

Isolasi Dan Penapisan Aktinomisetes Laut Penghasil Antimikroba

Rofiq Sunaryanto^{1,2*)}, Bambang Marwoto¹, Tun Tedja Irawadi²,
Zainal Alim Mas'ud², Liesbetini Hartoto²

¹ Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT

Kawasan PUSPIPTEK Serpong Tangerang Banten 15340

² Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor Kampus IPB Dermaga Kabupaten Bogor Jawa Barat
E-mail: rofiqsn@yahoo.com

Abstrak

Telah dilakukan isolasi dan penapisan aktinomisetes laut yang mampu menghasilkan senyawa antimikroba. Isolasi dilakukan ditiga tempat berbeda yaitu di Pantai Barat Banten, Pantai Utara Cirebon, dan Pantai Selatan Yogyakarta. Isolasi dilakukan dengan dua metode pre-treatment yaitu dengan metode pengasaman dan metode pemanasan. Dari hasil isolasi diperoleh jumlah total isolat sebanyak 50 isolat. Setelah dilakukan penapisan diperoleh 4 isolat yang mampu menghambat *Eschereschia coli*, 5 isolat mampu menghambat *Streptococcus aereus*, 4 isolat mampu menghambat *Bacillus subtilis*, 4 isolat mampu menghambat *Pseudomonas aeruginosa*, 5 isolat mampu menghambat *Candida albican*, dan 4 isolat mampu menghambat *Aspergillus niger*. Hasil identifikasi morfologi dan DNA dari salah satu isolat yang memiliki aktivitas antibakteri paling kuat (isolat A11) adalah *Streptomyces* sp. Secara morfologi isolat A11 memiliki hifa yang bercabang dengan kantong spora pada ujung hifa. Minimum Inhibition Concentration (MIC) isolat A11 terhadap *Bacillus subtilis* sebesar 120,86 µg/ml.

Kata kunci : Isolasi, penapisan, aktinomisetes laut, antimikroba

Abstract

Isolation and screening of antimicrobial-producing marine actinomycetes has been conducted on isolates taken from West Banten, North Cirebon, and South Yogyakarta Coasts. Two methods pretreatments were applied i.e. acid and heat shock method. The research 50 isolates. The screening revealed four isolates which has ability to inhibit *Eschereschia coli*, 5 isolates could inhibited *Streptococcus aereus*, 4 isolates could inhibited *Bacillus subtilis*, 4 isolates could inhibited *Pseudomonas aeruginosa*, 5 isolats could inhibited *Candida albican*, and 4 isolates could inhibited *Aspergillus niger*. Result of identification morphology and DNA of isolate A11 it's *Streptomyces* sp. Morphology of isolate A11 haves branching hyphae with spore sack at the end of hyphae. The Minimum Inhibition Concentration (MIC) of isolate A11 to *Bacillus subtilis* was 120,86 µg /ml.

Key words : Isolation, Screening, Marine Actinomycetes, Antimicrobial.

Pendahuluan

Meningkatnya resistensi mikroba akibat penggunaan antibiotik dan munculnya mikroba patogen baru telah mengilhami pencarian antibiotik baru dari mikroba. Keadaan ini mendorong semakin pentingnya usaha untuk mendapatkan bahan antibiotik yang murah tersedia secara kontinu dalam jumlah besar dan memiliki semua unsur-unsur yang dibutuhkan untuk pembuatan antibiotik tersebut.

Aktinomisetes merupakan kelompok mikroorganisme yang banyak tersebar luas di alam (Oskay et al., 2004; Locci et al., 1983; Goodfellow,1983). Banyak aktinomisetes yang memiliki kemampuan untuk mensintesis metabolit sekunder seperti enzim, herbisida, pestisida, dan antibiotik lainnya (Cross,1988). Sebanyak 70% antibiotik yang telah diketahui berasal dari aktinomisetes, terutama dari genus *Streptomyces* dan *Micromonospora* (Pandey et al., 2004; Berdy, 2005;

Goodfellow et al.,1988). Pada tahun – tahun sebelumnya, peneliti lebih banyak menfokuskan target isolasi pada aktinomisetes tanah. Namun demikian, sekarang ini pencarian antibiotik baru sudah mengarah pada aktinomisetes laut (Lam, 2006; Fiedler et al., 2004; Ghanem et al., 2000). Laut memiliki biodiversitas lebih besar dibandingkan dengan tanah seperti diketahui jenis mikroorganismenya juga akan lebih bervariasi dibandingkan mikroba tanah (Das et al., 2006).

