

Eksplorasi Keanekaragaman Aktinomisetes Tanah Ternate Sebagai Sumber Antibiotik

Arif Nurkanto¹, Febrianti Listyaningsih³, Heddy Julistiono¹ & Andria Agusta²

¹Bidang Mikrobiologi, Puslit Biologi LIPI, Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta Bogor KM 46 Cibinong 16911, e-mail: arif.nurkanto@lipi.go.id

²Bidang Botani, Puslit Biologi LIPI

³Jurusan Biologi, F.MIPA Universitas Diponegoro Semarang

ABSTRACT

Exploration of Soil Actinomycetes Diversity from Ternate as Indigenous Antibiotic Sources.

Actinomycetes of soil samples from Ternate, North Moluccas were isolated using SDS-YE method in humic acid vitamin agar. Ternate has high abundance of Actinomycetes, approximately $6.00 - 487 \times 10^4$ CFU/ g soil, depends on habitat types. We have selected 60 isolates and conducted antibiotic screening against pathogenic bacteria and fungi using agar diffusion method and found both narrow and broad antibiotic spectrum types. Based on 16S rDNA analysis, all Actinomycetes with antibiotic activities are belong to the genus *Streptomyces*. Minimum Inhibitor Concentration (MIC) value was determined by broth microdilution method. It was found that MIC values varied, depended on microbial tested. We found two isolates with higher antibiotic activity compared to the commercial antibiotics (chloramphenicol, erythromycin for antibacterial and nystatin, kabicidin for antifungal). Cell destruction analysis caused antibiotic activities was conducted through leak of protein and nuclatic acid.

Key words : Actinomycetes, soil, Ternate, antibiotic, cell distruction

PENDAHULUAN

Aktinomisetes memegang peranan yang amat penting dalam industri farmasi karena kemampuannya dalam memproduksi senyawa metabolit yang bervariasi, baik dari struktur maupun fungsinya. Senyawa metabolit yang di hasilkan oleh aktinomisetes banyak yang memiliki aktivitas antagonis terhadap bakteri maupun jamur. Atas dasar ini maka aktinomisetes banyak dikembangkan dan digunakan sebagai bahan obat dalam penanggulangan berbagai

macam penyakit, baik pada manusia maupun hewan (Solanki *et al.* 2008; Hopwood 2007) Pencarian bahan obat baru berbasis metabolit aktinomisetes terus dilakukan dengan berbagai macam metode pendekatan, baik berupa eksplorasi daerah khusus atau lingkungan unik, pengembangan metode isolasi, sampai pada teknik rekayasa genetika.

Aktinomisetes merupakan kelompok bakteri yang terdistribusi luas di tanah, serasah, air dan sumber-sumber alami yang lain (Debananda *et al.* 2009; Hopwood 2007; Sette *et al.* 2005) bahkan

di lingkungan yang ekstrim sekalipun (Hamdali *et al.* 2008). Keragaman dan jenis aktinomisetes sangat dipengaruhi oleh faktor kimia, fisika dan biologi lingkungan di sekitarnya. Identifikasi lingkungan ekologi yang baru merupakan faktor krusial dalam penemuan jenis baru dari aktinomisetes yang juga memiliki senyawa metabolit yang baru pula. Lingkungan ekologi baru yang paling sering menghasilkan jenis baru dan metabolit baru diantaranya adalah lingkungan ekstrim seperti gurun pasir, dasar lautan, daerah es dan daerah hutan hujan tropis (Nolan & Cross 1988; Okazaki & Naito 1986; Saadoun & Gharaibeh 2003). Khusus untuk daerah hutan hujan tropis, merupakan target lingkungan ekologi yang sangat menarik dalam eksplorasi aktinomisetes penghasil senyawa metabolit tertentu. Hutan hujan tropis sangat memungkinkan ditemukannya keragaman dan populasi aktinomisetes yang tinggi dan membuka peluang besar untuk memperoleh metabolit baru.

Indonesia memiliki daerah hutan hujan tropis salah satu yang terbesar di dunia yang merupakan “hot spot” dari keanekaragaman hayati, termasuk bakteri. Ternate, salah satu pulau di jajaran Kepulauan Maluku dan Maluku Utara, merupakan salah satu daerah yang menarik untuk dikaji karena pertimbangan beberapa hal. Disamping merupakan hutan hujan tropis dengan lingkungan hangat dan lembab sepanjang tahun, pulau ini juga memiliki kondisi tanah yang unik karena sebagian besar tersusun atas magma dan lava beku yang relatif muda hasil erupsi Gunung Gamalama. Disamping kondisi lingku-

