati), Purworejo (pertanaman padi sawah), Nganjuk (pertanaman bawang merah), serta NTT dan Karawang, masing-masing diambil dari tanah dengan kedalaman 20 cm dari atas permukaan tanah.

### Isolasi, Pemurnian, dan Penyimpanan Aktinomisetes Asal Tanah

Isolasi aktinomisetes dilakukan dengan menggunakan metode SDS-YE dari Hayakawa dan Nonomura (1989). Masing-masing sampel tanah dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama 4 sampai 6 hari, kemudian digerus dan disaring dengan saringan nomor 3-5 mm untuk memisahkan kotoran yang berukuran besar dan membuat sampel homogen. Selanjutnya 1 g tanah diambil, disuspensikan dalam 10 ml air steril, divorteks selama 2 menit, dan dibiarkan selama 1 menit. Kemudian 1 ml suspensi ini dimasukkan ke dalam 9 ml larutan sodium dodecil sulfat (SDS) 0,05% *yeast extract* 6% dalam bufer fosfat (5 mM, pH 7,0). Setelah itu, suspensi dipanaskan di dalam *water bath* bersuhu 40°C selama 20 menit sambil dikocok setiap 5 menit. Pemanasan dimaksudkan untuk membunuh bakteri Gram negatif. Selanjutnya, 1 ml suspensi tersebut diambil dan diencerkan dengan 9 ml air steril, lalu dibuat enceran 3-5 kali konsentrasi awal. Suspensi tanah dari eceran ke-4 dan ke-5 disebarkan pada medium *humic acid vitamine agar* (HVA) (0,1% *humic acid*; 0,002%  $\text{CaCO}_3$ ; 0,001%  $\text{FeSO}_4$ ; 0,171% KCl; 0,005%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,05%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 2% agar bacto, ditambah cycloheximide 0,05 mg/ml dan vitamin B; pH 7,2), secara duplo, dan diinkubasi pada suhu 28°C selama satu minggu.

Koloni aktinomisetes yang tumbuh diambil dan dipindahkan satu per satu ke media *yeast starch agar* (YSA) (0,2% *yeast extract*; 1% *soluble starch*, 2% agar bacto; pH 7,3). Pemurnian lanjut dilakukan pada media *yeast extract-malt extract agar* (0,4% *yeast extract*; 1% *malt extract*; 0,4% dextrose, 2% agar bacto; pH 7,3). Penyimpanan isolat dilakukan pada media YSA miring dan sebagai kultur stok dan kultur kerja. Penyimpanan jangka panjang isolat aktinomisetes dilakukan dengan metode *liquid drying* dengan media krioprotektif yang komposisinya terdiri atas ribitol atau adenitol 1,5 g; bufer fosfat pH 7,2 100 ml, dan monosodium glutamat 3 g.

### Skrining Aktivitas Antibakteri terhadap Enteropatogen *E. coli* K1.1, *P. pseudomallei* 02 05, dan *L. monocytogenes* 5407

Aktivitas antibakteri isolat aktinomisetes diuji menggunakan metode difusi menurut Besson *et al.* (1978). Mula-mula isolat aktinomisetes diinokulasikan ke dalam 20 ml medium *soybean meal cair* (2% *soluble starch*; 1% glukosa; 0,3%  $\text{CaCO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 1,5% *soybean meal*; pH 7,0) dan diinkubasi pada suhu 28°C di atas mesin goyang (*shaker*) selama 5 hari. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan terbentuknya granula-granula kecil atau besar, serta perubahan warna dan kekentalan media. Kemudian, kultur aktinomisetes disentrifugasi menggunakan sentrifus Hitachi Himac dengan kecepatan 15.000 rpm dan suhu 4°C selama 30 menit, untuk memisahkan senyawa antibakteri yang disekresikan ke dalam media. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung *ependorf*, lalu difiltrasi dengan filter millipore 0,2  $\mu\text{m}$  untuk sterilisasi. Filtrat yang diperoleh disimpan di dalam kulkas bersuhu 4°C untuk diuji lebih lanjut. Selanjutnya, 20 ml media NA yang telah dicairkan dengan kondisi hangat (50-55°C) ditambah dengan 200  $\mu\text{l}$  suspensi kultur bakteri patogen *E. coli* K1.1 (koleksi IPB asal feses bayi penderita diare), *P. pseudomallei* 02 05 (koleksi Balitvet), dan *L. monocytogenes* 5407 (koleksi Balitvet) yang telah ditumbuhkan pada media *nutrient broth* (NB) atau Luria Bertani (LB) cair (1% NaCl, 0,5% *yeast extract*, 1% trypton, pH 7,5) dan kerapatannya ditetapkan  $\pm 10^7$  sel/ml. Campuran tersebut dikocok merata dan dituangkan ke cawan petri steril. Selanjutnya disiapkan potongan kertas saring Whatman steril (*paper discs*) dengan diameter 6 mm. Potongan kertas saring dicelupkan pada filtrat dari kultur suatu isolat aktinomisetes yang berumur 5 hari, kemudian dengan menggunakan pinset steril dipindahkan ke atas kultur, dua potong kertas filter/cawan. Selanjutnya kultur diinkubasikan pada suhu 30°C selama 3-5 hari dan diameter zona hambat filtrat terhadap kultur bakteri diukur.

