

Skrining Isolat Bakteri *Actinomycetes* dari Sumber Air Panas Ai' Sipant Lotup yang berpotensi sebagai Agen Antifungi terhadap Fungi *Malassezia* sp. (M1).

Nurjanah¹, Rahmawati¹, Novik Nurhidayat²

¹Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura, Jln. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi, Pontianak

²Bidang Mikrobiologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Bogor

Email korespondensi : nurjanah@student.untan.ac.id

Abstrak

Actinomycetes is a filamentous gram-positive bacteria. This group of bacteria can produce bioactive compounds, one of which is antifungal compounds. This study aims to determine the antifungal activity of *Actinomycetes* isolates from hot springs Ai 'Sipant Lotup in Sanggau Regency, West Kalimantan, to against *Malassezia* sp. (M1) through antifungal activity test using paper disc diffusion method. *Actinomycetes* isolates which have antifungal activity against *Malassezia* sp. (M1) are *Microbispora* sp. (S311A) and *Streptomyces* sp. (H2232). Based on the classification of inhibitory zone activity, the isolates were classified as strong (S311A) and medium (H2232) to against *Malassezia* sp. (M1).

Keyword : *Actinomycetes*, antifungal, *Microbispora* sp. (S311A), *Streptomyces* sp. (H2232), *Malassezia* sp.(M1).

PENDAHULUAN

Actinomycetes merupakan bakteri gram positif berbentuk filamentus dan mampu membentuk spora. Bakteri kelompok ini mengalami pembelahan kompleks dan dapat menghasilkan beragam senyawa bioaktif dibandingkan dengan kelompok bakteri lain (Dewi, 2014). Menurut Berdy (2005) *Actinomycetes* ialah golongan mikroba terbesar yang mampu menghasilkan senyawa bioaktif, dari 22.500 senyawa bioaktif 45% diproduksi oleh golongan *Actinomycetes*. Senyawa aktif yang dihasilkan *Actinomycetes* umumnya digunakan sebagai antimikroba, antikanker, maupun antitumor. *Actinomycetes* juga dikenal sebagai agen penghasil antibiotik. Sekitar 70% antibiotik yang telah ditemukan dihasilkan oleh *Actinomycetes* terutama dari anggota genus *Streptomyces*.

Actinomycetes juga berpotensi sebagai agen antifungi. Senyawa yang dihasilkan antara lain *Kasugamycin* oleh anggota spesies *Streptomyces kasugaensis*, polyoxin B dan D oleh anggota spesies *Streptomyces cacaoi* var. *asoensis*. Metabolit yang dihasilkan tersebut dapat menghambat proses sintesis dinding sel jamur (Barka *et al.*, 2016). Potensi *Actinomycetes* juga dijelaskan dalam penelitian yang telah dilakukan beberapa ilmuwan. Salah satunya Deepa *et al.* (2013) melaporkan sebanyak 16 isolat yang diisolasi di wilayah India berpotensi sebagai agen antimikroba 4 di antaranya

berpotensi sebagai agen antifungi yakni *Streptomyces griseoflavus*, *Streptomyces cyaneus*, *Streptomyces exfoliatus* dan *Streptomyces albus*.

Sumber air panas Ai' Sipant Lotup memiliki arti nama, yaitu Ai' artinya air, Sipant artinya menyimpan, Lotup artinya meletup atau bergelembung akibat panas/mendidih, sehingga Ai Sipant Lotup berarti tempat penyimpanan air panas/kolam air panas (bahasa Bokidoh oleh Dayak Jangkang). Sumber air panas ini memiliki temperatur antara 55,6-57°C dan suhu udara sekitar 28°C. Salah satu kajian biologis yang dapat dilakukan pada sumber air panas yaitu mengenai bakteri termofilik. Berdasarkan hasil isolasi yang dilakukan Manalu (2019) pada sumber air panas Ai' Sipant Lotup telah ditemukan 11 anggota dari bakteri *Actinomycetes*. Isolat tersebut diduga memiliki potensi antifungi.

