

**Identifikasi Molekular dan Karakterisasi Morfo-Fisiologi Actinomycetes Penghasil Senyawa Antimikroba
(Molecular Identification and Morpho-Physiological Characterization of Actinomycetes with Antimicrobial Properties)**

Arif Nurkanto & Andria Agusta

Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Jl. Jakarta Bogor KM 46, Cibinong, Bogor 16911

Email : arif.nurkanto@lipi.go.id

Memasukkan: November 2014, Diterima: Maret 2015

ABSTRACT

The objectives of study were to identify antimicrobial producing Actinomycetes using 16S rDNA analyses and morphology and physiology characteristics. Eight Actinomycetes strain with the highest antibacterial and antifungal activity were selected and identified using six primers (20F, 520F, 920F, 1500R, 920R, and 520R). Morphological observation and physiology analyses were performed to the selected strain to accurately identify the strains. Morphological characters observed were aerial mycelium, spore chain, colony form, and pigment production. Physiological characterizations were antimicrobial properties, growth temperature, pH tolerance, salinity concentration for growth, sugars assimilation, and some enzymes production (arginine dihydrolase, urease, β -glucosidase, protease, β -galactosidase). Based on homology search by BLAST program and phylogenetic tree analyses, all of isolates were identified as the genus *Streptomyces*. They belong to eight different species. Isolates RC-SS-37-4, RC-SS-37-16 and BL-22-3 have been identified as *Streptomyces costaricanus* (100 %), *Streptomyces costaricanus* (99.8 %) and *Streptomyces parvulus* (98.6 %), respectively. Five isolates were identified as *Streptomyces* spp. (BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, BL-22-1 and BL-06-5) and can be presumed as new species because of the low homology value to their closest related species.

Keywords : actinomycetes, antimicrobial, morphology, phylogenetic, physiology, 16S rRNA gene.

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah untuk mengidentifikasi isolat actinomycetes dengan kemampuan antimikroba menggunakan analisis 16S rDNA dan mengkarakterisasinya secara morfologi dan fisiologi. Sebanyak delapan isolat dengan aktivitas antibakteri dan antifungi tertinggi telah diidentifikasi menggunakan 6 primer (20F, 520F, 920F, 1500R, 920R, and 520R). Karakter morfologi dan fisiologi juga diamati dalam penelitian ini. Karakter morfologi diamati berdasarkan parameter kunci berupa miselium aerial, bentuk rantai spora, koloni dan produksi pigmen. Karakter fisiologi berupa aktivitas antimikroba, suhu pertumbuhan, toleransi keasaman (pH), konsentrasi salinitas, asimilasi gula dan produksi enzim khusus (arginin dihidrolase, urease, β -glukosidase, protease dan β -galaktosidase). Berdasarkan persamaan homologi melalui metode BLAST dan analisis pohon filogenetik, semua isolat teridentifikasi sebagai *Streptomyces*. Isolat tersebut teridentifikasi menjadi tujuh jenis. Isolat RC-SS-37-4, RC-SS-37-16 dan BL-22-3 berturut-turut teridentifikasi sebagai *Streptomyces costaricanus* (100 %), *Streptomyces costaricanus* (99.8 %) dan *Streptomyces parvulus* (98.6 %). Lima isolat teridentifikasi sebagai *Streptomyces* spp. (BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, BL-22-1 dan BL-06-5) dan merupakan kandidat jenis baru karena memiliki nilai homologi yang rendah terhadap jenis terdekatnya.

Kata Kunci : actinomycetes, antimikroba, fisiologi, filogenetik, gen 16S rRNA, morfologi.

PENDAHULUAN

Actinomycetes merupakan kelompok bakteri Gram positif dan terdistribusi luas di alam. Actinomycetes dikenal sebagai mikroorganisme saprofitik pada tanah dan seresah (Takisawa *et al.* 1993). Secara umum, actinomycetes dibedakan menjadi dua kelompok. Kelompok tersebut adalah *Streptomyces* dan *rare-actinomycetes* (Kurtboke 2001). *Rare-actinomycetes* digunakan sebagai istilah untuk menyebut genus selain *Streptomyces*. *Rare-*

actinomycetes terdiri dari 201 genus, relatif lebih sulit diisolasi, dan pertumbuhan yang lebih lambat dibandingkan dengan *Streptomyces* (Miyadoh 1997).