ngannya yang menarik, eksplorasi bakteri di Ternate hamper tidak pernah dilakukan. Hal ini akan memberikan informasi baru yang penting tentang inventarisasi keanekaragaman aktinomisetes Indonesia dalam kaitannya sebagai *drug discovery* di kawasan Wallacea ini. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan aktinomisetes yang terkarakterisasi dan teridentifikasi dengan kemampuan antibiotik yang tinggi, untuk pengembangan lebih lanjut.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel tanah diambil sebanyak 500 g, dikeringanginkan selama 7 hari, digerus dengan menggunakan mortar, kemudian disaring menggunakan saringan tepung. Sampel yang telah kering dilakukan isolasi aktinomisetesnya dengan metode Sodium Dodesyl Sulfat – Yeast Ekstrak (SDS-YE) pada medium Humic Vitamin Agar (HVA) (Hayakawa & Nanomura, 1987; Hayakawa *et al.* 2004; Nurkanto *et al.* 2008) dan diinkubasi selama 14 sampai dengan 21 hari pada suhu 28°C. Koloni yang tumbuh dari masing-masing cawan petri dihitung. Koloni yang dihitung dari tiap cawan petri harus lebih dari 10 koloni (Lee & Hwan 2002) untuk kemudian dikalkulasi dalam perhitungan total jumlah koloni per gram sampel tanah. Koloni aktinomisetes yang tumbuh dipindahkan ke medium *Yeast Strach Agar* (YSA) untuk mendapat isolat murni.

Identifikasi isolat terpilih dilakukan melalui pendekatan molekular 16S rDNA. Tahapan yang dilakukan berupa ekstraksi DNA, amplifikasi menggu-

nakan Polymerase Chain Reaction (PCR), visualisasi hasil PCR, purifikasi DNA hasil amplifikasi, cycle sequencing, sekuen dan analisis data.

Ekstraksi DNA menggunakan metode GES (Pitcher *et al.* 1989) dilanjutkan dengan amplifikasi. Primer 20 F (5'-GATTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1500 R (5-GTTACCTTGTTACGACTT-3') 10 pmol masing-masing sebesar 0,625 µL, DNA template 5 µL, DMSO 0,5 µL, Go Taq (Promega) sebesar 12,5 µL dan 5,75 µL *deionized water*.

Reaksi PCR dengan menggunakan Thermalcycler (Takara Shuzo Co., Ltd., Shiga, Japan) selama 30 siklus. Pemanasan pertama pada suhu 95 °C selama 1,5 menit, kemudian dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi 0,5 menit pada suhu 95 °C, annealing 0,5 menit pada suhu 50 °C dan 1,5 menit ekstensi pada suhu 72 °C. Setelah 30 siklus selesai, diikuti 10 menit pada suhu 72 °C dan pendinginan pada suhu 4 °C selama 30 menit. Hasil amplifikasi di fraksinasi secara elektroforesis menggunakan Mupid Mini Cell (exu) pada gel agarose 1% dalam buffer TAE (Tris Acetat-EDTA) selama 25 menit pada 100 V. Gel hasil elektroforesis direndam dalam larutan ethidium bromida dengan konsentrasi 1 µL/100 mL selama 20 menit. Hasil pemisahan divisualisasi pada *Gel Doc Printgraph* (Bioinstrument, ATTO) menggunakan UV transluminator dengan menggunakan standar 100 bp DNA ladder (Promega) untuk mengetahui hasil dan ukuran pita DNA hasil amplifikasi.

Ke dalam 25 µl sampel produk PCR ditambahkan 15 µl larutan PEG (40% PEG 6000 dan 10 mM MgCl₂) dan 6 µl 3 M sodium asetat. Bolak-balik selama 10 menit dan sentrifugasi dengan kecepatan 16.100 g selama 25 menit. Supernatan dibuang dengan cara dipipet. Pellet DNA dicuci dengan 50 µl etanol 70% sebanyak 2 kali. Dan pellet dilarutkan dengan 20 µl dH₂O *ultra pure*. Sampel 16s rDNA murni disimpan pada - 20° C.

Tahap selanjutnya adalah cycle sequencing dengan menggunakan primer 520 F (5'-GTGCCAGCAGCCGCGG-3'), 920 R (5'-CCGTCAATTCATTTGAGTTT-3'), 520 R (5'-ACCGCGGCTGCTGGC-3'), 920 F (5'-AAACTCAAATGAATTGACGG-3'), 20 F (5'-GATTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1500 R (5 -GTTACCTTGTTACGACTT-3'). Komposisi yang digunakan untuk tiap tabung adalah 0,5 µL primer 10 pmol, 1 µ DNA hasil purifikasi, 0,5 µL Big Dye Terminator sequen premix kit (Applied Biosystems Inc., Warrington, UK), 5 kali sequen bufer 1,5 µL dan *deionized water* sampai volume 10 µL. Selanjutnya dilakukan amplifikasi dengan PCR sebanyak 40 siklus. Pemanasan pertama pada suhu 96 °C selama 60 detik diikuti dengan siklus yang terdiri dari denaturasi 10 detik pada suhu 96 °C, annealing 5 detik pada suhu 50 °C.

Preparasi dilakukan dengan mencampurkan 10 µL produk *cycle sequencing* dengan 1 µL 3M Na-acetat, 1 µL 125 mM EDTA (pH 8) dan 25 µL ethanol absolut kemudian di vortex dan didiamkan selama 15 menit. Tahap berikutnya dilakukan sentrifugasi 16.000 xg selama 25 menit pada temperatur

dingin (4 °C) . Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 70% athanol untuk kemudian disentrifugasi ulang 16.000 xg selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikeringanginkan selama 10 menit. Pelet DNA yang sudah kering ditambah dengan 10 µL HiDi-Formamide (Applied Biosystems Inc., Warrington, UK) dan di vortex. Sampel kemudian dipanaskan 95 °C selama 2 menit dan segera didinginkan dalam es. Tahap selanjutnya sampel diinjeksi dengan sekuenser model ABI 3130 (Applied Biosystems Inc., Foster, California).