### Penentuan Waktu Optimum Produksi Senyawa Antibakteri

Sampel filtrat aktinomisetes diambil dari kultur aktinomisetes A3.5 dan F6.1 yang diinkubasi pada medium *soybean meal* cair, masing-masing selama 24, 48, 72, 96, dan 120 jam. Selanjutnya, filtrat masing-masing kultur diuji aktivitas antibakterinya terhadap enteropatogen *E. coli* K1.1, *P. pseudomallei* 02 05, dan *L. monocytogenes* 5407. menggunakan teknik pengamatan zona hambat menurut Besson *et al.* (1978). Filtrat dari kultur isolat aktinomisetes dengan umur tertentu yang menimbulkan zona hambat tertinggi dalam waktu tertentu ditetapkan sebagai waktu optimum produksi senyawa antibakteri. Pengujian dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga ulangan. Pengamatan percobaan dilakukan dengan pengukuran zona hambat pertumbuhan (mm) bakteri patogen oleh filtrat aktinomisetes. Waktu optimum produksi senyawa antibakteri dinilai berdasarkan diameter zona hambat terbesar yang dihasilkan oleh filtrat asal isolat aktinomisetes dengan umur tertentu.

### Preparasi dan Ekstraksi Senyawa Antibakteri

Satu ose kultur isolat aktinomisetes ditumbuhkan di dalam 50 ml medium *soybean meal* cair, digoyang dengan *shaker* selama waktu optimum produksi senyawa antibakteri berdasarkan hasil penelitian tersebut di atas. Selanjutnya, kultur disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm, pada suhu 4°C selama 30 menit, untuk memisahkan senyawa antibakteri yang disekresikan ke dalam media tumbuhnya. Supernatan yang diperoleh difiltrasi dengan filter millipore 0,2 µm dan filtrat yang diperoleh dibekukan dengan merendam di dalam es kering yang telah ditambah alkohol 95%. Setelah itu, dilakukan proses pengeringan selama 30 jam menggunakan alat pengering beku (*freeze dryer*) Labconco. Filtrat yang telah dikeringkan diekstraksi secara terpisah dengan pelarut berbeda, yaitu metanol, metanol hangat bersuhu 40°C, dan etil asetat, kemudian dikocok dan dibiarkan selama 2 jam, lalu diuapkan selama 10 menit agar tidak tertinggal di dalam larutan. Hasilnya diuji kembali dengan kultur bakteri patogen enteropatogen *E. coli* K1.1, *P. pseudomallei* 02 05, dan *L. monocytogenes* 5407 dengan tek-

nik pengamatan zona hambat menggunakan enceran filtrat 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, dan 1 : 16 (pelarut organik : filtrat senyawa antibakteri).

### Karakterisasi Morfologi dan Kemotaksonomi Isolat Aktinomisetes Unggul Penghasil Senyawa Antibakteri

Karakterisasi ciri-ciri aktinomisetes diuji menggunakan metode standar menurut Miyadoh (2001) yang meliputi karakterisasi morfologi dan kemotaksonomi. Karakterisasi morfologi isolat unggul aktinomisetes A3.5 dan F6.1 dilakukan dengan mengamati koloni dengan mata telanjang dan menggunakan mikroskop. Medium padat yang digunakan ialah medium *yeast starch agar* (YSA) (Miyadoh 2001). Mula-mula, koloni aktinomisetes yang sudah tumbuh dengan baik diamati dengan mata telanjang, kemudian diamati morfologinya dengan menggunakan mikroskop secara detail. Kriteria penting yang diamati adalah ciri-ciri hifa, miselium, spora, rantai spora, dan kantong spora (*sporangium*). Pada umumnya, genus *Streptomyces* tumbuh subur dan membentuk banyak sekali hifa. Karakterisasi kemotaksonomi dilakukan dengan teknik Miyadoh (2001) berdasarkan analisis kandungan diaminopimelic acid (A<sub>2</sub>pm atau DAP). Mula-mula sel bakteri yang diuji didegradasi dengan HCl 6N pada suhu 100°C semalam, kemudian diaplikasikan ke TLC selulosa. Jika LL-A<sub>2</sub>pm dapat dideteksi, maka dapat dipastikan bahwa biakan tersebut tergolong genus *Streptomyces*. Jika terdeteksi meso-A<sub>2</sub>pm, maka isolat bakteri digolongkan ke dalam genus non-streptomyces (Tabel 1).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolat Aktinomisetes yang Memiliki Aktivitas Antibakteri terhadap Enteropatogen *E. coli* K1.1, *P. pseudomallei* 02 05, dan *L. monocytogenes* 5407