Kelas *Actinobacteria* memiliki 6 ordo, 46 famili, dan 202 genus. Jumlah spesies yang telah ditemukan sebanyak 2.335. Jumlah actinomycetes masih terus bertambah seiring dengan banyak penemuan taksa baru yang didorong oleh penelitian yang intensif. *Streptomyces* merupakan genus terbesar dengan jumlah spesies lebih dari 500. Selain

Streptomyces, genera dominan yang juga banyak ditemukan di antaranya *Nocardia*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, dan *Actinoplanes* (Madigan *et al.* 2003, Goodfellow *et al.* 2011).

Identifikasi molekuler terhadap actinomycetes dapat dilakukan dengan berbagai pendekatan. Identifikasi gen-gen tertentu yang menjadi penanda suatu tingkat takson dalam actinomycetes telah banyak dikembangkan. Sebagai contoh identifikasi *small sub unit* (SSU) DNA, *large sub unit* (LSU) DNA, dan *multilocus gene*. Analisis gen 16S rRNA dalam SSU merupakan metode identifikasi actinomycetes yang paling sering digunakan (Embley & Stackebrandt 1994).

Identifikasi gen 16S rRNA didasarkan pada banyak faktor. Gen 16S rRNA bersifat *multi copy* karena terdapat sekitar 150-300 *copy* di dalam genom. Hal tersebut mempermudah untuk mendapatkannya dalam genom. Dalam gen 16S rRNA terdapat daerah variabel dan konservatif yang dapat dijadikan pembeda antar spesies. Secara umum, gen 16S rRNA adalah gen non fungsional dan bersifat lebih konservatif karena evolusi berjalan lambat (Avisé 1994; Palys *et al.* 1997). *Database* tentang bakteri berdasarkan identifikasi 16S rRNA sudah banyak sehingga memudahkan dalam perbandingan. Perpindahan gen 16S rRNA secara horizontal tidak dapat terjadi sehingga dapat dijadikan penanda spesies. Gen 16S rRNA bersifat universal pada bakteri (Koonin 2003; Santos & Ochman 2004).

Identifikasi actinomycetes data sekuen 16S rDNA relatif kompleks. Spesies actinomycetes yang sama umumnya memiliki homologi *sequence* gen 16S rDNA di atas 98 %. Nilai homologi 98 % atau kurang mengindikasikan spesies yang berbeda (Jauh-Hsun *et al.* 2002; Patel *et al.* 2004). Walaupun demikian, dalam beberapa kasus actinomycetes dapat dikelompokkan menjadi spesies baru walaupun homologi 16S rDNA di atas 99 %. Hal tersebut terjadi jika nilai homologi hibridisasi DNA-DNA rendah, atau kurang dari 70 % (Jauh-Hsun *et al.* 2002; Patel *et al.* 2004).

Karakterisasi morfologi dan fisiologi juga merupakan faktor penting. Adanya data morfologi dan fisiologi dalam tahap identifikasi actinomycetes dapat digunakan untuk mendiskripsikan isolat-isolat

yang sudah diidentifikasi secara molekuler. Dalam beberapa kasus, sering dijumpai kemiripan jenis dalam actinomycetes secara molekuler, namun berbeda secara morfologi dan fisiologi. Hal tersebut dapat terjadi jika identifikasi molekuler yang dilakukan hanya terhadap satu atau beberapa gen penanda saja (Madigan *et al.* 2003). Adanya data morfologi, fisiologi, dan molekuler akan memberikan hasil yang akurat tentang identitas actinomycetes. Karakterisasi tersebut dapat berupa kemampuan asimilasi berbagai jenis gula, toleransi suhu pertumbuhan, toleransi salinitas dan derajat keasaman (pH), produksi beberapa enzim tertentu, observasi morfologi miselium dan spora, serta produksi senyawa tertentu. Perbedaan karakter morfologi, fisiologi, dan biokimia antar isolat actinomycetes, dapat menjadi kunci dalam deskripsi spesies, selain informasi data molekuler.

Penelitian bertujuan untuk menemukan identitas isolat-isolat actinomycetes yang memiliki aktivitas antimikroba. Actinomycetes yang diidentifikasi merupakan hasil seleksi dari seratus isolat actinomycetes dengan aktivitas antimikroba tertinggi berdasarkan penapisan yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya. Analisis filogenetik berdasarkan data molekuler juga dilakukan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar isolat yang diidentifikasi maupun isolat actinomycetes lain. Analisis filogenetik yang dilakukan sangat membantu dalam menemukan jenis actinomycetes lain yang memiliki kekerabatan dekat dengan isolat yang sedang diidentifikasi. Karakterisasi morfologi dan fisiologi terhadap isolat tersebut juga dilakukan dalam penelitian ini untuk melengkapi data molekuler yang diperoleh dan digunakan sebagai dasar deskripsi isolat-isolat yang sudah teridentifikasi.