Salah satu jamur penyebab mikosis paling umum ialah jamur anggota genus *Malassezia*, khususnya pada spesies *Malassezia furfur* yakni penyebab penyakit panu (Gupta *et al.*, 2004). Penyakit panu merupakan penyakit kulit dengan nama lain *Pityriasis Versikolor* (PV). Kasus penyakit PV di Indonesia belum dapat diketahui dengan pasti, namun diperkirakan 40-50% populasi dinegara tropis terkena penyakit ini.

Kurangnya informasi mengenai potensi *Actinomyces* dari sumber air panas Ai' Sipatn Lotup, Kalimantan Barat dalam upaya mengendalikan fungi penyebab *Pitiriasis Versikolor* (PV), maka dilakukan penelitian ini untuk melihat potensi bakteri tersebut melalui uji daya hambat secara *in vitro* terhadap anggota genus *Malassezia* sp. (M1).

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan April hingga Juli 2018. Peremajaan bakteri dan jamur dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tanjungpura, Pontianak. Pengujian bakteri dan jamur dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Kesehatan, Mikrobiologi, Puslit-Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Bogor, Jawa Barat.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas agar, akuades, alkohol 70%, etanol 96%, iodium, ketokenazole 2%, isolat bakteri *Actinomyces* hasil isolasi dari Ai' Sipatn Lotup oleh Manalu (2019), isolat jamur *Malassezia* sp. (M1), Kristal violet, media *Malt Extract Agar* (MEA), media *Malt Extract Broth* (MEB), media NA.

Prosedur Kerja

Sterilisasi Alat

Alat-alat yang tahan panas dibersihkan terlebih dahulu dengan sabun di air mengalir, kemudian dibungkus dengan kertas dan plastik. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf dengan tekanan 2 atm dan suhu 121°C selama 15 menit (Gunawan *et al.*, 2004).

Pembuatan Media

Pembuatan media MEA (*Malt Ekstrak Agar*), MEB (*Malt Ekstrak Broth*), NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*) dengan cara menimbang masing-masing media MEA, MEB, NA dan NB dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan akuades sebanyak 1L. Komponen bahan dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih. Setelah mendidih dimasukkan kedalam wadah gelas (erlenmeyer) kemudian disterilisasi kedalam autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C tekanan 1 atm (Atlas, 2010).

Peremajaan Isolat Jamur dan Isolat Actinomyces

Isolat jamur *Malassezia* sp. (M1) diinokulasikan dengan jarum ose ke dalam, media agar MEA

kemudian diinkubasi pada suhu 25-30°C selama 3-5 hari hingga diperoleh pertumbuhan yang normal (Brooks *et al.*, 2005). Isolat *Actinomyces* diinokulasikan menggunakan jarum ose ke dalam media NA kemudian diinkubasi pada suhu 50 °C selama 3-5 hari hingga diperoleh pertumbuhan normal.

Pembuatan Suspensi Jamur Uji

Koloni jamur disuspensikan ke dalam NaCl fisiologis sebanyak 5 ml. Suspensi mikroba uji diukur dengan alat spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 530 nm dengan (Depkes, 1995).

Pembuatan Supernatan Isolat Bakteri Actinomyces.

Satu ose isolat bakteri anggota *Actinomyces* pada cawan petri diinokulasikan ke dalam media NB 10 ml, kemudian diinkubasi selama 96 jam pada suhu 50°C. Suspensi bakteri tersebut di filter menggunakan *shiring filter* ukuran 0,22 µm pada jam ke-96. Supernatan hasil filter dimasukan kedalam tabung reaksi.

Uji Daya Hambat isolat Actinomyces Terhadap Malassezia sp. (M1)

Uji daya hambat bakteri terhadap *Malassezia* sp. (M1) dilakukan dengan metode difusi kertas cakram. Suspensi *Malassezia* sp. (M1) OD (*Optical Density*) 0,1 diinokulasikan ke dalam media MEA dengan metode apus (*swap methode*). Kertas cakram diameter 6 mm direndam ke dalam supernatan isolat bakteri *Actinomyces* selama 15-20 menit, kemudian diletakan di atas media MEA yang telah di inokulasi jamur *Malassezia* sp. (M1) lalu diinkubasi selama 48 jam untuk melihat zona hambat yang dihasilkan. Zona hambat diukur menggunakan jangka sorong.