Hasil isolasi dari sampel tanah yang diambil dari 39 lokasi di Indonesia memperoleh sebanyak 115 isolat aktinomisetes. Seleksi aktivitas antibakterialnya terhadap enteropatogen *E. coli* K1.1, *P. pseudomallei* 02 05, dan *L. monocytogenes* 5407 berdasarkan pengamatan diameter zona hambat di sekitar filtrat aktinomisetes mendapatkan 40 isolat aktinomisetes yang

**Tabel 1.** Pengelompokan tipe dinding sel aktinomisetes berdasarkan kandungan senyawa kimianya (Miyadoh 2001).

| Tipe | LL-A <sub>2</sub> pm | Meso-A <sub>2</sub> pm | Glisin | Galaktosa | Arabinosa | Perkiraan genus                             |
|------|----------------------|------------------------|--------|-----------|-----------|---|
| I    | +                    | -                      | +      | -         | -         | <i>Streptomyces</i>                         |
| II   | -                    | +                      | +      | -         | -         | <i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i> |
| III  | -                    | +                      | -      | -         | -         | <i>Actinomadura</i>                         |
| IV   | -                    | +                      | -      | +         | +         | <i>Nocardia</i>                             |

berpotensi sebagai agensia penghasil senyawa antibakteri. Isolat-isolat ini terdiri atas 19 isolat yang menghambat pertumbuhan enteropatogen *E. coli* K1.1 dan 21 isolat yang menghambat pertumbuhan *P. pseudomallei* 02 05. Pada penelitian ini tidak diperoleh isolat aktinomisetes yang menghambat pertumbuhan *L. monocytogenes* 5407 (Tabel 2).

Berdasarkan besarnya diameter zona hambat, maka dari 40 isolat yang diuji, dipilih dua isolat unggul yang menghasilkan diameter zona hambat paling besar, yaitu isolat A3.5 dengan diameter 11,5 mm dan isolat F6.1 dengan diameter 11 mm (Tabel 3). Kedua isolat tersebut selanjutnya digunakan sebagai kandidat penghasil agensia antibakteri untuk penentuan waktu optimum produksi senyawa antibakteri terhadap enteropatogen *E. coli* K1.1 dan *P. pseudomallei* 02 05.

### Waktu Optimum Produksi Senyawa Antibakteri

Hasil percobaan yang diukur berdasarkan diameter zona hambatnya (mm) dengan tiga kali pengulangan menunjukkan bahwa diameter zona hambat yang semakin besar menunjukkan terjadinya penghambat-

an pertumbuhan bakteri patogen. Penghambatan ini diasumsikan akibat adanya senyawa antibakteri pada media yang disekresikan oleh aktinomisetes. Semakin banyak senyawa antibakteri yang disekresikan ke media, semakin besar diameter zona hambatnya (Tabel 4 dan Gambar 1). Diameter zona hambat yang ditimbulkan oleh filtrat isolat A3.5 terhadap *P. pseudomallei* 5407 pada kultur umur 24 jam dan 72 jam setelah inkubasi mengalami peningkatan, kemudian menurun kembali pada kultur umur 72 dan 120 jam. Hal ini mengindikasikan bahwa kultur umur 72 jam (hari ke-3) menghasilkan senyawa antibakteri terhadap bakteri *P. pseudomallei* 5407 tertinggi dan optimum.

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa filtrat kultur isolat A3.5 yang diinkubasi 72 dan diuji terhadap bakteri *P. pseudomallei* 02 05 menimbulkan zona hambat yang tertinggi dan berbeda nyata dengan diameter zona hambat yang ditimbulkan oleh filtrat kultur isolat A3.5 yang diinkubasi selama 24, 48, 96, dan 120 jam (Tabel 4). Zona hambat filtrat kultur isolat aktinomisetes F6.1 yang diinkubasi 24 hingga 96 jam terhadap enteropatogen *E. coli* K1.1 cenderung me-

**Tabel 2.** Jumlah dan distribusi 40 isolat aktinomisetes penghasil senyawa antibakteri (antagonis) terhadap *E. coli* K1.1, *L. monocytogenes* 5407, dan *P. pseudomallei* 02 05 yang dikoleksi dari beberapa wilayah di Indonesia.

| Asal isolat                 | Jumlah isolat antagonis terhadap |                     |                              |
|-----------------------------|----------------------------------|---------------------|------------------------------|
|                             | <i>P. pseudomallei</i> 02 05     | <i>E. coli</i> K1.1 | <i>L. monocytogenes</i> 5407 |
| Lembang, Jawa Barat         | 2                                | 4                   | 0                            |
| Malang, Jawa Timur          | 1                                | 2                   | 0                            |
| Serang, Banten              | 3                                | 3                   | 0                            |
| Temanggung, Jawa Tengah     | 1                                | 0                   | 0                            |
| Brastagi, Sumatera Utara    | 9                                | 6                   | 0                            |
| Maros, Sulawesi Selatan     | 1                                | 1                   | 0                            |
| Kupang, Nusa Tenggara Timur | 4                                | 2                   | 0                            |
| Karawang, Jawa Barat        | 0                                | 1                   | 0                            |