Analisis DNA menggunakan program BioEdit dan dilakukan *blast* pada Bank Gen *NCBI dataLibrary*. filogenetik analisis menggunakan program *multiple aligment* Clustal X versi 1.83. Konstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak kekerabatan genetik dengan metode *Neighbor joining*. Konstruksi jarak evolusi dalam derajat kepercayaan menggunakan *bootstrap value* pada program NJ plot.

Masing-masing isolat aktinomisetes ditumbuhkan dengan 100 ml medium cair *Actino Medium No. 1* (Daigo, Japan) dengan komposisi 5 g polipepton, 3 g ekstrak khamir, 1 L H₂O, pH 7,2. Inkubasi dilakukan selama 7 hari dengan penggojogan pada *rotary shaker* dengan kecepatan 130 rpm pada suhu 28 °C.

Ekstraksi untuk mendapat produk metabolit dilakukan dengan menambahkan 100 ml larutan etil asetat dan metanol (4 : 1) selama 3 kali, dan kemudian dikeringkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 35 °C. Kristal metabolit yang terbentuk ditimbang dan dilarutkan kembali dengan aseton.

Ekstrak yang diperoleh dianalisis dengan teknik KLT (gel silika GF₂₅₄) dengan larutan pengembang campuran CH₂Cl₂ dan methanol dengan perbandingan 15:1. Kromatogram KLT kemudian dimonitor dengan pemaparan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan pereaksi penampak noda 1% CeSO₄ dalam 10% H₂SO₄ pekat.

Mikroba uji yang digunakan berupa bakteri gram positif dan negatif (*Escherichia coli* NBRC 14237, *Bacillus subtilis* NBRC 3134, *Staphylococcus aureus* NBRC 13276, *Micrococcus luteus* NBRC 1367) dan fungi/yeast (*Candida albicans* NBRC 1594, *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 10217 dan *Aspergillus niger*). Uji antibiotik yang dilakukan adalah metode difusi media. Pengujian antibakteri dilakukan dengan menuangkan 4 mL *top layer* media Mueller Hinton (Difco) 0,5 resep yang mengandung 0,2 mL bakteri uji ke atas medium Mueller Hinton agar (ekstrak beef 2g/L, casein 17,5 g/L *Strach* 1,5 g/L dan agar 17 g/L) dalam petridish. Pengujian antifungi/yeast sama dengan pengujian antibakteri, tapi media yang digunakan adalah Saburoad (Difco, 10 g/L pepton, 40 g/L glukosa, 17 g/l agar). Uji antibiotik dilakukan dengan meletakkan *paper disc* steril yang dicelupkan dalam larutan hasil ekstraksi pada agar. Indikasi produk antibiotik dapat diamati dengan terbentuknya zona bening di sekitar *paper disc*.

Penentuan MIC dilakukan terhadap Mikroba uji, yaitu bakteri gram negatif, bakteri gram positif, yeast dan *filamentous fungi*. Mikroba yang digunakan sama dengan uji aktivitas

antibiotik. Mikroba tersebut di tumbuhkan pada suhu 35 p C dalam medium cair (Mueller Hinton untuk bakteri, Saboroad untuk yeast dan fungi). Waktu inkubasi tiap mikroba berbeda, mulai dari 12 – 24 jam. Tiap interval waktu dilakukan penghitungan jumlah koloni dengan metode Agar plating hingga diperoleh konsentrasi sel $1 - 5 \times 10^5$ CFU/ mL. Metode yang digunakan dalam penentuan MIC adalah *Broth Microdilution Method* (Schwalbe *et al.* 2007 ; Rahman *et al.* 2005).

Pengamatan dilakukan dengan 3 kali ulangan pada waktu yang berbeda. Dilakukan juga uji konfirmasi dengan menggunakan metode *Agar difusion method* terhadap hasil MIC yang di peroleh dengan metode *Broth Microdilution method*. Hal ini dilakukan untuk memastikan ada tidaknya pertumbuhan mikroba uji. Untuk mengetahui aktivitas dan kemampuan daya hambat ekstrak terhadap mikroba uji, dilakukan uji banding dengan menggunakan antibiotik komersial berupa antibakteri (kloramphenicol dan eritromycin) anti yeast dan antifungi (kabicidin dan nystatin).

Uji Kebocoran Sel

Suspensi mikroba uji yang telah ditumbuhkan selama 24 jam dalam media NB (bakteri) dan YMB (kapang dan khamir) sebanyak 10 ml diambil, ditambahkan 0,5 mL tween 80. Larutan bakteri uji disentrifuge dingin dengan kecepatan 3500 rpm selama 20 menit. Filtrat dibuang kemudian pelet dalam tabung dicuci dengan buffer fosfat pH 7,0 sebanyak dua kali. Larutan buffer

fosfat dan sel mikroba di tambah dengan ekstrak isolat Aktino dengan konsentrasi 1 MIC dan 2 MIC serta kontrol (tanpa penambahan ekstrak), diinkubasi dalam inkubator goyang selama 24 jam. Suspensi di sentrifuge 3500 rpm selama 15 menit, lalu dipisahkan supernatan dan peletnya. Cairan supernatan diambil dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dengan menggunakan spektrofotometri UV/VIS (Shimadzu, Japan).

