

ISOLASI DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI *ACTINOMYCETES* BERASOSIASI DENGAN KORAL

Dayang Indah Kurniati^{1*}, Puji Ardiningsih¹, Risa Nofiani¹

¹Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura,
Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi, Pontianak

*email: dayangindahkurniati@student.untan.ac.id

ABSTRAK

Penyakit infeksi adalah masalah penyakit diseluruh dunia yang disebabkan oleh mikroba patogen. Penyakit infeksi umumnya dapat diobati dengan menggunakan antibiotik. *Actinomycetes* yang berasosiasi dengan koral memiliki potensi untuk menghasilkan senyawa antibakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan *Actinomycetes* di koral yang memiliki aktivitas antibakteri dan mengidentifikasi genusnya. Isolasi dan produksi *Actinomycetes* menggunakan media ISP1, dan ekstraksi *Actinomycetes* menggunakan pelarut etil asetat. Aktivitas antibakteri dalam penelitian ini menggunakan metode difusi agar dan isolat diidentifikasi mengikuti pedoman buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Isolat *Actinomycetes* yang diisolasi dari koral memiliki genus *Streptomyces* sp. BD2. Ekstrak *Streptomyces* sp. BD2 menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Vibrio cholerae*.

Kata kunci: koral, *Actinomycetes*, antibakteri

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen. Umumnya penyakit infeksi dapat diobati dengan menggunakan antibiotika. Muncul dan berkembangnya resistensi antibiotika dapat disebabkan oleh kesalahan penggunaan antibiotika dalam pengobatan (PERMENKES, 2015). Mikroba resisten antibiotika (MRA) adalah mikroba yang mampu melawan efek dari antibiotika, sehingga mikroba tersebut tetap tumbuh. MSA telah menjadi masalah kesehatan diseluruh dunia (PERMENKES, 2015).

Salah satu sumber metabolit sekunder yang bersifat antibiotika dapat berasal dari *Actinomycetes*. Banyak antibiotika komersial, seperti: tetrasiklin, eritromisin, vancomisin, dan streptomycin berasal dari metabolisme sekunder *Actinomycetes* (Weber *et al.*, 2015). Sekitar 70% antibiotika yang telah ditemukan dihasilkan oleh *Actinomycetes* terutama dari genus *Streptomyces* (Subramani and Albersberg, 2012). *Actinomycetes* adalah family bakteri Gram Positif yang memiliki kandungan G + C yang tinggi (Zhang *et al.*, 2008). Karakteristik *Actinomycetes* secara mikroskopis ditandai dengan bentuk filamen bercabang atau batang dan memiliki hifa tidak bersekat. Miselium dapat bercabang atau tidak bercabang, lurus atau berbentuk spiral. Spora berbentuk bola, silinder atau oval (Anggraini, 2015).

Terumbu karang merupakan salah satu ekosistem pantai yang memiliki produktivitas dan keragaman biota laut yang tinggi. Selain jenis karang lunak (*soft coral*), terdapat juga karang keras (*hard coral*) sebagai salah satu komponen penyusun utama terumbu karang (Vincent *et al.*, 2011). Penelitian Lampert, 2008 menemukan 51% dari 36 isolat yang diisolasi dari karang keras jenis *Platygyra lamellina*, termasuk jenis *Actinomycetes*. Pada penelitian ini akan dilakukan isolasi bakteri *Actinomycetes* dari koral keras dan uji bakteri *Actinomycetes* sebagai antibiotika yang bersimbiosis dengan koral keras. Sampel koral diambil pada arah timur laut Pulau Baru, Kabupaten Bengkayang, Kalimantan Barat.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium foil, autoklaf, batang pengaduk, botol semprot, bunsen, cawan petri, Erlenmeyer, *hotplate*, inkubator, jarum ose, kapas, kasa, *laminar air flow*, lemari es, mikropipet, neraca analitik, pinset, *rotary evaporator*, sendok *stainless*, tabung reaksi, dan seperangkat alat gelas yang umum digunakan.