BAHAN DAN CARA KERJA

Mikroba yang digunakan adalah isolat actinomycetes yang memiliki aktivitas antimikroba berdasarkan hasil penapisan yang telah dilakukan. Isolat tersebut adalah BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, RC-SS-37-4, RC-SS-37-16, BL-22-1, BL-06-5 dan BL-22-3. Isolat tersebut ditumbuhkan pada medium yeast starch agar (YSA), *Internasional standard Streptomyces 2* (ISP2).

DNA diekstraksi menggunakan metode Guanidin EDTA Sarkosil (GES) (Pitcher *et al.* 1989). Gen 16S rRNA diamplifikasi dengan menggunakan primer universal untuk bakteri sesuai yang dilakukan Suriyachadkun *et al.* (2010), yaitu 20F (5'-GATTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1500R (5-GTTACCTTGTTACGACTT-3'). Proses *cycle sequencing* dengan menggunakan Kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) dan primer 20 F, 520 F (5'-GTGCCAGCAGCCGCGG-3', 920 F (5'-AAACTCAAATGAATTGACGG-3'), 520 R (5'-ACCGCGGCTGCTGGC-3'), 920 R (5'-CCGTC AATTCATTTGAGTTT-3') dan 1500 R (Yukphan *et al.* 2004; Nurkanto *et al.* 2010). Produk PCR kemudian dianalisis dengan mesin *Automated DNA sequencer* (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer; Applied Biosystems). Analisis DNA menggunakan program BioEdit dan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada *database* Bank gen National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Hall 1999) dan Ribosomal Database Project (RDP). Data NCBI BLAST tersedia pada laman <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, sedangkan RDP pada laman <http://www.rdp.cme.msu.edu>.

Analisis filogenetik menggunakan program Clustal X versi 1.83 (Thompson *et al.* 1997). Konstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak kekerabatan genetik dengan metode *Neighbor joining* (Saitou & Nei 1987). Konstruksi jarak evolusi dalam derajat kepercayaan menggunakan *bootstrap value* pada program NJ plot dengan 1.000 replikasi *bootstrap* berdasarkan Felsenstein (1985). Spesies pembanding yang digunakan adalah spesies *type*. Data sekuen spesies *type* tersebut diperoleh dari RDP.

Uji antimikroba dilakukan terhadap bakteri (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. luteus*) dan jamur (*C. albicans* dan *S. cereviceae*). Analisis antimikroba dengan menggunakan metode difusi agar (Reller *et al.* 2009; Jorgensen 1999; Baur *et al.* 1996).

Karakterisasi dilakukan terhadap delapan isolat terseleksi yang telah di sekuensing. Karakterisasi yang dilakukan berupa pengamatan morfologi dan fisiologi. Karakterisasi morfologi dilakukan dengan mengamati ada tidaknya miselium *aerial*, bentuk spora, warna koloni, warna miselium, dan produksi pigmen, yang ditumbuhkan pada medium yang berbeda (YSA dan ISP2).

Karakterisasi fisiologi dilakukan dengan mengamati suhu pertumbuhan, toleransi salinitas, toleransi pH, kemampuan asimilasi berbagai sumber karbon dan kemampuan memproduksi enzim tertentu. Masing-masing isolat actinomycetes ditumbuhkan pada medium ISP2 agar kemudian diinkubasi pada suhu 4, 10, 20, 27, 37 dan 45 °C. setelah 14 hari inkubasi, pertumbuhan diamati untuk mendapatkan data toleransi suhu pertumbuhan. Toleransi salinitas juga dilakukan dengan pengamatan pertumbuhan isolat pada medium ISP2 agar dengan penambahan variasi konsentrasi NaCl 0, 1, 3, 5 dan 10% (w/v). metode yang serupa juga dilakukan untuk memperoleh data toleransi pH, isolat ditumbuhkan pada medium ISP2 dengan variasi pH (3, 5, 7, 9, 11 dan 13) dan diinkubasi pada suhu 28 °C. Kemampuan asimilasi karbon dan produksi enzim tertentu dilakukan dengan menggunakan *Api*[®] kit (Biomerieux) dengan metode sesuai dengan instruksi dari penyedia kit.

HASIL

Sebanyak delapan isolat dengan aktivitas antimikroba telah diseleksi untuk identifikasi. Gambar isolat terseleksi tersebut tersaji pada Gambar 1. DNA delapan isolat telah teramplifikasi seperti ditunjukkan pada Gambar 2. Berdasarkan marker 1 kilobasa (1 kb) yang telah digunakan, terlihat bahwa semua DNA yang teramplifikasi memiliki panjang sekitar 1500 pasang basa (1500 bp). Hal tersebut sesuai dengan target identifikasi gen 16S rRNA, yaitu nukleotida dengan panjang sekitar 1500 bp.