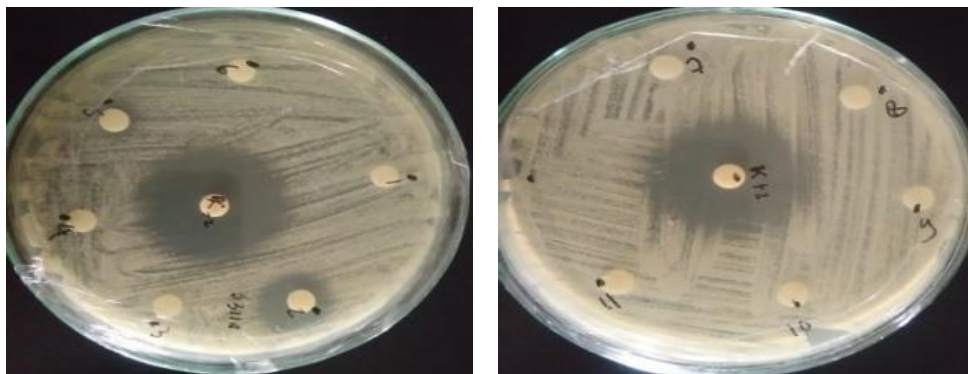
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Isolat *Actinomyces* yang digunakan untuk menghambat fungi uji *Malassezia* sp. (M1) pada penelitian ini, ialah: isolat S31, isolat S311A, isolat S311, isolat H21, isolat H2232, isolat S21, isolat H22*1, isolat H12, isolat S211, isolat H11, isolat H24. Kontrol positif yang digunakan yaitu ketokenazole 2%. Berdasarkan hasil uji aktivitas antifungi terdapat 2 isolat yang mampu menghambat pertumbuhan jamur uji yakni isolat S311A (*Microbispora* sp.) dan H2232 (*Streptomyces* sp.). Penghambatan tersebut ditandai

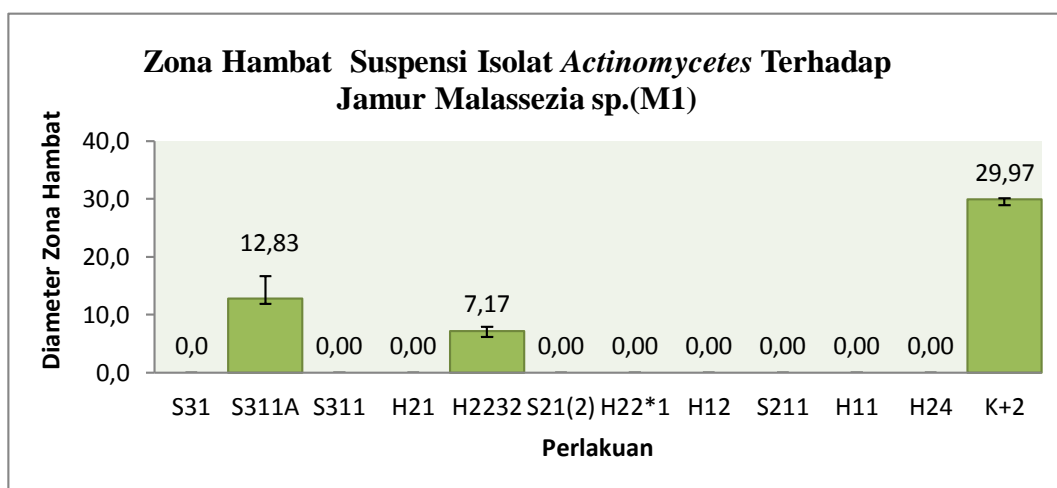
dengan terbentuknya zona bening disekitar kertas cakram (Gambar 1). Berdasarkan klasifikasi respon zona hambat, isolat S311A tergolong dalam penghambatan kuat dengan rata-rata ukuran zona penghambatan 12,83 mm. Isolat H2232 tergolong

ke dalam aktivitas penghambatan sedang dengan nilai rata-rata zona yang dibentuk sebesar 7,17 mm. (Gambar 2).