Bahan-bahan yang digunakan adalah akuades (H_2O), asam nalidiksat ($C_{12}H_{12}N_2O_3$), etil asetat ($C_4H_8O_2$), ISP1, ISP2, koral, Nutrient Agar (NA), Nutrient Broth (NB), nystatin ($C_{47}H_{75}NO_{17}$), Simmons Citra Agar (SCA), tetrasiklin ($C_{22}H_{24}N_2O_8$), dan mikroba uji *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*.

Prosedur Kerja

Sampling koral

Sampel koral diambil dari Pulau Baru, Bengkayang, Kalimantan Barat. Selanjutnya sampel koral dimasukkan kedalam plastik yang steril disimpan dalam kotak es dan dibawa ke laboratorium.

Preparasi sampel koral

Sampel koral dibilas tiga kali menggunakan air laut steril dan dikikis menggunakan pisau steril. Selanjutnya sampel koral yang sudah dikikis kemudian ditambahkan air laut steril dan dimasukkan kedalam botol vial.

Isolasi *Actinomycetes* dari koral

Isolasi *Actinomycetes* menggunakan metode tuang. Sebanyak 250 μ L suspensi sampel diinokulasikan pada media ISP1, ISP2 dan SCA yang mengandung nystatin 100 μ g/mL dan asam nalidiksat 100 μ g/mL kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1 bulan. Setiap hari koloni yang tumbuh diamati, koloni yang diduga *Actinomycetes* dimurnikan. Pemurnian dilakukan dengan cara menggoreskan koloni pada media baru hingga diperoleh koloni murni.

Identifikasi *Actinomycetes*

Identifikasi dilakukan dengan 2 metode, yaitu uji pewarnaan Gram dan *slide culture*.

- a. Uji pewarnaan Gram isolat *Actinomycetes* dilakukan dengan mengambil isolat menggunakan ose kemudian diletakkan pada cairan akuades diatas kaca preparat, dan dilakukan fiksasi. Kristal violet ditambahkan dan didiamkan selama 1 menit, kemudian dibilas menggunakan akuades dan dikeringkan. Setelah itu iodine ditambahkan dan diamkan selama 1 menit, lalu dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Alkohol 96% ditambahkan dan didiamkan 20 detik lalu bilas menggunakan akuades setelah kering ditambahkan safranin didiamkan 20 detik lalu dibilas menggunakan akuades dan dikeringkan. Kemudian diamati menggunakan mikroskop.
- b. Metode *slide culture* dilakukan dengan cara media ISP1 padat dipotong dengan ukuran 0,5 cm. Potongan media tersebut diletakkan di atas *cover glass* yang dialaskan kaca preparat. Spora dari biakan murni *Actinomycetes* diambil menggunakan jarum ose kemudian ditanam di permukaan potongan media. Selanjutnya potongan media ditutup dengan *cover glass* kemudian diinkubasi selama 7 hari. Morfologi *Actinomycetes* diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x kemudian diidentifikasi dengan mengikuti panduan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* dan *Intechopen*.

Produksi dan ekstraksi *Actinomycetes* dari koral

Produksi isolat *Actinomycetes* dilakukan dengan cara spora bakteri *Actinomycetes* pada cawan petri ditambahkan 1ml media ISP1 dan dikikis, kemudian dipindahkan pada 50ml media cair ISP1 dan dikocok pada kecepatan 140 rpm setelah 7 hari kultur *Actinomycetes* disaring. Filtrat diekstraksi dengan pelarut etil asetat dengan perbandingan (1:1), didiamkan hingga membentuk dua lapisan, lapisan organik dikeringkan sehingga didapatkan ekstrak. Ekstrak yang diperoleh diuji aktivitas antibakteri menggunakan bakteri uji *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Vibrio cholerae*.