Indonesia merupakan negara kepulauan yang memiliki bentangan laut yang sangat luas, yaitu kurang lebih 3,1 juta km² atau hampir 2 kali lipat dibandingkan luas daratannya. Karakteristik laut yang bermacam-macam mengindikasikan biodiversitas hayati yang sangat besar, khususnya biodiversitas mikroorganisme laut. Namun demikian potensi ini belum banyak dimanfaatkan. Di Indonesia penelitian men-

genai isolasi aktinomisetes laut penghasil antibiotik belum banyak dilakukan. Selama ini eksplorasi aktinomisetes di Indonesia masih sebatas aktinomisetes tanah. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan penapisan aktinomisetes laut penghasil antimikroba, yaitu antibakteri dan antijamur.

Materi dan Metode

Pengambilan sampel

Sampel berupa 6 sedimen laut masing-masing diperoleh dari 3 pantai di Indonesia yaitu pantai utara Cirebon Desa Gebang (koordinat 6°48'37" S 108°45'27"E), Pantai Anyer Banten (koordinat 6°3'19"S 105°54'29"E) dan Pantai Kukup Gunung Kidul Yogyakarta (koordinat 8°8'3"S 110°33'19"E). Lima gram tiap sediment laut diambil pada kedalaman rata-rata 20-50cm. Masing-masing sampel ditempatkan pada falcon tube 15mL dan ditutup rapat. Sampel disimpan dalam ruang dingin sebelum dilakukan proses isolasi.

Isolasi aktinomisetes laut

Sebanyak 1 gram padatan sampel dipisahkan air lautnya dengan cara didekantir. Empat mililiter air steril ditambahkan ke dalam sampel tersebut dan diaduk selama 10 menit dan didiamkan sampai suspensi mengendap. Sebanyak 1 ml cairan sampel diambil dan diencerkan dengan air steril sebanyak 4 mL. Proses pretreatment dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan cara asam dan pemanasan. Pretreatment dengan cara asam dilakukan dengan penambahan asam klorida sampai pH 2 dan didiamkan selama 2 jam. Pretreatment dengan cara panas dilakukan mengacu pada metode Pisano *et al.* (1986) yang dimodifikasi, yaitu dengan memanaskan cairan sampel pada suhu 65°C selama 60 menit.

Cairan sampel yang telah ditreatment selanjutnya diencerkan secara seri dari 10^{-1} sampai dengan 10^{-5} . Selanjutnya 0.1 ml sampel yang telah diencerkan, disebarkan pada permukaan agar media isolasi. Komposisi media agar untuk isolasi adalah sebagai berikut; 10 gr soluble starch, 2 gr pepton, 4 gr yeast ekstrak, 16 gr agar dalam 1000 mL air laut. Medium tersebut ditambahkan juga beberapa antibiotik 100 µgr/ml cycloheximide, 25 µgr/ml nistatin, 100 µgr/ml nalidixic acid, dan 5 µgr/ml rifampin. Antibiotik ditambahkan setelah medium agar disterilisasi.

Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C dalam inkubator. Koloni aktinomisetes yang tumbuh dipisahkan dan dipindahkan ke dalam medium agar yang baru dengan menggunakan marine agar. Peminjaman dilakukan sampai diperoleh koloni tunggal. Selanjutnya masing-masing koloni diberi kode sesuai dengan asal lokasi sampling. Kode A sampel dari Pantai Anyer Banten, kode YK berasal dari pantai Kukup Yogyakarta, Kode

PCI berasal dari pantai utara Cirebon Desa Gebang.

Preparasi ekstrak hasil fermentasi

Koloni yang telah dimurnikan ditumbuhkan pada medium broth YEME selama 2 hari, dan ditransfer ke medium fermentasi dengan komposisi medium Bacto peptone 15 gr/L, yeast extract 3 gr/L, Fe citrate n H₂O 0,3 gr/L, demin water 250mL, dan air laut 750mL. Fermentasi dilakukan selama 5 hari dengan inkubasi pada suhu 30°C. Broth fermentasi dikeringkan dengan freeze drying dan diekstraksi dengan metanol. Ekstrak dalam metanol siap diuji aktivitasnya.