Gambar 1. Zona Hambat Supernatan Isolat Bakteri *Actinomycetes* Terhadap Jamur anggota genus *Malassezia* Sp. (M1).

Ket : 1. Isolat S31, 2. Isolat S311A, 3. Isolat S311, 4. Isolat H21, 5. Isolat H2232, 6. Isolat S21, 7. Isolat H22*1, 8. Isolat H12, 9. Isolat S211, 10. Isolat H11, 11. Isolat H24, 12. K+2 (ketokenezole 2%).



Gambar 2. Grafik diameter zona hambat suspensi isolat *Actinomycetes* terhadap jamur *Malassezia* sp. (M1).

Pembahasan

Hasil pengukuran zona hambat menggunakan jangka sorong menunjukkan bahwa 2 dari 11 isolat *Actinomycetes* memiliki penghambatan terhadap jamur uji *Malassezia* sp (M1) (Gambar 1). Davis dan stout (1971) membagi kedalam 4 kategori kekuatan daya hambat, yakni sangat kuat (zona hambat > 20 mm), kuat (zona hambat 10-20 mm), sedang (zona hambat 5-10 mm) dan lemah (zona hambat < 5 mm). Berdasarkan kriteria tersebut dapat dilihat bahwa isolat S311A memiliki aktivitas penghambatan kuat dengan menghasilkan zona hambat sebesar 12,83 mm. Isolat H2232 memiliki aktivitas penghambatan sedang terhadap jamur *Malassezia* sp. (M1)

dengan nilai zona hambat sebesar 7,17 mm (Gambar 2). Menurut Akbar *et al.* (2017) dan Ayari *et al.* (2016) besar kecilnya diameter zona hambat dipengaruhi oleh berbagai hal antara lain, jenis media, jenis isolat, pH, suhu inkubasi dan lama waktu inkubasi.

Zona hambat yang di bentuk oleh isolat S311A dan H2232 diduga disebabkan oleh aktivitas senyawa antifungi yang dihasilkan oleh isolat bakteri tersebut. Belum diketahui secara pasti bagaimana mekanisme aktivitas antifunginya terhadap *Malassezia* sp. (M1). Menurut Marsh (1997) ada 3 kelompok mekanisme antifungi.

Kelompok pertama dengan mekanisme terjadi gangguan pada membran sel oleh senyawa turunan polien yang menyebabkan terjadinya kebocoran pada membran sel jamur sehingga menyebabkan kematian pada sel jamur contoh senyawanya antara lain, Nistatin, Amfoterisin B dan Kandisidin. Kelompok kedua senyawa antifungi yang mampu menghambat ergosterol dalam sel jamur adalah senyawa turunan imidazol sehingga menyebabkan ketidakseimbangan metabolik sel jamur contohnya, Ketokonazol, Klortimazol, Mikonazol, Bifonazol. Mekanisme golongan ketiga mengganggu sintesis asam nukleat dan protein. Mekanisme ini disebabkan oleh senyawa turunan pirimidin yang membentuk senyawa metabolik antagonis kemudian bergabung dengan asam ribonukleat dan menghambat sintesis asam nukleat dan protein jamur.

Pada penelitian ini telah diketahui bahwa isolat S311A dan H2232 memiliki metabolit sekunder yang mampu menghasilkan antifungi. Mekanisme pembentukan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat S311A dan H2232 diduga dibentuk pada saat terjadi cekaman nutrisi atau miskin nutrisi. Bibb (2005), Van dan Mc. Dowall (2011) menyatakan bahwa senyawa metabolit sekunder mikroba filamentous dibentuk pada saat mengalami cekaman atau kondisi miskin nutrisi. Menurut Mendez *et al* (1985) dan Migueles *et al* (1999) kondisi ini terjadi pada fase miselium substrat berdefisiensi membentuk struktur hifa sporogenik (hifa reproduktif) kemudian membentuk miselium aerial, lalu mengalami degradasi autolitik yang terprogram oleh PCD (*Programmed Cell Death*) atau biasa disebut dengan peristiwa Apoptosis. Peristiwa inilah yang menyebabkan terjadinya sistem pertahanan nutrisi dengan memproduksi senyawa metabolit sekunder yang dikeluarkan di sekitar sel, sehingga dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroba pesaing. Mikroba yang di uji atau mikroba pesaing dalam penelitian ini ialah jamur anggota spesies *Malassezia* sp (M1).