Hasil sekuensing yang telah dilakukan menggunakan enam jenis primer diperoleh panjang nukleotida yang berbeda untuk tiap primer yang digunakan. Panjang nukleotida untuk tiap primer berkisar antara 325 – 975. Nukleotida yang diperoleh untuk tiap primer telah disambung (*contiq*) untuk mendapatkan urutan hasil sekuen penuh dari gen 16S rRNA. Kalkulasi hasil sekuensing seperti pada Tabel 1.

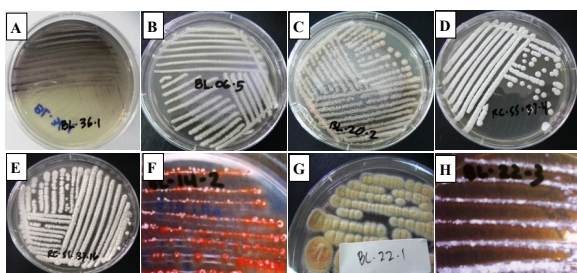
Hasil *contiq* yang telah dilakukan, diperoleh urutan nukleotida dari delapan isolat actinomycetes. Panjang nukleotida tersebut berkisar 1400 bp. Identitas isolat actinomycetes telah diperoleh melalui BLAST berdasarkan urutan basa tersebut. Hasil identifikasi molekuler isolat actinomycetes adalah seperti pada Tabel 2.

Konstruksi pohon filogenetik

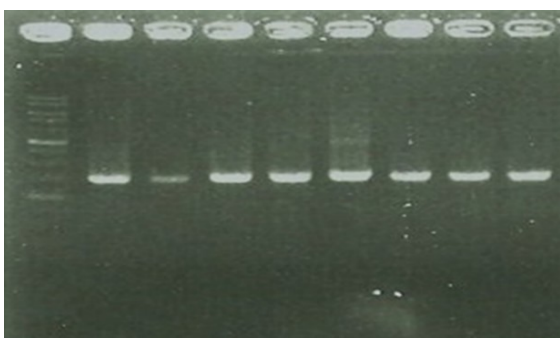
Konstruksi pohon filogenetik yang menggambarkan hubungan kekerabatan antar spesies dapat dilakukan untuk mempermudah analisis hasil identifikasi. Konstruksi pohon filogenetik dalam penelitian ini digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan secara kladistik antar isolat actinomycetes terseleksi. Hubungan tersebut ditunjukkan pada Gambar 3.

Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat Actinomycetes

Pengamatan yang telah dilakukan dengan membandingkan karakter antar isolat. Karakter yang diambil dalam penelitian ini adalah aktivitas antimikroba (Tabel 3), bentuk rantai spora, warna koloni, warna pigmen (Tabel 4), toleransi suhu pertumbuhan, salinitas dan derajat keasaman (pH), kemampuan asimilasi gula dan produksi enzim tertentu (Tabel 5).



Gambar 1. Bentuk koloni isolat actinomycetes terseleksi aktivitas antimikroba tertinggi, dimana A : isolat BL-36-1; B : isolat BL-06-5; C : isolat BL-20-2; D : isolat RC-SS-37-4; E : isolat RC-SS-37-16; F : isolat BL-14-2; G : isolat BL-22-1; dan H : isolat BL-22-3.



Gambar 2. Hasil elektroforesis produk PCR gen 16S rRNA dari delapan isolat actinomycetes. dari kiri ke kanan : marker 1 kb, BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, RC-SS-37-4, RC-SS-37-16, BL-22-1, BL-06-5, BL-22-3 dan BL-22-5.

PEMBAHASAN

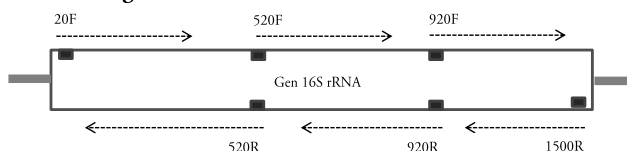
Berdasarkan hasil identifikasi gen 16S rRNA, delapan isolat actinomycetes masuk dalam genus *Streptomyces*. Sebanyak lima isolat memiliki persentase homologi terhadap strain *type* terdekatnya dengan nilai kurang dari 98 %. Isolat tersebut adalah BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, BL-22-1, dan BL-06-5. Menurut Jauh-Hsun *et al.* (2002) dan Patel *et al.* (2004), nilai homologi 98 % atau kurang mengindikasikan spesies yang berbeda atau dapat dipertimbangkan sebagai spesies baru. Walaupun demikian, dalam beberapa kasus, actinomycetes dapat dikelompokkan menjadi spesies baru walaupun homologi 16S rDNA di atas 98 %. Hal tersebut terjadi jika nilai homologi hibridisasi DNA-DNA rendah, atau kurang dari 70 % (Jauh-Hsun *et al.* 2002; Patel *et al.* 2004).