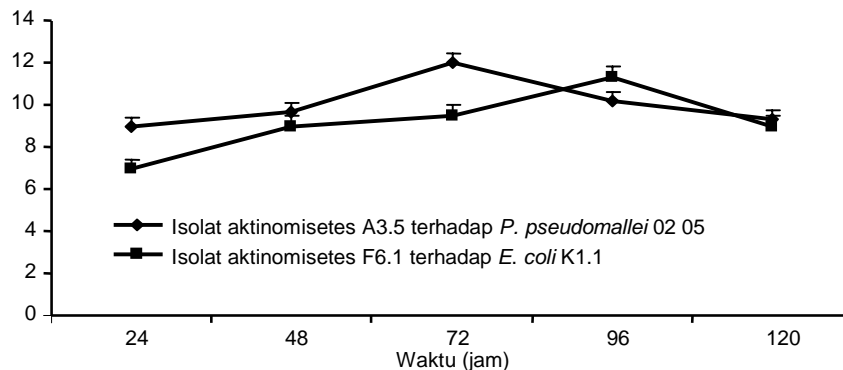
**Tabel 3.** Karakteristik dua isolat aktinomisetes unggul A3.5 dan F6.1 yang merupakan kandidat agensia penghasil senyawa antibakteri terhadap enteropatogen *E. coli* dan *P. pseudomallei*.

| Kode | Asal                | Ekosistem                      | Visual (warna koloni) | Diameter zona hambat (mm) terhadap |                             |
|------|---------------------|--------------------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------------|
|      |                     |                                |                       | <i>E. coli</i> K1.1                | <i>P. pseudomallei</i> 5407 |
| A3.5 | Lembang, Jawa Barat | Tanah, tanaman terung-terungan | Putih menjadi hitam   | -                                  | 11,5                        |
| F6.1 | Brastagi, Medan     | Tanah pertanian organik        | Putih menjadi abu-abu | 11                                 | -                           |

**Tabel 4.** Pengaruh waktu inkubasi kultur isolat aktinomisetes A3.5 dan F6.1 terhadap diameter zona hambat (mm) pada biakan *E. coli* K1.1 dan *P. pseudomallei* 5407.

| Kode | Diameter zona hambat (mm) pada waktu (Jam) |       |        |        |       |
|------|--|-------|--------|--------|-------|
|      | 24   | 48    | 72     | 96     | 120   |
| A3.5 | 9,00b                                      | 9,67b | 12,00a | 10,17b | 9,33b |
| F6.1 | 6,93c                                      | 9,00b | 9,50b  | 11,33a | 9,00b |

Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji beda nyata Duncan.



**Gambar 1.** Perkembangan aktivitas antibakteri isolat aktinomisetes A3.5 terhadap *P. pseudomallei* 02 05 dan isolat F6.1 terhadap enteropatogen *E. coli* K1.1 selama masa pertumbuhan hingga 120 jam.

tingkat, sedangkan pada filtrat kultur yang diinkubasi 96 dan 120 jam menurun. Dengan demikian, isolat aktinomisetes F6.1 mensekresikan senyawa antibakteri optimum pada kultur umur 96 jam (hari ke-4 inkubasi). Rata-rata diameter zona hambat filtrat isolat F6.1 umur 96 jam berbeda nyata dengan diameter zona hambat filtrat isolat F6.1 umur 24, 48, 72, dan 120 jam (Tabel 4). Penampakan zona hambat sangat ditentukan oleh pertumbuhan dan sensitivitas bakteri indikator, serta kecepatan difusi senyawa antibiotik di dalam media agar, tidak oleh konsentrasi senyawa antibiotik.

Waktu inkubasi optimal bagi isolat A3.5 untuk mensekresikan senyawa antibakteri ke media tumbuhnya sesuai dengan hasil penelitian Zulfarina (1998) yang melaporkan bahwa isolat *Streptomyces* sp. Menghasilkan zona bening 2-3 hari setelah ditumbuhkan pada media tumbuhnya. Umur optimum kultur isolat A3.5 untuk menghasilkan senyawa antibakteri terhadap *P. pseudomallei* 5407 (72 jam) jauh lebih cepat dibandingkan dengan isolat F6.1 untuk menghambat enteropatogen *E. coli* K1.1 (96 jam).

Isolat aktinomisetes A3.5 dan F6.1 menghasilkan senyawa antibakteri secara optimum masing-masing setelah diinkubasi selama 72 jam dan 96 jam pada medium *soybean meal* cair. Hal ini sejalan dengan pernyataan Pelczar *et al.* (1986), bahwa metabolit sekunder (antibiotik, vitamin, dan hormon) dihasilkan oleh mikroorganisme pada akhir fase stasioner pertumbuhannya.