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini ialah *ketokenazole* 2%. Menurut Brunton *et al*. (2010) Ketokenazol merupakan obat antifungi turunan dari azol yang baik digunakan untuk menghambat pertumbuhan fungi. Mekanisme kerja obat ini menurut Katzung *et al*. (2011) yakni dengan menghambat biosintesis ergosterol pada membran sitoplasma sel fungi dan

menyebabkan akumulasi metilsterol. Metilsterol ini dapat mengganggu rantai asil fosfolipid, merusak fungsi sistem enzim pada membran sel, sehingga menghambat pertumbuhan jamur.

Beberapa spesies dari genus *Microbispora* dan genus *Streptomyces* diketahui mampu menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat antifungi. Menurut Savi *et al.*, (2014) *Microbispora* sp. LGMB259 menghasilkan metabolit sekunder yang mampu melawan fungi *Saccharomyces cerevisiae* ATCC209508, *Phyllosticta citricarpa* LGMB06 dan *Colletotrichum gloeosporioides* FDCD83. Patil *et al.*, pada tahun 2013 juga melaporkan *Microbispora* sp. V2 mampu menghambat fungsi patogen yakni *Sclerotium rolfsii* dengan tingkat penghambat 91,43%. Selain genus *Microbispora*, anggota genus *Streptomyces* juga dikenal sebagai agen penghasil antifungi. Barka *et al*. (2016) merangkum sekitar 21 jenis spesies yang memproduksi senyawa antifungi antara lain, *Streptomyces anulatus* yang memproduksi *Actinomycins*, *Streptomyces griseochromogenes* memproduksi *Blasticidin*, *Streptomyces griseus* memproduksi *Candicidin*, *Streptomyces venezuelae* memproduksi *Chloramphenicol* dan lain lain. Beberapa ilmuwan seperti Kumar *et al*. (2014) dan Balachandran *et al*. (2015) juga telah menemukan kemampuan genus *Streptomyces* dalam menghambat fungsi genus *Malassezia*, khususnya pada spesies *Malassezia pachydermatis*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menghaturkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Kepala laboratorium Mikrobiologi LIPI Dr. Atit kanti M.sc, dan pembimbing di laboratorium mikrobiologi Bidang kesehatan Dra. Titin yulinery.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, Rifqi, Aulia, Ryandini, Dini & Kusharyati Dyah Fitri, 2017, 'Potensi Aktinomisetes Asal Tanah Perakaran Mangrove Segara Anakan Cilacap Sebagai Penghasil Anti-jamur Terhadap *Candida albicans*', *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, Vol. 2, hal 39-44.
- Atlas, Ronald, M, 2010, *Hand Book of Mikrobiological Media Fourth Edition*, ASM press, Washington D.C.