HASIL

Kelimpahan Aktinomisetes

Perhitungan kelimpahan aktinomisetes yang dilakukan berdasarkan tingkat elevasi gunung Gamalama, mulai dari titik terendah sampai pada puncak gunung. Sampel yang diambil sebanyak 12 titik. Hasil penghitungan total koloni aktinomisetes cukup bervariasi, mulai dari ketinggian 8 sampai 1500 m dpl. Berdasarkan analisis statistik menggunakan SPSS v.13 ($p = 0,95$), dari titik pengambilan sampel tidak ditemukan adanya pola penyebaran yang berkorelasi antara ketinggian dan kelimpahan (Tabel 1).

Isolasi dan *Screening* Antibiotik

Telah diisolasi sebanyak 60 isolat untuk di lakukan *screening* produksi antibiotik terhadap bakteri gram positif, gram negatif, yeast dan jamur berfilamen. Disamping dilakukan pengujian antibiotik, dilakukan juga kuantifikasi senyawa metabolit yang produksi oleh masing-masing isolat uji. (Tabel 02). Aktivitas antibiotik ditunjukkan dengan adanya

zona bening di sekitar kertas cakram (Gambar 1 dan 2).

Analisis Molekuler 16 S rDNA

Identifikasi molekuler dengan 16S rDNA telah dilakukan terhadap isolat aktinomycetes yang memiliki aktivitas antibiotik. Hasil analisis menunjukkan bahwa sebagian besar dari aktinomisetes yang memiliki aktivitas antibiotik adalah kelompok *Streptomyces*. Fisualisasi produk PCR dan hasil analisis konstruksi pohon filogenetik seperti pada Gambar 3 dan 4.

Penentuan Minimum Inhibitor Concentration (MIC)

Isolat yang memiliki aktivitas antibiotik tertinggi dan telah diidentifikasi

(MG.500.1.1 dan MG 1250.1.2.) dikultivasi ulang dengan skala medium yang lebih besar (1 liter) dan di ekstrak metabolitnya. Penentuan MIC ekstrak terpilih dilakukan dengan membandingkannya dengan antibiotik komersial. Hasil analisis perhitungan MIC pada Tabel 3.

Analisis Kebocoran Sel

Analisis kebocoran sel dilakukan dengan analisis kandungan protein dan asam nukleat yang di keluarkan sel setelah perlakuan. Perlakuan adalah 0 MIC, 1 MIC dan 2MIC terhadapap dua ekstrak dari 2 isolat di atas. Ekstrak MG 500 1.1 diujikan pada *E. coli* dan *S. cerevisiae*. Ekstrak 1250 1.2 diujikan pada *A. Niger*. Hasil analisis seperti pada Gambar 5.

Tabel 1. Perhitungan total koloni tiap gram sampel yang terkait dengan faktor lingkungan

Sampel	Posisi	Ketinggian (m)	pH	Subtrak / vegetasi	Total koloni (CFU/g sampel) x 10 ⁴
A.1	00.53.604 N 127.21.403 E	8	7.0	No vegetation	6,0 ± 0.70
MG.10	00.47.462 N 127.18.072 E	17	7.0	<i>Durio</i> sp.	487,5 ± 95,45
LAGUNA	00.46.000 N 127.20.969 E	250	7.0	Cengkeh (<i>Syngzigium aromaticum</i>)	62,5 ± 3,53
BBL-1	00.46.438 N 127.19.275 E	370	7.0	Lahar hitam	50,0 ± 33,5
BBL-2	00.46.438 N 127.19.275 E	370	7.0	Lahar merah	60,0 ± 14,10
MG.500	00.47.001 N 127.21.325 E	514	6.5	Monoculture pala (<i>Miristrica fragans</i>)	200 ± 21,21
MG.750	00.47.252 N 127.21.118 E	742	6.9	Cengkeh	95 ± 0,00
MG.1000.1	00.47.764 E 127.20.749 E	1000	6.8	Pandan, heterogen	145,0 ± 7,07
MG.1250	00.47.705 N 127.20.864 E	1253	6.0	<i>Pandanus</i> sp.	87,5 ± 17,67
MG.1500	00.47.881 N 127.20.686 E	1463	6.9	Heterogen	42,5 ± 3,53

Tabel 2. Produksi Metabolit dan Kemampuan antibiotik isolat aktinomisetes.