Penapisan aktinomisetes penghasil antimikroba

Tahapan penapisan aktinomisetes penghasil antimikroba dilakukan dengan uji antibakteri dan antijamur dengan metode kertas cakram. Mikroba uji yang digunakan adalah *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, dan *Candida albican*. *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ditumbuhkan pada media nutrisi agar dan *Aspergillus niger*, dan *Candida albican* ditumbuhkan pada Potato Dextrose Agar. Keduanya dilakukan dengan metode pour plate methods.

Sebanyak 15 µL ekstrak sampel diteteskan dalam kertas cakram berukuran 6 mm, kemudian dikeringkan. Selanjutnya diletakkan pada permukaan agar yang telah diinokulasikan mikroba uji. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 24 jam. Zona bening yang terbentuk yang menunjukkan aktivitas antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba uji diukur diameternya.

Penentuan Minimum Inhibition Concentration (MIC)

Minimum Inhibition Concentration (MIC) ditentukan dengan cara melarutkan ekstrak broth pada berbagai konsentrasi yaitu dari konsentrasi 10.000 µg/ml sampai dengan 100 µg/ml. Masing-masing konsentrasi diuji aktivitas antibakterinya menggunakan metode difusi agar. Diameter kertas cakram yang digunakan adalah 6 mm. Zona bening yang terbentuk diukur diameternya. Selanjutnya dibuat kurva Log [C] (konsentrasi) sebagai sumbu Y melawan X² (diameter zona bening) sebagai sumbu X. Titik potong sumbu Y pada X=0 merupakan nilai Log MIC. Metode penentuan MIC ini mengikuti Bonev *et al.*, 2008 yang dimodifikasi.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi aktinomisetes

Sebanyak 6 sampel sedimen laut diambil dari pantai Desa Gebang Cirebon, Pantai Anyer Banten, dan Pantai Kukup Gunung Kidul Yogyakarta dikumpulkan dan dilakukan pretreatment. Pretreatment dilakukan dengan metode pengasaman dan pemanasan. Pretreatment dilakukan untuk mengurangi sejumlah bakteri

kontaminan salah satunya bakteri gram negatif.

Dari hasil isolasi ini diperoleh isolat aktinomisetes sebanyak 5 isolat dari pantai utara Cirebon, 29 isolat dari Pantai Anyer Banten, dan 6 isolat dari Pantai Kukup Gunung Kidul Yogyakarta. Jumlah aktinomisetes yang dapat diisolasi per gram sampel sedimen laut relatif sedikit dibandingkan dengan isolasi aktinomisetes tanah. Hal yang sama diteliti oleh Goodfellow *et al.* (1983) bahwa jumlah aktinomisetes yang dapat diisolasi dari laut cenderung lebih sedikit dibandingkan dari tanah dan sediment air payau. Menurut Goodfellow dan Haynes (1984) aktinomisetes hanya mewakili sebagian kecil komponen dari total populasi bakteri dalam sedimen laut. Populasi aktinomisetes yang paling banyak ditemukan adalah dari tanah dan sedimen payau. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa populasi aktinomisetes terbanyak terdapat di daerah payau. Menurut Srivibole (2000) kondisi air payau diduga memberikan kondisi yang optimum untuk kebutuhan hidup aktinomisetes seperti struktur tanah, kelembapan, dan pH lingkungan. Dilihat dari proses pretreatment yang telah dilakukan, pretreatment menggunakan panas (heatshock treatment) lebih efektif dibandingkan dengan treatment dengan pengasaman (acid treatment). Dengan treatment pengasaman terbukti masih banyak bakteri kontaminan yang tumbuh dan menyebabkan sulitnya pemurnian koloni aktinomisetes.

Penapisan aktinomisetes penghasil antimikroba

Penapisan aktinomisetes dilakukan dengan menggunakan uji hambatan terhadap beberapa mikroba uji dengan metode hambatan difusi agar. Isolasi hasil isolasi yang telah dimurnikan diuji daya hambatnya terhadap beberapa mikroba uji. Dari 50 isolat yang telah diisolasi diperoleh 4 isolat yang mampu menghambat *Escherichia coli*, 5 isolat mampu menghambat *Streptococcus aureus*, 4 isolat mampu menghambat *Bacillus subtilis*, 4 isolat mampu menghambat *Pseudomonas aeruginosa*, 5 isolat mampu menghambat *Candida albican*, dan 4 isolat mampu menghambat *Aspergillus niger*. Hasil penapisan aktinomisetes selengkapnya disajikan dalam Tabel 1.