Peremajaan bakteri uji

Kultur murni bakteri uji diinokulasikan sebanyak 1 ose pada media Nutrient Agar (NA) dalam cawan petri dengan cara digoreskan secara aseptik, selanjutnya diinkubasi selama 24jam pada suhu ruang.

Pembuatan kultur cair bakteri uji

Kultur murni bakteri uji dipersiapkan dengan menanam sebanyak 1 ose koloni bakteri uji pada media Nutrient Broth (NB) dan dikocok pada kecepatan 140 rpm selama 24 jam pada suhu ruang.

Uji aktivitas antibakteri ekstrak *Actinomyces*

Prosedur kerja yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri yaitu menggunakan metode difusi agar dengan sumur. Sebanyak 20ml media NA dicampur 50 μ L kultur bakteri uji dan dituangkan pada petri. Setelah medianya beku dibuat sumur masing-masing sumur diisi dengan 20 μ L ekstrak dengan dosis 500 μ g dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Zona bening yang terbentuk disekitar sumur diukur diameternya menggunakan jangka sorong. Tetrasiklin dengan konsentrasi 20 μ g/mL sebagai kontrol positif dan etil asetat sebagai kontrol negatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi dan Inokulasi Sampel Koral

Sampel koral diambil pada arah timur Pulau Baru, Kabupaten Bengkayang, Kalimantan Barat. Jenis koral yang ditemukan dari perairan Pulau Baru merupakan jenis dengan struktur keras yang berwarna orange kemerah-merahan (Gambar 1).



Gambar 1. Sampel koral keras

Preparasi sampel koral diawali dengan cara membilas sampel koral menggunakan air laut steril yang berfungsi menghilangkan pengotor yang terdapat pada koral. Koral selanjutnya dikikis menggunakan pisau steril yang bertujuan untuk melepaskan mikroorganisme yang ada pada jaringan koral.

Inokulasi koral dilakukan pada 3 media, setiap media mengandung nystatin 100 μ g/mL dan asam nalidixat 100 μ g/mL yang bertujuan untuk meminimalisir kontaminasi dari jamur dan bakteri Gram negatif. Nistatin membunuh jamur yaitu dengan cara bergabung dengan ergosterol yang terdapat pada membran sel fungi dengan menimbulkan gangguan dan kebocoran sitoplasma (Pratiwi, 2008). Asam nalidixat bekerja dengan menghambat kerja dari enzim DNA girase yang bertanggung jawab membuka dan menutupnya lilitan DNA (Triono dkk., 2012).

Inkubasi sampel koral ketiga media diamati setiap hari selama 1 bulan. Koloni yang diduga *Actinomyces* ditandai dengan koloni yang tidak mengkilap pada awal pertumbuhan dan diikuti dengan terbentuknya spora yang berbentuk serbuk pada hari berikutnya (Gambar 2).

Hasil inokulasi sampel koral diperoleh 3 koloni yang diduga *Actinomyces*. Semua koloni hanya tumbuh pada media ISP1, sedangkan pada ISP2 dan SCA tidak ada tumbuh koloni yang diduga *Actinomyces*, dikarenakan kedua media rusak pada saat penyimpanan. Selanjutnya hanya satu koloni yang dilakukan pemurnian, identifikasi dan uji antibakteri yaitu koloni *Actinomyces* kode BD2.

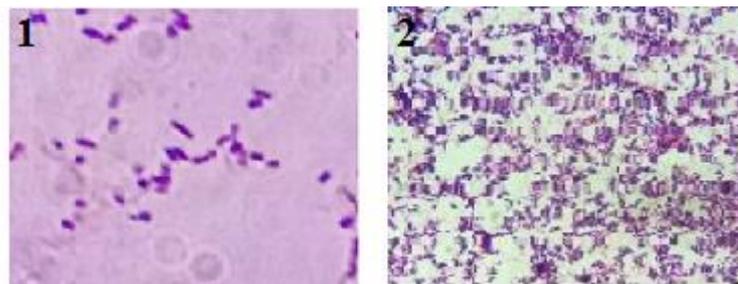


Gambar 2. Hasil inokulasi sampel koral pada media ISP1 yang berumur 1 bulan: Isolat *Actinomyecetes* kode BD1 (1); Isolat *Actinomyecetes* kode BD2 (2); Isolat *Actinomyecetes* kode BD3 (3); Koloni bakteri anaerob (4)

