

OPTIMASI PERTUMBUHAN ISOLAT ACTINOMYCETES KODE AL35 BERDASARKAN MEDIA PERTUMBUHAN, pH DAN WAKTU PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER

GROWTH OPTIMIZATION OF AL35 CODE ACTINOMYCETES ISOLATE BASED ON GROWTH MEDIA, pH AND SECONDARY METABOLITE PRODUCTION

Sabrina Wulandari¹, Rony Setianto^{*2}, Fatia Rizki Nuraini^{*3}

Sasasabrina5454@gmail.com, ronysetianto4@gmail.com, fatianuraini88@gmail.com

Prodi Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan

Prodi Farmasi, Stikes Rajekwesi

ABSTRAK

Actinomycetes merupakan salah satu mikroorganisme yang dapat menghasilkan metabolit sekunder antara lain antibiotik. Isolat actinomycetes AL35 telah diisolasi dari rizosfer tanaman padi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui profil optimasi pertumbuhan isolate actinomycetes AL35 berdasarkan metode pertumbuhan, pH dan waktu produksi metabolit sekunder. Metode yang digunakan adalah sumuran yang bertujuan untuk mengetahui waktu pemanenan metabolit sekunder berdasarkan waktu inkubasinya, pH dan media pertumbuhan isolate. Parameter penelitian ini adalah zona hambat disekitar sumuran. Penentuan profil optimasi waktu produksi metabolit sekunder dan pH yaitu dengan membuat grafik hubungan antara diameter zona hambat dan waktu inkubasi, untuk profil pH dibuat grafik hubungan antara zona hambat dan rentang pH, sedangkan optimasi pertumbuhan isolate hanya dilihat pertumbuhan isolatnya berdasarkan *miselium* udara dan vegetatif. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa cairan kultur isolat Actinomycetes kode AL35 dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Pemanenan antibiotik yang optimal dapat dilakukan pada inkubasi hari ke-2 dan pH 9 untuk *Staphylococcus aureus* serta pH 6 untuk *Escherichia coli*. urutan media yang dapat menyuburkan pertumbuhan isolat Actinomycetes kode AL35 adalah media ISP4, ISP5, SNA, ISP2, ISP3 dan ISP1.

Kata kunci: Mikroorganisme; Actinomycetes; Isolat Actinomycetes AL35

ABSTRACT

*Actinomycetes is one of the microorganisms that can produce secondary metabolites widely use as antibiotics. Actinomycetes AL35 isolates have been isolated from the rhizosphere of rice plants. The purpose of this study is to determine the profile of Actinomycetes AL35 isolates growth optimization based growth media, pH and time of production of secondary metabolites. The method used in this study is wells method, which aims to determine the time of harvesting secondary metabolites based on the incubation time, pH and growth media isolates. The parameters used in this study was the inhibition zones around the wells. Determination optimization profiles of secondary metabolites production time and pH is to create a graphic link between inhibition zone diameter and incubation time, for pH profiles graphed the relationship between inhibition zone and pH range, while the optimization of the growth of isolates only visible mycelia growth of isolates based on aerial and vegetative mycelium. The result showed that actinomycetes code AL35 isolates could inhibit the growth of the *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Optimally harvesting of antibiotic can be done on the on 2nd day of incubation and at pH 9 for *Staphylococcus aureus* as well as at pH 6 for *Escherichia coli*. Media sequences that can support an abundance of Actinomycetes AL35 was ISP4, ISP5, SNA, ISP2, ISP3 and ISP1 media.*

Keywords: Microorganisms; Actinomycetes; Actinomycetes Isolates AL35

I. Pendahuluan

Infeksi merupakan penyakit menular disebabkan oleh berbagai mikroorganisme seperti virus, bakteri, jamur, dan protozoa. Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. (Isnaini, 2010)

Bakteri tersebut sering menyebabkan infeksi saluran kemih, diare dan penyakit lain. Penyakit infeksi tersebut diatasi dengan antibiotik tetapi sering terkendala oleh adanya faktor resistensi bakteri terhadap antibiotik yang telah ada. Oleh sebab itu sangat diperlukan eksplorasi galur-galur mikroba baru yang menghasilkan antibiotik dengan potensi lebih tinggi dalam mematikan penyebab penyakit, misalnya

dari rizosfer (Rahayu, 2007). Tanah rizosfer adalah tanah yang menempel pada perakaran tanaman yang banyak terdapat bakteri, jamur, dan Actinomycetes dibanding tanah non rizosfer. Banyak penghuni tanah tersebut merupakan sumber antibiotik (Rao, 1994). Penghasil antibiotik terbesar adalah Actinomycetes (65%), diikuti bakteri bukan Actinomycetes (11%), fungi (23%), dan mikroalga (1%). (Hayakawa, 2003).