Hasil penapisan memperlihatkan bahwa isolat A11 (isolat dari Pantai Anyer Banten) memiliki daya anti bakteri yang sangat kuat, namun demikian tidak memiliki daya anti jamur. Berbeda halnya dengan isolat A11, isolat PCL11, A64, dan YK21 memiliki daya hambat terhadap jamur tetapi tidak memiliki daya hambat terhadap bakteri. Isolat A64 menunjukkan hambatan yang paling kuat terhadap *A. niger*, dan isolat A44 menunjukkan hambatan paling kuat terhadap *C. albican*. Karena isolat A11 menunjukkan sifat anti-bakteri yang paling kuat maka dilakukan uji lanjutan

berupa identifikasi morfologi dan filogenik. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan 16S rRNA. Analisa partial sekuens 16S rRNA dari isolat A11 dibandingkan dengan sekuens seluruh bakteri yang ada didalam database Gen-Bank dengan menggunakan program BLAST yang diakses dari website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. BLAST.

Dengan menggunakan 16S rRNA diperoleh informasi bahwa isolat A11 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Streptomyces* sp (homology 100%) kelas Actinobacteria, ordo Actinomycetales, famili Streptomycetaceae, dan genus *Streptomyces*. Minimum Inhibitory Concentration ditentukan dengan menggunakan kurva Log [C] (konsentrasi) sebagai sumbu Y melawan X² (diameter zona bening) sebagai sumbu X. Titik potong sumbu Y pada X=0 merupakan nilai Log (MIC). Plot data hasil penelitian disajikan dalam Gambar 1.

Persamaan matematik yang dibentuk oleh kurva garis lurus Log (C) terhadap X² adalah : $y = 0.0125x + 2.0823$, sehingga pada X=0 maka titik potong sumbu Y terletak pada Y=2.0823 dimana Log MIC = Y. Dengan demikian MIC = 120,86 µg/ml.

Dari pohon filogenik yang dikumpulkan dari beberapa data spesies genus *Streptomyces* diketahui bahwa isolat ini mempunyai kedekatan dengan *S. tanashiensis cephalomyceticus* dan *S. microflavus* yang dikenal banyak menghasilkan senyawa antimikroba. Isolat *S. tanashiensis cephalomyceticus* dikenal mampu mensintesis TAK-637 (tachykinin receptor antagonist) (Tarui *et al.*, 2001). Jika dibandingkan dengan *Streptomyces indonesiaensis* yang berasal dari indonesia, isolat A11 justru lebih dekat dengan *S. tanashiensis cephalomyceticus*, *S. Microflavus*, *S. Africanus*, *Parastreptomyces abscessus*, dan *Streptoallomorpha polyantibiotica*. Namun demikian kedekatan lokasi pengambilan sampel tidak akan menjamin diperolehnya kedekatan homologi suatu spesies. Pohon filogenik ini diolah dengan menggunakan program Mega 3.1, dimana hasil DNA squence dilakukan BLAST di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. BLAST. Pohon filogenik isolat A11 disajikan pada Gambar 2.

Dilihat dari morfologi yang diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 40 kali, isolat A11 terlihat memiliki hifa yang bercabang dengan arah horisontal dan vertikal dan terdapat beberapa kantong spora pada ujung hifa. Dengan mata telanjang, morfologi A11 terlihat warna putih terang, berlipat-lipat dengan hifa yang panjang dan terbentuk beberapa hifa antenna (aerial hyphae) yang timbul secara vertikal. Pada awal pertumbuhan terbentuk koloni tunggal berbentuk bulat, selanjutnya akan berkembang hifa-hifanya memanjang. Koloni tunggal berbentuk bulat yang semakin lama diameter koloni akan semakin melebar.