Analisis filogenetik pada Gambar 2 menunjukkan bahwa delapan isolat actinomycetes terpisah menjadi tujuh kelompok. Isolat RC-SS-37-16 dan RC-SS-37-4 berada dalam satu cabang dengan spesies terdekatnya, *Streptomyces costaricanus* (T); NBRC 100773; AB249939. Isolat BL-22-3 berkerabat dekat dengan *Streptomyces parvulus* (T); NBRC 13193; AB184326. Isolat BL-36-1, BL-20-2, dan BL-22-1 secara filogenetik terpisah dengan spesies

Tabel 1. Kalkulasi panjang nukleotida hasil sekuensing gen 16S rRNA terhadap delapan isolat actinomycetes dengan menggunakan enam primer yang berbeda

Kode Isolat	Panjang nukleotida hasil sekuensing berdasarkan primer					
	20 F	520F	920F	520R	920R	1500R
BL-36-1	491	540	498	411	551	498
BL-20-2	492	490	465	410	462	476
BL-14-2	497	491	467	426	485	477
RC-SS-37-4	453	524	501	398	485	524
RC-SS-37-16	497	485	469	405	526	486
BL-22-1	325	353	333	673	384	369
BL-06-5	441	519	485	426	410	490
BL-22-3	462	508	462	382	454	487
BL-22-5	640	975	564	617	864	420

Keterangan:



terdekatnya. Hasil analisis filogenetik menunjukkan hasil yang hampir sama dengan homologi sekuen DNA dimana lima isolat (BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, BL-22-1, dan BL-06-5) merupakan kandidat jenis baru berdasarkan *full sequence* gen 16S rRNA

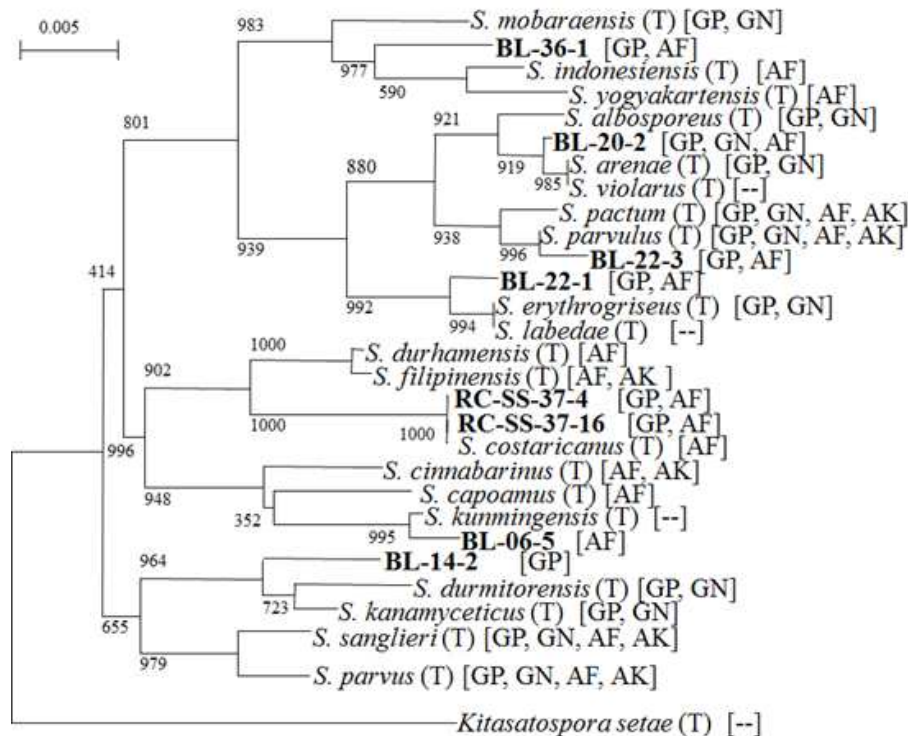
Gambar 3 menunjukkan hampir semua spesies terdekat dari actinomycetes yang diidentifikasi memiliki aktivitas antimikroba. Hal tersebut menunjukkan bahwa studi filogenetik yang telah dilakukan tidak hanya berperan dalam mengetahui hubungan kekerabatan terhadap spesies

lain maupun perubahan evolusi dari nenek moyang bersama secara genetik. Pengelompokan aktivitas biologi juga dapat diketahui melalui analisis filogenetik. Hal tersebut berarti analisis filogenetik dapat dimanfaatkan untuk studi pencarian senyawa obat yang bersumber dari mikroba.