No	Isolat	Produksi senyawa (mg/ml)	Rerata diameter zona hambat (mm)						
			<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>
1	MG 500.1 2	57,2	-	-	-	-	-	-	-
2	MG 500.1 1	0,3	31	30,5	25	25,5	-	25	-
3	MG 1500.1 6	0,14	-	-	-	-	-	-	-
4	MG 1500.1 5	0,1	-	-	-	-	-	-	-
5	MG 500.1 3	0,04	-	-	-	-	-	-	-
6	MG 500.1 4	0,02	-	-	-	-	-	-	-
7	MG 500.1 5	0,02	-	-	-	-	-	-	-
8	MG 500.1 6	0,04	-	13	10,5	10.5	-	-	-
9	MG 500.1 7	0,1	-	-	-	-	-	-	-
10	MG 500.1 8	0,58	-	-	-	-	-	-	-
11	MG 1500.1 1	0,02	-	-	-	-	-	-	-
12	MG 1500.1 2	0,18	-	-	-	-	-	-	-
13	MG 1500.1 3	0,04	-	-	-	-	-	-	-
14	MG 1500.1 4	0,18	-	-	-	-	-	-	-
15	MG 1500.1 7	0,06	-	-	-	-	-	-	-
16	LGN 1 1	0,3	-	-	-	-	-	-	-
14	LGN 1 2	0,3	-	-	-	-	-	-	-
18	LGN 1 3	0,38	-	-	-	-	-	-	-
19	LGN 1 4	0,5	-	-	-	-	-	-	-
20	LGN 1 5	0,3	-	-	-	-	-	-	-
21	BBL 2 1	1,57	-	-	-	-	-	-	-
22	BBL 2 2	0,84	-	-	-	-	-	-	-
23	BBL 2 3	0,1	-	-	-	-	-	-	-
24	BBL 2 4	0,56	-	-	-	-	-	-	-
25	BBL 2 5	0,26	-	-	-	-	-	-	-
26	A 1 1	0,5	-	-	-	-	-	-	-
27	A 1 2	0,04	-	-	-	-	-	-	-
28	A 1 3	0,24	-	-	-	-	-	-	-
29	A 1 4	0,28	-	-	-	-	-	-	-
30	A 1 5	1,84	-	-	-	-	-	-	-
31	A 1 6	0,08	17	-	-	-	-	-	-
32	MG 750.1 5	0,42	-	-	-	-	-	-	-
33	MG 1250 1 1	0,14	-	-	-	-	-	-	-
34	MG 1250 1 2	0,38	-	-	-	-	-	-	31,7
35	MG 1250 1 3	0,58	-	-	-	-	-	-	-
36	MG 1250 1 4	0,38	-	-	-	-	-	-	-
37	BBL 1 1	0,94	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 2. Lanjutan

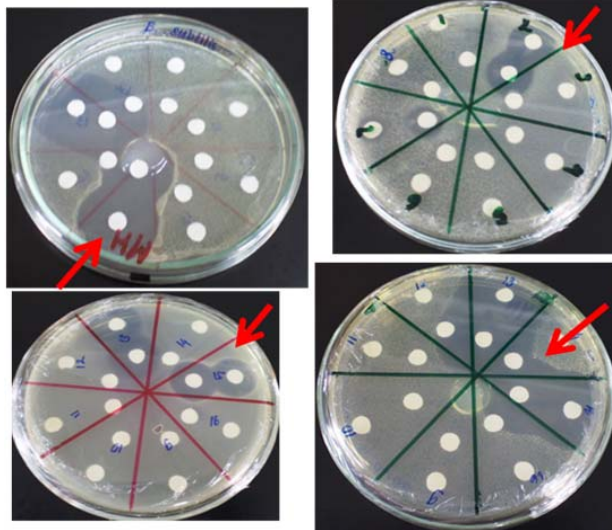
No	Isolat	Produksi senyawa (mg/ml)	Rerata diameter zona hambat (mm)						
			<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. niger</i>
38	BBL 1 2	2,90	7	8,5	9,5	8,5	-	-	-
39	BBL 1 3	0,58	-	-	-	-	-	-	-
40	BBL 1 4	0,48	-	-	-	-	-	-	-
41	MG 750.1 1	0,24	-	-	-	-	-	-	-
42	MG 750.1 2	0,14	-	-	-	-	-	-	-
43	MG 750.1 3	0,64	-	-	-	-	-	-	-
44	MG 750.1 4	0,08	-	-	-	-	-	-	-
45	MG 1000.1 1	0,02	-	-	-	-	-	-	-
46	MG 1000.1 2	0,2	-	-	-	-	-	-	-
47	MG 1000.1 3	0,02	-	-	-	-	-	-	-
48	MG 1000.1 4	0,02	-	-	-	-	-	-	-
49	MG 1000.1 5	0,08	-	-	-	-	-	-	-
50	MG 1000.1 6	0,24	-	-	-	-	-	-	-
51	MG 10.1.S 1	1,05	-	-	-	-	-	-	-
52	MG 10.1.S 2	0,2	-	-	-	-	-	-	-
53	MG 10.1.S 3	1,14	-	-	-	-	-	-	-
54	MG 10.1.S 4	0,52	-	-	-	-	-	-	-
55	MG 10.1.S 5	2,19	-	-	-	-	-	-	-
56	MG 10.1.S 6	0,08	-	-	-	-	-	-	-
57	MG 10.1.S 7	0,04	-	-	-	-	-	-	-
58	MG 10.1.S 8	0,2	7,5	-	-	-	-	-	-
59	MG 10.1.S 9	0,06	-	-	-	-	-	-	-
60	MG 500.1 9	0,58	-	-	-	-	-	-	-

Isolat yang memiliki aktivitas antibiotik dan telah diidentifikasi di simpan dalam bank koleksi kultur di *LIPi Microbial Culture Collection* (LIPIMC), Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI dengan nomer koleksi seperti pada Tabel 4.