#### Preparasi dan Ekstraksi Senyawa Antibakteri

Berdasarkan hasil penelitian waktu optimum inkubasi di atas, periode inkubasi optimal untuk mensekresikan senyawa antibakteri pada isolat A3.5 adalah 72 jam dan pada isolat F6.1 96 jam. Oleh karena itu, ekstraksi senyawa antibakteri juga dilakukan dari kultur yang diinkubasi dengan periode waktu tersebut.

Menurut Harborne (1996), untuk memperoleh ekstrak yang mengandung senyawa non-polar dapat digunakan pelarut yang sifatnya non-polar seperti etil asetat. Kelebihan pelarut ini adalah bersifat spesifik untuk senyawa non-polar. Metanol bersifat polar, sehingga pelarut ini lebih spesifik untuk senyawa yang polar. Etil asetat dapat melarutkan air hingga 3% dan memiliki kelarutan 8% di dalam air pada suhu ruang.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa antibakteri asal filtrat kultur isolat A3.5 atau F6.1 yang diekstrak dengan etil asetat 70% tidak menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* K1.1 dan *P. pseudomallei* 02 05. Hal ini diduga karena etil asetat 70% tidak dapat menarik senyawa antibakteri dari dalam filtrat, atau kemungkinan karena senyawa antibakterinya bersifat polar. Pada filtrat yang dilarutkan dengan metanol 70%, zona hambat yang dihasilkan sangat kecil, hampir tidak terlihat, sedangkan filtrat yang diekstraksi dengan metanol hangat (40°C) menghasilkan zona hambat yang besar (Gambar 2). Filtrat kultur isolat A3.5 menghasilkan zona hambat dengan diameter 18,3 mm, sedangkan filtrat kultur isolat F6.1 dengan diameter 11,6 mm (Tabel 5). Dengan demikian, metanol hangat (40°C) merupakan pelarut yang paling sesuai untuk mengekstraksi senyawa antibakteri dari kedua kultur isolat tersebut. Hal ini juga menunjukkan bahwa senyawa antibakteri dari kedua isolat aktinomisetes bukan senyawa non-polar, tetapi senyawa polar yang hanya larut pada kondisi hangat (metanol 40°C). Metanol merupakan senyawa alkohol yang paling sederhana, sehingga sangat mudah larut dalam air.

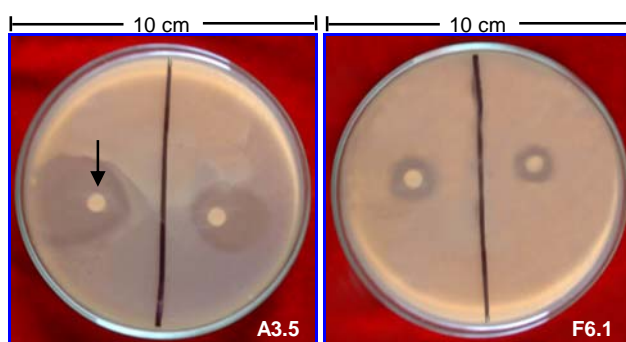
Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Byung (2001) yang menunjukkan bahwa senyawa antibakteri dari kultur *Streptomyces* sp. strain S5-55 yang diekstraksi dengan metanol menghasilkan senyawa bioaktif yang mempunyai aktivitas cukup tinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Dalam kaitannya dengan ini, Bhattacharyya *et al.* (1998) telah berhasil mengekstraksi senyawa antibiotik dari kelompok ester nonaromatik yang memiliki gugus karbonil dan lebih dari satu gugus metil dan etil dari strain *Streptomyces hygroscopicus* D1.5.

Ekstrak senyawa antibakteri dari isolat A3.5 memiliki keefektifan yang hampir sama dengan bacitracin 10 unit dan neomicin 30  $\mu\text{g}$  dalam menghambat pertumbuhan *P. pseudomallei* 02 05. Di lain pihak, ekstrak senyawa antibakteri dari isolat F6.1 memiliki keefektifan hampir sama dengan antibiotik colistin 10  $\mu\text{g}$  dan doxycyclin 30  $\mu\text{g}$  dalam menghambat enteropatogen *E. coli* K1.1 (Tabel 5).

Pada pelarut metanol hangat 40°C, senyawa antibakteri dari isolat aktinomisetes A3.5 dengan enceran

1 : 1 memberikan zona hambat paling besar terhadap *P. pseudomallei* 02 05 (18,3 mm) dan berbeda nyata dengan enceran 1 : 2; 1 : 4; 1 : 8, dan 1 : 16. Enceran 1 : 4 memberikan zona hambat yang tidak berbeda nyata dengan enceran 1 : 2. Pada filtrat isolat F6.1 yang diekstraksi dengan metanol hangat, enceran 1 : 1 menimbulkan zona hambat paling besar (11,6 mm) terhadap *E. coli* K1.1 dan berbeda nyata dengan enceran 1 : 2; 1 : 4; 1 : 8, dan 1 : 16. Enceran 1 : 4 menghasilkan zona hambat yang berbeda nyata dengan yang dihasilkan enceran 1 : 2 (Tabel 6). Menurut Omura (1992), suatu senyawa antibakteri dikatakan memiliki aktivitas tinggi, jika konsentrasi hambat minimum (KHM) terjadi pada kadar antibiotik yang rendah, tetapi mempunyai daya bunuh atau daya hambat yang besar.