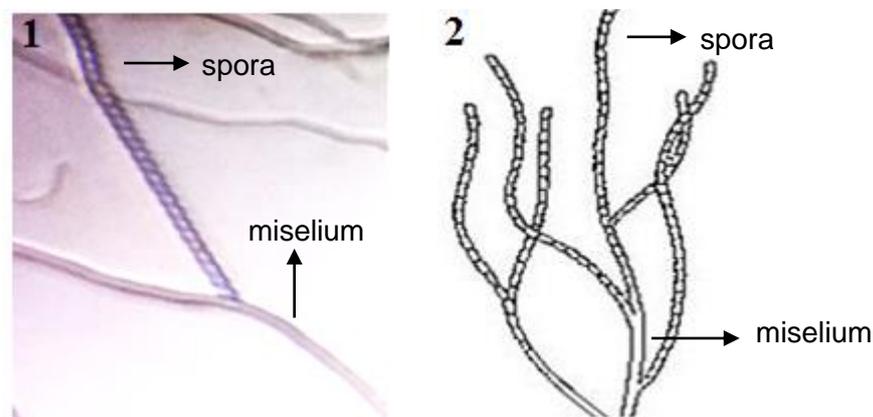
Pemurnian dan Identifikasi *Actinomyecetes* Kode BD2

Koloni *Actinomyecetes* kode BD2 dimurnikan pada media ISP1. Hal ini dilakukan hingga diperoleh koloni murni yang ditandai dengan diperolehnya koloni yang homogen. Hasil pemurnian diperoleh isolat memiliki spora berwarna putih pada media ISP1.

Identifikasi isolat *Actinomyecetes* kode BD2 dilakukan dengan metode uji pewarnaan Gram dan *slide culture*. Uji pewarnaan Gram dilakukan untuk mengetahui isolat yang didapat merupakan bakteri Gram positif atau Gram negatif. Hasil pewarnaan Gram isolat *Actinomyecetes* kode BD3 adalah Gram positif. Gram Positif banyak mengandung peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan dengan Gram negatif yang ditandai dengan warna ungu (Gambar 3).



Gambar 3. Mikrograf hasil pewarnaan Gram (perbesaran 100x) untuk Isolat *Actinomyecetes* kode BD2: Isolat *Actinomyecetes* BD2 (1); Kontrol Gram positif (2) (Agustina dkk., 2019)



Gambar 4. Mikrograf morfologi spora *Actinomyecetes* kode BD2 pada media ISP1: Isolat BD2 (1); *Streptomyces* (2) (Li et al., 2016)

Identifikasi dengan menggunakan metode *slide culture* untuk melihat morfologi spora dan miselium menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x. Berdasarkan hasil identifikasi isolat *Actinomyecetes* BD2 termasuk genus *Streptomyces* dengan ciri morfologi

miselium aerial dan spora berantai. *Streptomyces* memiliki ciri-ciri membentuk miselium aerial, spora berantai (Holt *et al.* 1994). Mikrograf morfologi spora *Actinomycetes* BD2 memiliki kemiripan dengan morfologi spora *Streptomyces* jenis *Rectiflexibiles* (Li *et al.*, 2016) dan penelitian (Sektiono dkk., 2016) (Gambar 4) dengan memiliki ciri miselium aerial dan spora berantai. Berdasarkan hasil identifikasi dengan uji pewarnaan Gram dan *slide culture* maka isolat *Actinomycetes* BD2 dinamakan *Streptomyces* sp. BD2.