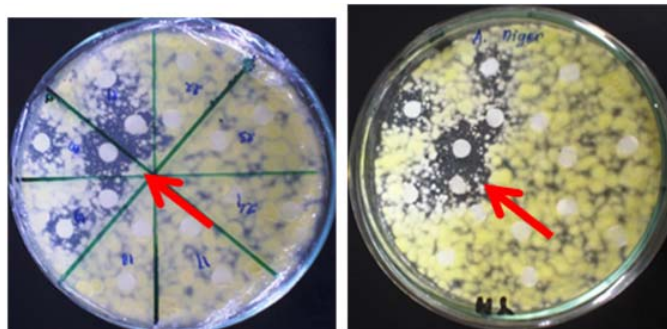
PEMBAHASAN

Data yang diperoleh menunjukkan bahwa perbedaan kelimpahan yang terjadi kemungkinan lebih disebabkan

oleh kondisi biologi, kimia dan fisika tanah serta vegetasi naungan, bukan karena ketinggian tempat. Sampel tanah dari habitat A1 memiliki kepadatan yang jauh lebih rendah dibandingkan yang lain. Hal ini disebabkan karena struktur tanah adalah larva beku yang keras, sehingga tidak memungkinkan adanya sirkulasi udara yang baik. Disamping itu, lava belum terdegadasi sehingga memiliki kandungan nutrisi yang relatif rendah dan tidak sesuai dengan kondisi pertumbuhan aktinomisetes.



Gambar 1. Zona bening yang terbentuk oleh aktivitas antibakteri dari senyawa yang diproduksi oleh aktinomisetes.



Gambar 2. Zona bening yang terbentuk oleh aktivitas anti jamur dari senyawa yang diproduksi oleh aktinomisetes.

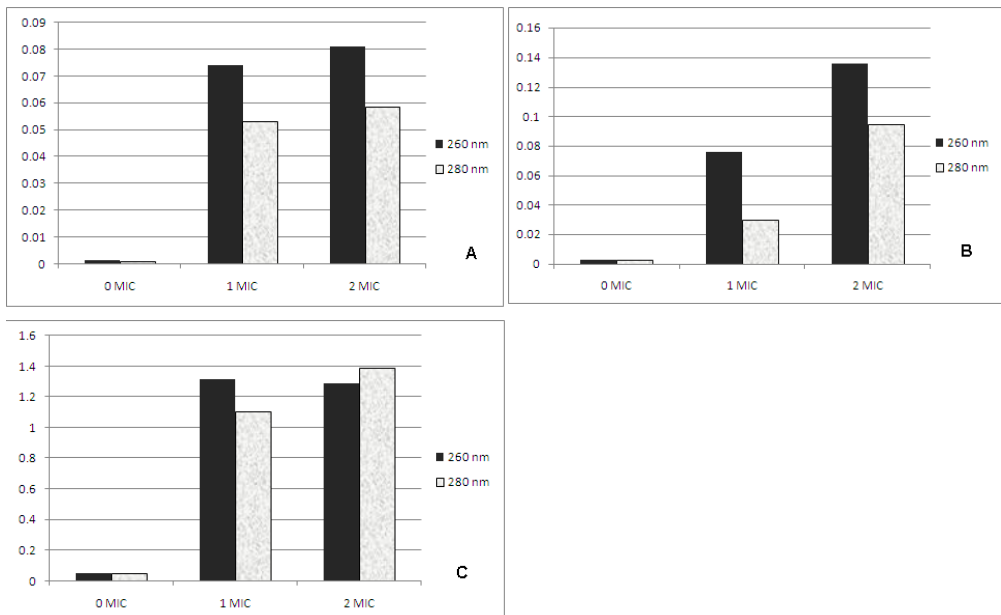
Dari 60 isolat yang di *screening*, 10 % diantaranya memiliki aktivitas antibiotik, baik yang bersifat *arrow spectrum* (spesifik menghambat satu jenis mikroba tertentu saja) maupun *broad spectrum* (menghambat beberapa jenis mikroba). Dari hasil konstruksi pohon filogenetik berdasarkan parsial 16 S rDNA, terlihat bahwa semua isolat masuk dalam genus *Streptomyces*. Dari

enam isolat, isolat MG 500.1.1 memiliki kedekatan dengan *Streptomyces hygrosopicus* (99% homologi) dan isolat MG 500.1.4 dekat dengan *Streptomyces resistomycificus* (99% homologi). Empat isolat lainnya secara filogenetik terpisah dari kerabat terdekatnya, sehingga memiliki kemungkinan jenis baru.

Tabel 3. Penentuan nilai MIC ekstrak uji terhadap bakteri dan fungi dibandingkan dengan kontrol antibiotik komersial

No	Mikroba Uji	Ekstrak (µg/ ml)		Antibiotik komersil sebagai pembanding (µg/ ml)			
		MG 500 1.1	MG 1250 1.2	Chloramphenicol	Eritromycin	Nistatin	Kabicidin
<i>Escherichia coli</i>							
1	NBRC 14237	2	na	16	32	na	na
<i>M. luteus</i>							
2	NBRC 1367	128	na	16	16	na	na
<i>S. aureus</i>							
3	NBRC 13276	128	na	16	0.06	na	na
<i>Bacillus subtilis</i>							
4	NBRC 3134	128	na	8	0.03	na	na
<i>Candida albicans</i>							
5	NBRC 1594	Na	na	na	na	32	32
<i>S. cerevisiae</i>							
6	NBRC 10217	16	na	na	na	64	64
7	<i>Aspergillus niger</i>	Na	16	na	na	16	64

Keterangan : na = tidak aktif



Gambar 5. Analisis kebocoran sel. A : ekstrak MG 500.1.1 terhadap sel *E. coli*; B : ekstrak MG 500.1.1 terhadap *S. cerevisiae* dan C : ekstrak MG 1250.1.2 terhadap *A. niger*.