**Gambar 2.** Hasil uji pengaruh senyawa antibakteri dari isolat A3.5 dan F6.1 yang diekstraksi dengan metanol hangat (40°C) terhadap bakteri patogen. Ekstrak filtrat kultur isolat A3.5 diuji terhadap *P. pseudomallei* 02 05, sedangkan ekstrak filtrat isolat F6.1 diuji terhadap *E. coli* K1.1. Tanda panah menunjukkan zona hambat pertumbuhan bakteri.

**Tabel 5.** Diameter zona hambat (mm) yang ditimbulkan oleh filtrat kultur isolat A3.5 dan F6.1 yang diekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol hangat (40°C) pada biakan bakteri *E. coli* K1.1 dan *P. pseudomallei* 02 05.

| Bakteri patogen              | Rata-rata diameter zona hambat (mm) |      |                    |            |          |            |
|------------------------------|-------------------------------------|------|--------------------|------------|----------|------------|
|                              | Metanol (40°C)                      |      | Antibiotik kontrol |            |          |            |
|                              | A3.5                                | F6.1 | Neomicin           | Bacitracin | Colistin | Doxycyclin |
| <i>E. coli</i> K1.1          | -                                   | 11,6 | -                  | -          | 10,5     | 9          |
| <i>P. pseudomallei</i> 02 05 | 18,3                                | -    | 15                 | 20         | -        | -          |

Antibiotik neomicin, bacitracin, colistin, dan doxycyclin digunakan sebagai kontrol senyawa antibakteri.

**Tabel 6.** Pengaruh enceran filtrat senyawa antibakteri dari kultur aktinomisetes isolat A3.5 dan F6.1 terhadap bakteri patogen *P. pseudomallei* 02 05 dan *E. coli* K1.1 berdasarkan diameter zona hambatnya.

| Kode isolat aktinomisetes                    | Rata-rata diameter zona hambat pada enceran filtrat (mm) |       |       |       |        |
|--|--|-------|-------|-------|--------|
|  | 1 : 1  | 1 : 2 | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 |
| A3.5 (terhadap <i>P. pseudomallei</i> 02 05) | 18,3a  | 9,67b | 7,8b  | 0c    | 0c     |
| F6.1 (terhadap <i>E. coli</i> K1.1)          | 11,6a  | 9,3b  | 7,6c  | 0d    | 0d     |

Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji beda nyata Duncan.

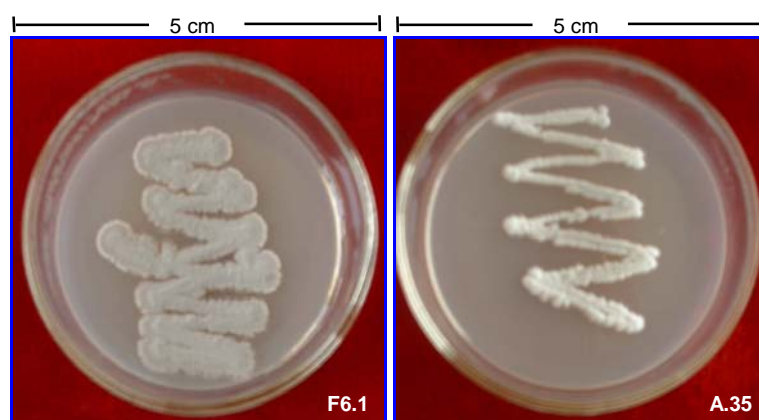
### Karakterisasi Morfologi dan Kemotaksonomi Isolat Aktinomisetes Unggul Penghasil Senyawa Antibakteri

Koloni aktinomisetes tumbuh perlahan, melekat erat pada permukaan media, dan memproduksi spora seperti serbuk. Warna koloni aktinomisetes isolat A3.5 pada awalnya putih (Gambar 3), lama kelamaan menjadi hitam, sedangkan warna koloni isolat F6.1 mula-mula berwarna putih, kemudian berubah menjadi abu-abu. Menurut Krieg dan Holt (1994), salah satu ciri khas genus *Streptomyces*, koloninya diselubungi oleh miselium udara yang bebas dan hifa yang dikelilingi oleh selubung (*sheath*) hidrofobik yang mengarah dari permukaan koloni ke udara. Hifa ini pada awalnya putih, lama-kelamaan berubah menjadi berwarna tertentu ketika mulai pembentukan spora. Selanjutnya koloni tampak memiliki serbuk di permukaannya, hal ini membedakannya dari kebanyakan koloni bakteri umumnya.