4.5 Produksi dan Ekstraksi *Actinomycetes*

Isolat *Streptomyces* sp. BD2 diinokulasikan pada media cair ISP1, media ISP1 digunakan karena pada saat inokulasi awal isolat ketiga isolat hanya tumbuh dimedia ISP1 dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari, diharapkan ketiga isolat sudah berada pada fasa stasioner (Kumala, 2015). Umumnya pada fasa stasioner isolat *Streptomyces* sp. BD2 menghasilkan metabolit sekunder.

Selama proses inkubasi, isolat *Streptomyces* sp. BD2 dikocok pada kecepatan 140 rpm. Tujuan pengocokan adalah untuk meningkatkan aerasi pada media. Kultur *Streptomyces* sp. BD2 kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat. Berat ekstrak *Streptomyces* sp. BD2 adalah 0,058 gram. Selanjutnya ekstrak *Streptomyces* sp. BD2 dilakukan uji aktivitas antibakteri.

4.6 Aktivitas Antibakteri Ekstrak *Streptomyces* sp. BD2

Ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening. Hasil uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini menunjukkan ekstrak *Streptomyces* sp. BD2 memiliki aktivitas antibakteri terhadap 5 bakteri uji yaitu *E. coli*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* dan *S. aureus* (Tabel 1).

Lee dan Hwang (2002) mengatakan bila diameter daerah hambatan sebesar 5,00-9,00 mm maka aktivitas penghambatannya dikategorikan lemah, 10,00-19,00 mm dikategorikan sedang dan lebih dari atau sama dengan 20,00 mm dikategorikan kuat. Oleh karena itu, isolat *Actinomycetes* kode BD2 dikategorikan kuat dalam menghambat bakteri *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, dan dikategorikan sedang dalam menghambat bakteri *V. cholerae*. Penelitian Harpeni, (2007) menunjukkan isolat bakteri karang lunak dari genus *Briareum* mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *S. aureus* sebesar 0,86cm dan bakteri uji *E. coli* sebesar 2,60cm .

Penghambatan bakteri uji oleh ekstrak *Streptomyces* sp. BD2 diakibatkan senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibakteri. Beberapa jenis *Actinomycetes*, diantaranya *Streptomyces griseus* pernah dilaporkan menghasilkan antibiotik streptomisin (Meanwell dan Shama 2008).

Tabel 1. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri *Streptomyces* sp. BD2 Terhadap Beberapa Bakteri Patogen

Sampel	Diameter Zona Bening (mm)					Dosis/ sumur (μ g)
	<i>E. coli</i>	<i>V.cholerae</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.typhi</i>	
Ekstrak <i>Streptomyces</i> sp. BD2	21,8	15,8	23	22,6	24	500
K (+)	13,84	16,39	16,5	17,21	16,7	20
K (-)	-	-	-	-	-	20

Keterangan: K(+) Kontrol Positif (Tetrasiklin);K(-) Kontrol negatif (Etil Asetat); (-)Tidak ada zona bening

Sebagai pembanding pada uji aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp. BD2 ini digunakan antibiotika tetrasiklin. Tetrasiklin dapat membunuh bakteri patogen dan pada saat uji pendahuluan aktivitas antibakteri, tetrasiklin memiliki zona bening yang lebih besar daripada antibiotika amoxilin (amoxan). Tetrasiklin merupakan antibiotika yang dapat mengganggu proses sintesis protein dan merupakan antibiotika pilihan yang mampu menghambat bakteri Gram Positif maupun Gram Negatif. Tetrasiklin diproduksi oleh *Streptomyces* sp. (Pratiwi, 2008). Tetrasiklin diproduksi oleh *Streptomyces* sp. (Pratiwi, 2008). Berdasarkan penelitian Meanwell dan Shama 2008, serta Pratiwi 2008 menemukan antibiotik yang diproduksi oleh *Streptomyces* yaitu