Berdasarkan hasil observasi karakter morfologi dan fisiologi seperti pada Tabel 3-5, diketahui bahwa delapan isolat terpilih memiliki karakter yang berbeda. Semua isolat memiliki kemampuan memproduksi metabolit yang bersifat sebagai antimikroba, namun selektif terhadap jenis mikroba

Tabel 2. Hasil identifikasi gen 16 S rRNA isolat actinomycetes yang memiliki kemampuan antimikroba tertinggi.

Kode isolat	Jumlah nukleotida	Spesies identik	Persentase homologi
BL-36-1	1328	<i>Streptomyces mobaraensis</i> (T); NRRL B-3729T; DQ442528	95.2
BL-20-2	1454	<i>Streptomyces violarus</i> (T); NBRC 13104; AB184316	97.4
BL-14-2	1409	<i>Streptomyces kanamyceticus</i> (T); NRRL B-2535T; DQ442511	93.9
RC-SS-37-4	1404	<i>Streptomyces costaricanus</i> (T); NBRC 100773; AB249939	100
RC-SS-37-16	1453	<i>Streptomyces costaricanus</i> (T); NBRC 100773; AB249939	99.8
BL-22-1	1448	<i>Streptomyces labedae</i> (T); NBRC 15864; AB184704	94.6
BL-06-5	1515	<i>Streptomyces kunmingensis</i> (T); NRRL B-16240T; DQ442513	96.2
BL-22-3	1470	<i>Streptomyces parvulus</i> (T); NBRC 13193; AB184326	98.6



Gambar 3. Pohon filogenetik delapan isolat actinomycetes yang diidentifikasi berdasarkan *full sequence* gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi *bootstrap*, Dimana GP = anti bakteri gram positif, GN = antibakteri gram negatif, AF = antifungi, AK = antikanker, dan [--] = tidak memiliki aktivitas antimikroba.

Tabel 3. Aktivitas antimikroba isolat actinomycetes setelah 7 hari inkubasi pada medium cair ISP2.

Antimikroba	Isolat							
	B-36-1	BL-20-2	BL-14-2	RC-SS-37-4	RC-SS-37-16	BL-22-1	BL-06-5	BL-22-3
<i>E.coli</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>B.subtilis</i>	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>S. aureus</i>	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>M. luteus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>C.albicans</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. cereviceae</i>	+	+	-	+	+	+	+	+

Tabel 4. Karakterisasi morfologi actinomycetes terseleksi

Parameter Pengamatan	Isolat								
	B-36-1	BL-20-2	BL-14-2	RC-SS-37-4	RC-SS-37-16	BL-22-1	BL-06-5	BL-22-3	
Aerial mycelium	+	+	+	+	+	+	+	+	
Bentuk rantai spora									
<i>Rectiflexibles</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	
<i>Spirales</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	
<i>Verticillate</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	
<i>Retinaculiaperti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	
Warna koloni, miselium dan pigmen pada medium YSA									
Warna koloni	abu-abu	merah	merah	abu-abu	abu-abu	kuning	Putih	abu-abu	
Produksi pigmen ke media	-	-	-	kuning	kuning	-	coklat	kuning	
Koloni bawah	abu-abu	oranye	merah	hitam	hitam	kuning	abu-abu	abu-abu	
Warna koloni, miselium dan pigmen pada medium ISP2									
Warna koloni	abu-abu	coklat	merah	putih	putih	kuning	coklat	putih	
Produksi pigmen ke media	abu-abu	-	-	kuning	kuning	-	coklat	-	
Koloni bawah	abu-abu	coklat	merah	kuning	kuning	kuning	coklat	putih	