Menurut Lechevalier (1980), warna koloni aktinomisetes berbeda-beda, karena perbedaan kandungan pigmen dalam selnya, sesuai dengan masing-masing jenis aktinomisetes. Krieg dan Holt (1994) juga menyatakan bahwa genus *Streptomyces* menghasilkan pig-

men dengan kisaran warna yang beragam, bergantung pada warna miselium vegetatif dan miselium udara. Berdasarkan warna miselium tersebut, aktinomisetes dapat dikelompokkan dengan menggunakan standar dari tabel warna (*Colour Name Chart*) dari National Bureau of Standards (NBS) (Kelly 1958).

Berdasarkan hasil identifikasi, isolat aktinomisetes A3.5 dan F6.1 tergolong genus *Streptomyces*, karena tipe struktur dinding selnya LL dan mengandung diaminopimelic acid (DAP). Hasil pengamatan morfologi koloni secara mikroskopik menunjukkan bahwa kedua isolat ini mempunyai miselium udara (*aerial mycelium*) berbentuk spiral yang menghasilkan serbuk spora (Tabel 7, Gambar 4 dan 5). Hal ini sesuai dengan pernyataan Krieg dan Holt (1994) bahwa aktinomisetes yang mengandung L-DAP dan glisin, memiliki filamen yang stabil dan miselium udara dengan rantai spora yang panjang biasanya dari genus *Streptomyces* dan *Streptovercillium*. Genus *Streptomyces* juga memiliki bentukan spora berbentuk rantai (*chains*). Genus ini bersifat katalase positif, pada umumnya dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit, dan dapat mendegradasi adenin, esculin, casein, gelatin, hipoxantin, pati, dan L-tirosin (Krieg dan Holt 1994).

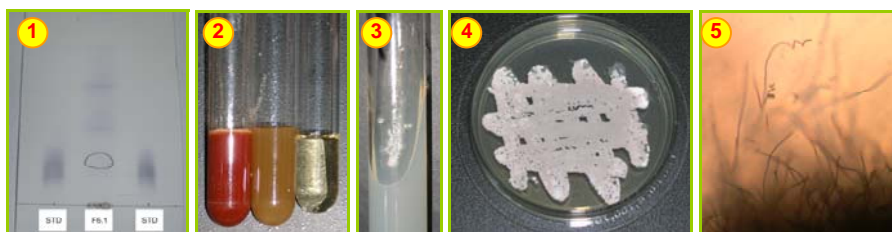


**Gambar 3.** Foto kultur isolat unggul aktinomisetes (F6.1 dan A3.5) yang digunakan sebagai kandidat penghasil senyawa antibakteri pada media *yeast starch agar* (YSA).

**Tabel 7.** Beberapa ciri-ciri morfologi dan biokimia isolat aktinomisetes F6.1 dan A3.5.

| Ciri-ciri                  | F6.1     | A3.5     |
|----------------------------|----------|----------|
| DAP (diamino pimelic acid) | LL       | LL       |
| Reduksi nitrat             | +        | -        |
| Produksi melanin           | -        | -        |
| Miselium udara             | ++++     | ++++     |
| Pengamatan morfologi       | RF to RA | RF to RA |

LL = tipe dinding sel, + (reduksi nitrat) = dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit, - = (produksi melanin) = tidak memproduksi pigmen melanin, ++++ = membentuk banyak miselium udara, RF = *rectus flexuosus*, RA = *reticulum apertum*.



1 = tipe DAP (*diaminopimelic acid*) dalam dinding sel adalah LL; 2 = dapat menggunakan nitrat sebagai penerima elektron, reaksi positif untuk reduksi nitrat ditandai dengan warna merah; 3 = *Streptomyces* yang berpigmen melanin; 4 = pertumbuhan *Streptomyces* pada media ISP<sub>2</sub> pada cawan petri berdiameter 10 cm; 5 = penampakan miselium udara di bawah mikroskop perbesaran 50 x. Tampak adanya bentuk spiral pada ujung miselium, spesifik pada *Streptomyces*.

**Gambar 4.** Foto hasil identifikasi beberapa ciri-ciri morfologi dan biokimia isolat aktinomisetes F6.1.



1 = tipe DAP (*diaminopimelic acid*) dalam dinding sel yang dimiliki ialah LL, 2 = *Streptomyces* yang tipenya tidak mereduksi nitrat, 3 = *Streptomyces* yang tidak berpigmen melanin, 4 = pertumbuhan *Streptomyces* pada media ISP<sub>2</sub> pada cawan petri berdiameter 10 cm, 5 = penampakan miselium udara di bawah mikroskop pada perbesaran 50 x. Tampak adanya bentuk spiral yang spesifik pada *Streptomyces*.