streptomisin dan tetrasiklin, antibiotik tersebut memiliki mekanisme kerja menghambat sintesis protein, dengan begitu dapat di perkirakan dalam penelitian ini mekanisme kerja metabolit sekunder yang dihasilkan *Streptomyces* sp. BD2 yaitu menghambat sintesis protein bakteri.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan isolat *Actinomyces* yang berasosiasi dengan koral yaitu *Streptomyces* sp. BD2 yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, dan *V. cholerae*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina Dini., Diana Chusna Mufida., Hanifa Riski A.S., Dion Khristashogi., 2019., Uji Sensitivitas Antibiotik Terhadap *Staphylococcus Aureus* Yang Terdeteksi Dalam Sputum Pasien Dengan Pneumonia Yang Dirawat Di Rumah Sakit., *Journal of Agromedicine and Medical Sciences.*,5(1): 20-24.
- Anggraini, W., 2015., Isolasi *Actinomyces* dengan Menggunakan Metode Skrining Sebagai Penghasil Enzim Kitinase. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Fisika Al-Biruni.*, 4(1):85-95.
- Harpeni Esti., 2007., Eksplorasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Karang Lunak sebagai Alternatif Sumber Senyawa Bioaktif: Uji Hayati Antibakteri., *Biosfera* 24 (3):113-119.
- Holt, John G, Krieg, Noel R, Sneath, Peter H.A, Staley, James T, Williams, and Stanley T., 1994., *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. 9th edition. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Kumala, T, Jayuska A, Ardiningsih P., 2015., Uji Aktivitas Antibakteri Isolat *Actinomyces* 9 ISP 1 dari Spons Asal Perairan Pulau Randayan. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 4(2) : 11-15.
- Lampert, Y., Dovi, K., Yeshayahu, N., Zvy, D., Adi, B., Russell, T. 2008. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the mucus of the Red Sea Corals. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64(2): 187-198.
- Lee J Y, & Hwang, B.K., 2002., Diversity of Antifungal *Actinomyces* in Various Vegetative Soils of Korea, *Canadian Journal of Microbiology*, 4(8): 407-417.
- Meanwell RJL, Shama G., 2008., Production of streptomycin from chitin using *Streptomyces griseus* in bioreactors of different configuration. *Bioresource Technology* 9(9):5634-5639.
- Permenkes RI., 2015., Program Pengendalian Resistensi Antimikroba di Rumah Sakit. Kesehatan RI, Jakarta.
- Pratiwi S.T., 2008., Mikrobiologi farmasi. Erlangga, Jakarta: 150 – 171.
- Sektiono, Antok Wahyu., Siti Nur Kajariyah, Syamsuddin Djauhari. 2016., Uji Antagonisme *Actinomyces* Rhizosfer Dan Endofit Akar Tanaman Cabai (*Capsicum frutescens* L.) Terhadap Jamur *Colletotrichum capsici* (Syd.) *Bulet Bisby*. *Jurnal HPT* 4 (1): 18-23.
- Subramani R., Aalbersberg W., 2012, Marine *Actinomyces* an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research*, 167(10): 571-580.
- Triono, Aviv A, Akhmad E. P., 2012., Efektifitas Antibiotik Golongan Sefalosporin dan Kuinolon terhadap Infeksi Saluran Kemih. *Artikel Penelitian*. 12 (1): 6-11.
- Vincent IV, Hincksmann CM, Tibbest IR, Harris A. 2011. Biomass and abundance of herbivorous fishes on coral reefs of Andavadoaka, Western Madagascar. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science*, 10(1): 83-99.
- Weber T, P Charusanti, EM Musiol-Kroll, X Jiang, Y Tong, HU Kim and SY Lee. 2015., Metabolic Engineering of Antibiotic Factories: New Tools for Antibiotic Production in *Actinomyces*. *Trends in Biotechnology*. 33 (1):15-26.
- Zhang, H., Wang, Y., Pfeifer, B. A. 2008. Bacterial Hosts for Natural Product Production. *Molecular pharmaceuticals*. 5(2):212-225.