Tabel 4. Registrasi nomor penyimpanan kultur pada LIPIMC

No	Nomor kode isolat	Nomor isolat di LIPIMC
1	MG 500.1.1	LIPIMC 368
2	MG 500.1.4	LIPIMC 369
3	MG 500.1.6	LIPIMC 370
4	MG 1250.1.2	LIPIMC 371
5	A 1.6	LIPIMC 372
6	MG 10.1.5.8	LIPIMC 373

Diketahui bahwa *Streptomyces* merupakan genus dari aktinomisetes yang paling banyak memproduksi antibiotik dan molekul bioaktif di bandingkan dengan genus lain dari aktinomisetes (Solanki *et al.* 2008; Khamma *et al.* 2008; Goodfellow & Simpson 1987), bahkan juga lebih tinggi dibandingkan dengan mikroba lain seperti jamur dan yeast. Isolat yang memiliki kemampuan antibiotik dari hasil screening, dilakukan seleksi lebih lanjut untuk mendapatkan isolat unggul. Dari 6 isolat aktif, dipilih dua isolat untuk di analisis lebih lanjut. Dua isolat tersebut adalah *Streptomyces* MG 500.1.1 dan *Streptomyces* MG 1250.1.2. Pemilihan isolat tersebut didasarkan pada kemampuan antibiotiknya yang paling tinggi dan sifat khas antibiotiknya yang kebetulan berlawanan. *Streptomyces* MG 500.1.1 bersifat *broad spectrum* sedangkan *Streptomyces* MG 1250.1.2 lebih bersifat *arrow spectrum*.

Uji lanjut MIC dilakukan untuk mengetahui dosis minimum dari metabolit yang diproduksi oleh kedua isolat terpilih dalam menghambat beberapa jenis mikroba. Hasilnya menunjukkan nilai MIC yang bervariasi terhadap mikroba uji. Senyawa metabolit yang diproduksi

oleh *Streptomyces* MG 500.1.1 menghambat semua mikroba uji kecuali *C. albicans* dan *A. niger*. Nilai MIC untuk menghambat *E. coli* (2 µg/mL) jauh lebih rendah dibandingkan dengan antibiotik komersial chloramphenicol dan erytromicin. MIC untuk menghambat yeast *S. Cerevisiae* (16 µg/mL) juga lebih rendah dibandingkan dengan antibiotik komersial kabicidin dan nystatin. Walaupun demikian, nilai MIC terhadap mikroba lain lebih tinggi dibandingkan dengan antibiotik komersial. Nilai MIC dari *Streptomyces* MG 1250.1.2 terhadap *A. niger* sama dengan nistatin, dan lebih rendah dibandingkan dengan kabicidin.

Nilai MIC yang lebih rendah menunjukkan kemampuan antibiotik yang tinggi. Makin rendah MIC, makin bagus aktivitas antibiotiknya. Dari hasil yang telah diperoleh, menunjukkan hasil yang positif, dimana kedua ekstrak memiliki aktivitas antibiotik yang lebih tinggi dibandingkan dengan antibiotik komersial yang telah lama digunakan untuk obat saat ini, walaupun masih dalam bentuk ekstrak campuran.

Data kebocoran dinding sel menunjukkan adanya kerusakan sel oleh pengaruh pemberian ekstrak. Kerusakan

yang terjadi berupa rusaknya dinding dan membran sel yang diikuti dengan keluarnya material seluler ke medium antara lain protein dan asam nukleat yang diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Hampir semua antibiotik bekerja dengan merusak membran sitoplasma. Karena ekstrak yang digunakan bersifat hidrofobik, maka mekanisme awal adalah penempelan senyawa ekstrak dengan fosfolipid dan lipoprotein pada membran bagian luar. Ekstrak juga kemungkinan berikatan dengan peptidoglikan yang bersifat hidrofobik, yang mengganggu permeabilitas membran. Dengan terganggunya permeabilitas membran sel, maka ekstrak akan masuk ke dalam sitosol sel dan mengganggu proses metabolisme sel secara keseluruhan. Menurut Sikkema *et al* dan Ultee *et al.* 2002 dalam Miksusanti *et al.* (2008), adanya akumulasi ekstrak dalam sitoplasma akan menyebabkan membran mengalami pembengkakan, perubahan permeabilitas dan fluiditas. Akibatnya potensial membran menurun, kerja enzim dalam proses metabolisme menurun yang pada akhirnya menyebabkan terlepasnya material sel ke luar, yang terdeteksi dengan tingginya protein dan asam nukleat. Secara umum pemberian perlakuan 2 MIC menimbulkan kerusakan yang lebih berat dibandingkan dengan dosis 1 MIC.