**Gambar 5.** Foto hasil identifikasi beberapa ciri-ciri morfologi dan biokimia isolat aktinomisetes A3.5.

## KESIMPULAN

Sebanyak 115 isolat bakteri aktinomisetes telah diisolasi dari sampel tanah yang diambil dari 39 lokasi di Indonesia. Dua isolat unggul terpilih, yaitu A3.5 yang mensekresikan senyawa antibakteri terhadap *P. pseudomallei* 02 05 dan F6.1 yang mensekresikan senyawa antibakteri terhadap *E. coli* K1.1 diperoleh dari seleksi isolat. Waktu optimum inkubasi untuk produksi senyawa antibakteri dari isolat A3.5 adalah 72 jam; sedangkan isolat F6.1 adalah 96 jam. Senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh kedua isolat tersebut tidak larut dalam etil asetat 70%, tetapi larut dalam metanol hangat (40°C). Filtrat senyawa antibakteri dari isolat aktinomisetes A3.5 yang dilarutkan dalam metanol hangat yang diencerkan 1 : 1 memberikan diameter zona hambat paling besar (18,3 mm) terhadap *P. pseudomallei* 02 05; sedangkan filtrat dari kultur isolat F6.1 yang dilarutkan dalam metanol hangat dengan konsentrasi 1 : 1 memberikan zona hambat paling besar (11,6 mm) terhadap *E. coli* K1.1. Isolat A3.5 menghasilkan filtrat senyawa antibakteri yang keefektifannya setara dengan antibiotik bacitracin 10 unit dan neomicin 30 µg. Isolat F6.1 menghasilkan filtrat senyawa antibakteri dengan keefektifan setara dengan antibiotik

colistin 10 µg dan doxycyclin 30 µg. Isolat F6.1 dan A3.5 termasuk genus *Streptomyces*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Besson, F., F. Peypoux, G. Michel, and L. Delcambe. 1978. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. *J. Antibiotics* 31:284-288.
- Bhattacharyya, B.K., C.D. Sushil, and K.S. Sukanta. 1998. Antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* D1-5. Cultural effect. School of Life Sciences, Department of Botany, India. [www.scielo.br](http://www.scielo.br).
- Byung, K.H. 2001. Isolation and *in vivo* and *in vitro* antibacterial activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. environ. microbiol.* p. 741-753.
- Castillo, Y., G.A. Strobel, and E.J. Ford. 2002. Munumbicins wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces munumbi*, endophytic on *Kennedia nigriscans*. *Microbiology* 148:2675-2685.
- Gibbon, N.E. 1972. Listeria Pirie. Whom does it honor. *J. Sist. Bact.* 22:1.
- Harborne, J.B. 1996. Metode Fisikokimia. Terbitan ke-2. Penerbit ITB, Bandung. hlm. 47-158.



- Hayakawa, M. and H. Nonomura.** 1989. A new method for the intensive isolation of actinomycetes from soil. *Actinomycetology* 3:95-104.
- Kelly, K.L.** 1958. Central notations for the revised ISCC-NBS color name blocks. *J. Research NBS* 6:427.
- Krieg, N.R. and Holt.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. William and Wilkins, London. p. 605-675.
- Lechevalier, H.A. and Lechevalier M.P.** 1980. Biology of *actinomycetes*. *Annu. Rev. Microbiol* 21:71-100.
- Miyadoh, S.** 2001. Identification manual of actinomycetes. The Society for Actinomycetes of Japan, Japan.
- Miyadoh, S. and Misa.** 2004. Workshop on isolation methods and classification of actinomycetes. Biotechnology Center, Indonesian Institute of Sciences, Bogor.
- Omura, S.** 1992. The search for bioactive compounds from microorganism. Springer Verlag, New York.
- Pelczar, M.J. dan E.C.S. Chan.** 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi 1*. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Ramli, A. dan Pamoentjak.** 1997. *Kamus Kedokteran*. Edisi Revisi. Penerbit Djambatan, Jakarta.
- Ryandini, D.** 2001. Efektivitas isolat aktinomisetes perairan dalam menghambat *Aeromonas hydrophila*, bakteri patogen ikan gurami (*Osphronemus gouramy* Lac.). Thesis Program Pascasarjana, Institut Teknologi Bandung.
- Strobel, G.A.** 2002. Rain forest endophytes and bioactive products. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22:315-333.
- Strobel, G.A.** 2003. Endophytes of bioactive products. *Microbes Infect.* 5:535-544.
- Suwandi.** 1993. Skrining mikroorganisme penghasil antibiotik. Pusat Penelitian dan Pengembangan PT. Kalbe Farma, Jakarta.
- Yuniarti, E.** 2003. Aktivitas protease ekstraseluler dan ketahanan *Escherichia coli* enteropatogen K1.1 pada substrat laktoperoksidase. Thesis Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Zulfarina.** 1998. Isolasi dan kloning shotgun gen xylanase *Streptomyces* sp. Thesis Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
-