Actinomycetes merupakan mikroba tanah yang mampu mensintesis metabolit sekunder yang dihasilkan berbeda-beda secara biologi seperti antibiotik, herbisida, pestisida, antiparasit dan enzyme seperti selulose dan xylanase yang sering digunakan dalam bioremediasi sampah (Oskay et al., 2004). Apriliasari (2012) telah mengisolasi Actinomycetes dari tanah sawah padi yang berada di desa Pilahan Kidul, Rejowinangun, Kecamatan Kotagede, Yogyakarta. Dari penelitian tersebut ditemukan 12 isolat yang memiliki aktivitas menghambat bakteri uji, salah satunya adalah isolat AL35.

Permasalahan yang timbul dari Actinomycetes kode AL35 belum diketahui profil optimasi pertumbuhan isolat berdasarkan media, pH dan waktu produksi metabolit sekunder. Actinomycetes AL35 dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, menggambarkan profil optimasi waktu produksi metabolit sekunder dan pH serta mengetahui pertumbuhan pada media ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP5 dan SNA sebagai penghasil antibiotik

II. METODE

A. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu isolat Actinomycetes kode AL35 dengan menggunakan media cair *Starch Nitrat Broth* (SNB) dari tanah sawah padi yang berada di desa Pilahan Kidul, Rejowinangun Kecamatan Kotagede, Yogyakarta.

Mikroorganisme uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Bahan mikroorganisme uji adalah media *Brain Heart Infusion* (BHI), media Mueller Hinton dan media TSA. Alat yang digunakan *cork borer*, *stirrer*, autoclave, *blue tip*, tabung eppendorf, ruangan LAF dan alat-alat gelas. (Apriliasari, 2012).

B. Pembuatan Kultur Starter dan Uji

Pembuatan starter dilakukan dengan cara memasukkan seperempat plate isolat Actinomycetes kode AL35 ke dalam Erlenmeyer yang berisi media SNB sebanyak 50 ml yang sudah disterilkan. Kemudian di inkubasi pada suhu kamar selama 5 hari dengan pengadukan menggunakan magnetic stirrer. Preparasi kultur uji dilakukan dengan cara memasukkan 10 ml starter ke dalam Erlenmeyer yang berisi 100 ml media SNB yang sudah disterilkan. Kemudian media yang sudah berisi 10 ml diinkubasi selama 14 hari dengan pengadukan magnetic stirrer. Selama inkubasi setiap hari diambil 1 ml kultur dimasukkan dalam tabung eppendorf dan disimpan dalam freezer. Hasil kultur uji diambil selama 14 hari dikeluarkan dari freezer dan disimpan di kulkas sampai mencair. Setelah mencair kultur uji yang disimpan dalam eppendorf di sentrifuse, supernatant dimasukkan dalam tabung eppendorf yang baru dan disimpan dalam freezer (cairan kultur).

C. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 dalam biakan murni diambil 1 ose steril kemudian dimasukkan secara aseptis kedalam tabung reaksi steril yang sudah berisi 1 ml BHI (*Brain Heart Infusion*) diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, selanjutnya digoreskan pada media agar TSA. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah bakteri tumbuh disimpan pada suhu 4°C sebagai stok bakteri. Satu ose dari stok bakteri disuspensikan ke dalam media cair BHI 1 ml diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian diambil 100 µl dimasukkan ke dalam tabung berisi 1 ml BHI lalu diinkubasi selama 3-5 jam pada suhu 37°C

D. Uji Aktivitas Cairan Kultur Isolat Actinomycetes kode AL35 terhadap Mikroorganisme

Uji aktivitas cairan kultur isolate kode AL35 terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan petri yang diolesi suspensi bakteri yang akan diuji, kemudian dibuat sumuran menggunakan cork borer sesuai dengan pola yang dibuat. Setiap sumuran diisi dengan cairan kultur dari isolate kode AL35 kurang lebih 75 µl dan dimasukkan kulkas selama 2 jam, diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Untuk melihat aktivitas dari cairan kultur isolate kode AL35 ditunjukkan dengan adanya zona jernih disekitar sumuran.

E. Optimasi Waktu Produksi Metabolit Sekunder isolat Actinomycetes Kode AL35

Pada uji ini yang akan diuji adalah bakteri yang pertumbuhannya dapat dihambat oleh cairan kultur isolat Actinomycetes kode AL35 dan sebelumnya telah dibuat suspensi bakteri. Sebelumnya petri yang berisi Mueller Hinton diberi pola dibagian bawahnya dan media diolesi dengan suspensi bakteri yang akan diuji dengan cara membuat sumuran dengan cork borer diameter 0,6 cm sesuai pola yang

dibuat. Setiap sumuran diisi dengan cairan kultur kurang lebih 75 µl sesuai dengan urutan harinya dan dimasukkan kulkas selama 2 jam, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah 24 jam dilihat zona jernihnya dan diukur diameter zona jernihnya. Untuk mengetahui produksi sekunder dibuat hubungan antara waktu dengan diameter zona hambat.