KESIMPULAN

Aktinomisetes yang diisolasi dari sampel tanah berbagai tipe substrat dan habitat asal ternate memiliki kelimpahan yang cukup tinggi. Tidak ditemukan

adanya pola kelimpahan aktinomisetes yang dibatasi oleh ketinggian. Berdasarkan analisis 16S rDNA, semua isolat yang memiliki aktivitas antibiotik masuk dalam genus *Streptomyces*. Diperoleh dua strain aktinomisetes *Streptomyces* MG 500.1.1 dan *Streptomyces* MG 1250.1.2 yang senyawa metabolitnya memiliki aktivitas antibiotik yang sangat kuat, bahkan lebih kuat dari antibiotik komersial. Metabolit dari *Streptomyces* MG 500.1.1 lebih kuat melawan *E. coli* dan *S. cerevisiae*, sedangkan *Streptomyces* MG 1250.1.2 pada *A.niger*. Aktivitas antibiotik ditandai dengan kebocoran sel dan terlepasnya material organik (protein dan asam nukleat). Untuk selanjutnya Perlu dilakukan isolasi, elusidasi dan karakterisasi metabolit dari kedua strain yang memiliki aktivitas antibiotik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh proyek IPTEKDA LIPI 2009. Terimakasih penulis sampaikan kepada Prof. Dr. Ibnu Maryanto sebagai koordinator proyek, Walikota Ternate, semua tim ekspedisi Ternate 2009, Dian Alfian dan semua pihak yang membantu penelitian kami.

DAFTAR PUSTAKA

Debananda, S. Ningthoujam, S. Sanasam & S. Nimaichand.2009. Screening of Actinomycete Isolates from Niche Habitats in Manipur for Antibiotic Activity. *American J.l Biochem. Biotech.* 5 (4): 221-225.

- Goodfellow, M. and KE. Simpson. 1987. Ecology of Streptomyces. *App Microbial.* 2 : 97 – 125.
- Hamdali, H., B. Bouizgarne, M. Haûdi , A. Lebrihi, M. Virolle and Y. Ouhdouch. 2008. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomyce from Moroccan phosphate mines. *App. Soil Ecol.* 38 : 12 – 19.
- Hayakawa, M. & T. Nanomura. 1987. Humic Acid Vitamin Agar, and a New Medium for the Selective Isolation of Soil Actinomycetes. *J. Ferment technology* 65: 501 – 509.
- Hayakawa, M., Y. Yoshida & Y. Iimura. 2004. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the Streptomyces violaceusniger phenotypic cluster. *J. Appl. Microbiol.* 96 : 973–981.
- Hopwood, DA., 2007. *Streptomyces in Nature and Medicine*. Oxford University Press. New York.
- Khamma, S., A. Yokota, & S. Lumyong. 2008. Actinomycetes isolated from medical Plant rhizosphere soil : diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid sidorephore production. *World J. Microbiol Biotechnol.* 10.1007.
- Lee, YJ. & BK. Hwang. 2002. Diversity of Antifungal Actinomycetes in Varios Vegetative soils of Korea. *J. Microbiol* 48: 407- 417. NRC Research Press.
- Miksusanti, BSK. Jennie, B. Ponco & G. Trimulyadi. 2008. Cell wall Disruption of *Escherchia coli* K1.1 by Temu Kunnci (*Kaempferia pandurata*) Essential Oil. *Berita Biologi.* 9 (1) : 1 – 8.
- Nolan, R.&T. Cross. 1988. *Isolation and screening of actinomycetes.* dalam: Goodfellow, M., Williams S.T., Mordarski M, editors. *Actinomycetes in biotechnology.* London: Academic Press. Hlm. 1 – 32.
- Nurkanto, A, M. Rahmansyah & A. Kanti. 2008. *Teknik Isolasi Aktinomisetes.* LIPI Press. Jakarta.
- Okazaki, T. & A. Naito. 1986. *Studies on actinomycetes isolating from Australian soil.* dalam: Szabo, G., S. Biro, M. Goodfellow, editors. *Biological biochemical and biomedical asp.ects of actinomycetes.* Budapest: Akademiai Kiado. Hlm. 739 – 41.
- Pitcher, DG., NA. Saunders and RJ. Owen. 1989. Rapid extraxtion of bacterial genomic DNA with Guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol.* 8 : 108 – 114.
- Rahman, A, MI Choudhary and WJ. Thomsen. 2005. *Bioassay Techniques for Drug Development.* Hardwood Academic Publishers. London.
- Saadoun, I. & R. Gharaibeh. 2003. The Streptomyces flora of Badia region of Jordan and its potential as a source of antibiotic-resistant bacteria. *J. Arid Environ* 53: 365 – 371.
- Schwalbe, R, L. Stele-Moore & AC. Goodwin. 2007. *Antimicrobial*

- Susceptibility Testing Protocols.*
CRC Press. New York.
- Sette, LD., VM. de Oliveira & GP. Manûo. 2005. Isolation and characterization of alachlor-degrading actinomycetes from soil.
- Antonie van Leeuwenhoek.* 87 : 81 -89.
- Solanki,R, M. Khanna & R. Lal. 2008. Bioactive Compounds from Marine Actinomycetes. *Indian J. Microbial.* 48 : 410 – 431.

Memasukkan: September 2009

Diterima: April 2010