Kesimpulan

Dengan menggunakan media isolasi soluble strach dan perlakuan sampel dengan cara pengasaman atau pemanasan, diperoleh beberapa isolat aktinomisetes laut, yang mampu menghambat mikroba uji bakteri gram negatif, bakteri gram negatif positif, yeast atau jamur. Dari hasil studi lebih lanjut pada isolat terpilih yang memiliki aktivitas antibakteri paling kuat (A11) menunjukkan bahwa isolat tersebut adalah *Streptomyces* Sp yang memiliki MIC terhadap *Bacillus subtilis* sebesar 120,86 µg/ml.

Ucapan Terima Kasih.

Penulis ucapkan terima kasih kepada Dr. Anis Masuhah, Dr Hardaning pranamuda, dan segenap pembantu peneliti di Balai Pengkajian Bioteknologi BPPT sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik. Demikian juga kami ucapkan terima kasih kepada reviewer yang telah banyak memberi masukan sehingga tulisan ini dapat dipublikasikan.

Daftar Pustaka

- Berdy, Janos. 2005. Bioactive Microbial Metabolites (review article). *J. Antibiot.* 58(1):1-26
- Bonev. B., James. H., Judicael. P. 2008. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61: 1295–1301
- Cross, T. 1988. Actinomycetes: A Continuing Sources of New Metabolites. Invitation ONR Lecture . Post-graduate School of Studies in Biological Science, University of Bradford, Bradford DB7 1DP, Great Britain
- Das. S., Lyla, P.S., & S. Ajmal Khan. 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspective. *Current Science* 90(10) : 1325-1335
- Fiedler, H.P., Christina, B., Alan.T.Bull., Alan, C.W., Michael, G., Olivier, P., Carsten, P., & Gerhard, H. 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek* 87:37-42
- Ghanem. B.N., Soraya. A.S., Zeinab. M. E., & Gehan. A.A.E. 2000. Isolation and Enumeration of Marine Actinomycetes from Seawater and Sediments in Alexandria. *J.Gen. Appl. Microbiol.* 46(45):105-111
- Goodfellow, M. & Williams, S.T. 1983. Ecology of actinomycetes. 37:189-216.
- Goodfellow. M. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol* 37:189-216
- Goodfellow.M. & Haynes J.A. 1984. Actinomycetes in marine sediment. In L.Ortiz-ortiz., L.F. Bojalil., V.Yakoleff (ed). *Biological, Biochemical, and Biomedical aspect of Actinomycetes.* Academic Press, Inc. Orlando.Fla. p. 457-472.
- Goodfellow, M., William, S.T., & Mordarski. M., 1988. Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press New York. p. 43-45
- Lam, K.M. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology* 9:245–251
- Locci. R., & G.P. Sharples. 1983. Morphology of Actinomycetes In Goodfellow M., Mordarski, M. & Williams, S.T. (Eds.) *The Biology of the Actinomycetes.* Academic Press, London, pp. 7164
- Naoki, Tarui, Yoshinori, Ikeura, Hideaki, Natsugari & Kazuo, Nakahama, 2001. Microbial synthesis of three metabolites of a tachykinin receptor antagonist, TAK-637. *J. of Biosci. and Bioeng.* 92(3):285-287
- Oskay, M., Tamer, A.U., & Azeri, C. 2004. Antibacterial activity of some Actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afric. J. of Biotech.* 3 (9): 441-446.
- Pandey, B., Ghimire, P., & Agrawal, V.P. 2004. Studies on the antibacterial activity of actinomycetes isolated from the Khumbu region of Mt. Everest. International Conference on the Great Himalayas: Climate, Health, Ecology, Management and Conservation, Kathmandu. Kathmandu University and the Aquatic Ecosystem Health and Management Society, Canada. January 12-15, 2004.
- Pisano. M. A., Michael. J.S., & Madelyn. M.L., 1986. Application of pretreatments for the isolation of bioactive actinomycetes from marine sediments. *Appl Microbiol. Biotechnol* 25:285-288
- Srivibool, R. 1998. A collection of actinomycetes from mangrove soils and screening for antimicrobial producing strains. 6: 23-33.
- Tarui,.N., Yoshinori Ikeura, Hideaki Natsugari & Kazuo Nakahama. 2001. Microbial synthesis of three metabolites of a tachykinin receptor antagonist, TAK-637. *J. of Biosci. and Bioeng.* 92(3):285-287