- Ayari, A, Morakchi, H, & Djamila, K.G, 2016, 'Isolation of Antifungal Activity of Novel Marine Actinomycete, Streptomyces sp. AA13 Isolated from Sediments of Lake Ougeria (Algeria) Against Candida albicans', *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 10, No.6, hal 156-171.
- Barka, E, A, Parul, V, Lisa S, Nathalie G, V, Cedric, J, Hans P, K, Christophe, C, Yder, O & Gilles P V W, 2016, 'Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 80, No.1.
- Berdy, J, 2005, 'Bioactive microbial metabolites', *Journal Antibiotic*, vol. 58, hal. 1-26.
- Bibb, MJ, 2005, 'Regulation of secondary metabolism in Streptomyces', *Curr Opin Microbiol* Vol. 8, hal 208-215.
- Brooks, G,F, Carroll, K, C, Butel, J, S, & Morse, S, A, 2007, *Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology 24th ed*, The McGraw-Hill Companies, Inc, United States of America.
- Deepa S K, Kanimozhi & A, Panneerselvam, 2013, '16S rDNA Phylogenetic Analysis of Actinomycetes Isolated from Marine Environment Associated with Antimicrobial Activities', *journal for drugs and medicines*, Vol.5, No 2.
- Depkes RI, 1995, *Farmakope Indonesia (Edisi ke 4)*, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Dewi, A, K, 2014, 'Aktivitas Antifungi Isolat Actinomycetes dari Sampel Pasir Gunung Merapi dengan Lama Fermentasi yang Berbeda Terhadap Candida albicans', *Skripsi*, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan UMS, Surakarta.
- Endo, A, & Misato, T, 1969, 'Polyoxin D, a competitive inhibitor of UDP-N-acetylglucosamine: chitin N-acetylglucosaminyltransferase in Neuro-spora crassa', *Biochem Biophys Res Commun* 37 : 718-722, [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(69\)90870-5](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(69)90870-5).
- Gunawan, A, W, Dharmaputra, O, S, & Rahayu, G, 2004, *Cendawan dalam Praktik Laboratorium*, IPB Press, Bogor.
- Gupta, A, K, R, Batra, R, Bluhm, T, Boekhout, T, L, & Dawson, Jr, 2004, 'Skin diseases associated with Malassezia species', *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 51, no. 5, hal 785-798.
- Isono, K, Nagatsu, J, Kawashima, Y & Suzuki, S, 1965, 'Studies on polyoxins, antifungal antibiotics, Part I Isolation and characterization of polyoxins A and B', *Agric Biol Chem*, Tokyo, vol 29, hal, 848-854.
- Manalu, Jerliman, Rahmawati, & Novik, Nurhidayat, 2019, 'Aktivitas Antifungi Isolat Actinomycetes dari Sumber Air Panas Ai Sipatn Lotup Sanggau Terhadap Isolat Hortaea werneckii (T1)', *Protobiont*, Vol. 8 (1) , hal. 69 – 77.
- Katzung, B, G, Susan, B, M, & Anthony JT, 2011, *Basic and clinical pharmacology Ed 12th*, McGraw-Hill, California.
- Kumar, P, S, Duraiandiyar, V, & S, Ignacimuthu, 2014, 'Isolation Screening And Partial Purification Antimicrobial Antibiotik From Soil Streptomyces'. *Kaohsiun Journal Of Medical Sciences*, Vol 10, hal 1-12.
- Mendez, C, Braña, AF, Manzanal, MB & Hardisson, C, 1985, 'Role of substrate mycelium in colony development in Streptomyces', *Can J Microbiol* 31:446-450, <http://dx.doi.org/10.1139/m85-083>.
- Migueluez, E, M, Hardisson, C, & Manzanal, MB, 1999, 'Hyphal death during colony development in Streptomyces antibioticus: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote', *Journal Cell Bio*, 145:515-525, <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.145.3>.
- Ong, C,w, Chan, Y,S, Khoo, K,S, Ong, H,C & Sit, N,W, 2018, 'Antifungal and Cytotoxic Activities Of Extracts Obtained From Underutilised Edible Tropical Fruits', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Vol.1, No.6, hal. 313-319.
- Patel, M, G, Horan, A, C, Marquez, J, A, & Waitz, J A, 1990, 'Antifungal triacetylene dioxolone from Microbispora sp. SCC1438 ATCC 53620', *U.S. Patent* 4, 956, 383.
- Savi, D, C, Khaled, A, S, Nathalia, V, Larissa V, Ponomareva, Yvelise, M, P, Jon S, T, Chirlei, G, & Juergen, R, 2015, 'Microbispora sp. LGMB259 Endophytic Actinomycete Isolated from Vochysia divergens (Pantanal, Brazil) Producing b-Carbolines and Indoles with Biological Activity', *Curr Microbiol* 70:345-354.

Van, Wezel, G, P, & McDowall, K,J, 2011, 'The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*', *new links and experimental advances*, Nat Prod Rep 28: 1311 – 1333, <http://dx.doi.org/10.1039/c1np00003a>.

Waluyo, Lud, 2008, *Petunjuk Praktek Mikrobiologi*, UMM Press, Malang.