tertentu, seperti isolat BL-14-2 hanya memiliki aktivitas antibakteri dan satu isolat BL-06-5 hanya memiliki aktivitas antifungi. Enam isolat yang lain memiliki aktivitas antibakteri dan antifungi. Semua isolat memiliki *aerial* miselium tetapi memiliki bentuk rantai spora yang berbeda, yang dikategorikan menjadi empat bentuk. Hal yang unik adalah bahwa dalam satu isolat dapat memiliki warna koloni, miselium, dan produksi pigmen yang tidak selalu sama ketika ditumbuhkan pada medium yang berbeda (ISP-2 dan YSA). Hal tersebut menunjukkan bahwa perbedaan komposisi medium dapat mempengaruhi sebagian karakter morfologi dari actinomycetes. Semua isolat memiliki toleransi suhu dan pH pertumbuhan yang sama, yaitu 20-37 °C dan 7-9. Toleransi salinitas bervariasi, namun tidak lebih dari 3 %. Kemampuan asimilasi gula menunjukkan profil yang berbeda untuk setiap isolat, tidak ada isolat yang memiliki kemampuan menggunakan jenis

gula yang sama persis. Uji produksi enzim menunjukkan hasil yang positif, kecuali pada kemampuan pengasaman glukosa, semua tidak aktif kecuali isolat BL-06-5.

Berdasarkan analisis filogenetik dan hasil identifikasi, isolat RC-SS-37-4 dan RC-SS-37-16 merupakan spesies yang sama. Kedua isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Streptomyces costaricanus*. Analisis *alignment* menggunakan program Clustal X 2.0.11 dan *BLAST 2 sequences* pada *NCBI gene bank* menunjukkan tidak terdapat perbedaan nukleotida antara kedua isolat dengan homologi sebesar 100 %. Data karakterisasi antara kedua isolat tersebut hampir sama. Walaupun demikian, terdapat sedikit perbedaan dari karakterisasi fisiologi, dimana isolat RC-SS-37-16 dapat menghambat *B. subtilis* sedangkan RC-SS-37-4 tidak dapat. Isolat RC-SS-37-4 mampu mengasimilasi adipat, malat, dan fenil asetat, sedangkan isolat

Tabel 5. Karakterisasi fisiologi actinomycetes terseleksi

Parameter pengamatan	Isolat							
	B-36-1	BL-20-2	BL-14-2	RC-SS-37-4	RC-SS-37-1	BL-22-1	BL-06-5	BL-22-3
Suhu pertumbuhan								
4 °C	-	-	-	-	-	-	-	-
10 °C	-	-	-	-	-	-	-	-
20 °C	+	+	+	+	+	+	+	+
27 °C	+	+	+	+	+	+	+	+
37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C	-	-	-	-	-	-	-	-
Toleransi salinitas								
0%	+	+	+	+	+	+	+	+
1%	+	+	+	+	+	+	+	+
3%	-	-	-	+	+	-	-	+
5%	-	-	-	-	-	-	-	-
10%	-	-	-	-	-	-	-	-
Toleransi pH								
3	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-
Asimilasi gula								
Glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinosa	-	+	-	-	-	-	+	+
Mannosa	-	-	-	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	-	+	+
N-acetyl glukosamin	+	-	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	-	+	+	+	+	+	+
Glukonat	+	-	+	+	+	+	+	+
Kapatrat	-	+	+	-	-	+	-	+
Adipat	-	-	+	+	-	+	-	+
Malat	-	-	+	+	-	+	+	+
Sitrat	-	-	+	-	-	+	-	+
Fenil-asetat	-	-	-	+	-	-	-	-
Produksi enzim								
Pengasaman glukosa	-	-	-	-	-	-	+	-
Arginin dihidrolase	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+
β-glukosidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Protease	+	+	+	+	+	+	+	+
β-galaktosidase	+	+	+	+	+	+	+	+

RC-SS-37-16 tidak mampu mengasimilasi gula tersebut. Sedikit perbedaan karakter antar kedua isolat diduga hanya menunjukkan perbedaan pada level strain, sedangkan spesiesnya tetap sama, yaitu *Streptomyces costaricanus*.

Analisis menyimpulkan bahwa isolat RC-SS-37-4 dan RC-SS-37-16 adalah satu spesies, namun kemungkinan berbeda strain atau sub spesies didukung oleh data penelitian lain.

Penelitian yang dilakukan oleh Esnard *et al.* (1995) menyatakan bahwa actinomycetes dalam satu spesies dapat memiliki karakter morfologi dan fisiologi yang berbeda, seperti yang terjadi pada *S. hygroscopicus* dan *S. hygroscopicus* subsp. *decoyinus*. Kedua spesies *S. hygroscopicus* tersebut memiliki perbedaan warna koloni, kemampuan asimilasi gula, toleransi salinitas dan pH, serta resistensi beberapa jenis antibiotik. Walaupun

demikian, sekuen gen 16S rRNA kedua isolat tersebut identik.

KESIMPULAN

Berdasarkan *full sequence* identifikasi menggunakan pendekatan molekuler gen 16S rRNA dan karakterisasi morfologi serta fisiologi, delapan isolat yang memiliki aktivitas antimikroba masuk dalam genus *Streptomyces*. Isolat RC-SS-37-4 dan RC-SS-37-16 teridentifikasi sebagai *S. costaricanus*. Isolat BL-36-1 adalah *S. mobaraensis* (95,2%), isolat BL-20-2 teridentifikasi sebagai *S. violarius* (97,4%) dan BL-14-2 adalah *S. kanamyceticus* (93,9%). Sedangkan isolat BL-22-1, BL-06-5 dan BL-22-3 berturut-turut teridentifikasi sebagai *S. labedae* (94,6%), *S. kunmingensis* (96,2%) dan *S. parvulus* (98,6%).

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA Pusat Penelitian Biologi LIPI serta Kementerian Riset dan Teknologi. Ucapan terimakasih kami ucapkan kepada Dian Alfian dari Puslit Biologi LIPI, atas bantuan selama sekuensing.

DAFTAR PUSTAKA

- Awise, JC. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman & Hall.
- Embley TM. & E. Stackebrandt. 1994. The Molecular Phylogeny and Systematics of the Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 48: 257-289.
- Esnard, J., TL. Potter & BM. Zuckerman. 1995. *Streptomyces costaricanus* sp. nov., isolated from Nematode-suppressive soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 5(4): 775-779.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limitson phylogenies: an approach using the *bootstrap*. *Journal Organism Evolution*. 39: 783-789.
- Goodfellow, M., P. Kämpfer, HJ. Busse, ME. Trujillo, KI. Suzuki, W. Ludwig & WB. Whitman. 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition volume 5*. Springer, New York.
- Jauh-Hsun, C., T. Vinh, JK. Davies & D. Figdor. 2002. Molecular approaches to the differentiation of Actinomycetes spesies. *Journal of Molecular Oral Microbiology*. 14: 250-256.
- Jorgensen, TJA. 1999. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. *Manual of Clinical Microbiology, seventh ed. ASM Press, Washington, DC*, 1526-1543.
- Koonin, EV. 2003. Comparative genomics, minimal gene-sets and the last common universal ancestor. *Natural Review of Microbiology*. 1: 127-136.
- Kurtboke, I. 2001. *Selective isolation of rare Actinomycetes*. Queensland, Australia.
- Madigan, MT., JM. Martiko & J. Parker. 2003. *Biology of Microorganisms. Tenth Edition*. Pearson Education, Inc. USA.
- Miyadoh, S. 1997. *Atlas of Actinomycetes*. Asakura Publishing Co Ltd. Japan.
- Nurkanto, A., F. Listyaningsih, H. Julistiono & A. Agusta. 2010. Eksplorasi keanekaragaman Actinomycetes tanah Temate sebagai sumber antibiotik. *Jurnal Biologi Indonesia*. 6 (3): 325-339.
- Palys, T., LK. Nakamura & FM. Cohan. 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*. 47: 1145-1156.
- Patel, JB., RJ. Wallace Jr., BA. Coklat-Elliott, T. Taylor, C. Imperatrice, DBG. Leonard, RW. Wilson, L. Mann, KC. Jost & I. Nachamkin. 2004. Sequence-based identification of aerobic Actinomycetes. *Journal Clinical microbiology*. 42 (6): 2530-2540.
- Pitcher, DG., NA. Saunders & RJ. Owen. 1989. Rapid extraxtion of bacterial genomic DNA with Guanidium thiocyanate. *Journal Letter Applied Microbiology*. 8: 108 – 114.
- Reller, L. B., M. Weinstein, JH. Jorgensen, & MJ. Ferraro. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases*. 49 (11): 1749-1755.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstruction

- phylogenetic tree. *Journal Molecular Biology Evolution* 4 : 406-425.
- Santos, SR. & H. Ochman. 2004. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and protein. *Journal Environmental Microbiology*. 6: 754-759.
- Suriyachadkun, C., S. Chunhametha, T. Tamura, C. Thawai, W. Potacharoen, K. Kirtikara & JJ. Sanglier. 2010. *Planotetraspora thailandica* sp. nov., isolated from soil in Thailand. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* 60 (9) : 2076-2081.
- Takisawa, M., RR. Colwel & RT. Hill. 1993. Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake bay. *Journal Applied Environmental Microbial*. 59: 997-1002.
- Thompson, JD., TJ. Gibson, F. Plewniak & DG. Higgins. 1997. Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Journal Nucleic Acids Research*. 25: 4876-4882.
- Yukphan, P., W. Potacharoen , S. Tanasupawat, M. Tanticharoen, & Y. Yamada. 2004. *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 313-316.