F.Optimasi pH Produksi Metabolit Sekunder isolat Actinomycetes Kode AL35

Pengujian ini dilakukan dengan cara memasukkan 2,5 ml starter dari ¼ plate kode Actinomycetes AL35 ke dalam Erlenmeyer berisi 25 ml media SNB yang telah disterilkan dan diatur pH 5 sampai 10, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 3 hari dengan penggojogan. Media Mueller Hinton dibuat sumuran dengan cork burer sebanyak 6 sumuran. Kemudian setiap lubang sumuran diisi cairan kultur kurang lebih sebanyak 75 µl dan dimasukkan kulkas selama 2 jam, diinkubasi suhu 37°C selama 18-24 jam. Pengamatan dilakukan dengan cara melihat zona jernih dan diukur diameter zona jernihnya. Untuk mengetahui optimasi pH produksi metabolit sekunde dibuat hubungan antara pH dengan diameter zona hambat.

G.Optimasi Media Pertumbuhan Isolat Actinomycetes Kode AL35

Isolat Actinomycetes kode AL35 ditumbuhkan dengan cara digoreskan pada media ISP 1 (*tryptone-yeast extract broth*), ISP 2 (*yeast extract-malt extract agar*), ISP3 (*oatmeal agar*), ISP 4 (*inorganic salts-starch agar*), ISP 5 (*Glycerol-asparagine agar*) dan SNA (*starch Nitrat Agar*) selama 10 hari pada suhu kamar. Pengamatan warna miselium dengan mengamati secara visual *miselium* udara dan vegetative, diamati dengan cara membalikkan petri untuk melihat pembentukan *reverse side pigment*. Pengamatan pigmen terlarut dilakukan dengan melihat adanya pembentukan warna terdifusi media.

III.HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pembuatan Kultur Starter dan Uji

Pada penelitian ini menggunakan media SNB karena media ini mempunyai kandungan karbon dan mineral.Sumber karbon media SNB berasal dari soluble starch yang mengandung jumlah C yang beragam dari pati dan gliserol (Ali, 2009). Hasil kultur starter terdapat perbedaan kenampakan pada hari ketiga dan kelima. Pada hari ketiga jumlah pellet masih sedikit dan warna media masih terlihat bening, sedangkan pada hari ke lima jumlah pellet sudah semakin banyak dan warna media menjadi kecoklatan.

Hal ini menunjukkan adanya pertumbuhan Actinomycetes dengan jumlah yang semakin banyak dan adanya perubahan warna pada media setelah inkubasi pada hari ke lima.Hasil kultur uji pada hari kedua media SNB berwarna coklat muda dan sudah terlihat keruh, serta terdapat butiran – butiran halus yang tersebar di dasar media.

Hal ini menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Perubahan warna terjadi karena Actinomycetes mengeluarkan pigmen warna yang mampu berdifusi maupun tidak pada media (Ambarwati and Gama, 2009). Perubahan warna diikuti oleh bertambahnya jumlah pellet dari hari ke hari, dan jumlah pellet konstan setelah hari ke Sembilan. Hal ini disebabkan karena berkurangnya nutrisi di dalam media, maka akan berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri yaitu pertumbuhannya akan menjadi konstan. Kekurangan nutrisi, akumulasi produk sisa, dan perubahan pH yang bersifat toksik bagi sel dianggap menjadi penyebab berhentinya pertumbuhan sel bakteri. (Radji, 2010)

B.Uji Aktivitas Cairan Kultur Isolat Actinomycetes Kode AL35 Terhadap Mikroorganisme

Berdasarkan hasil uji aktivitas cairan kultur isolat kode AL35 menunjukkan bahwa mampu menghambat pertumbuhan zona hambat radikal. Pengujian menggunakan metode sumuran, sampel akan langsung berdifusi ke dalam media agar, serta kultur uji ditumbuhkan terlebih dahulu, sehingga ada kesempatan pada Actinomycetes untuk mensintesis metabolit sekunder sebagai antibiotik yang lebih banyak.

Uji aktivitas cairan kultur isolat Actinomycetes kode AL35 terhadap *Staphylococcus aureus* memiliki diameter zona hambat sebesar 26,5 mm (termasuk lubang sumuran), hasil replikasi sebesar 25 mm (termasuk lubang sumuran) sedangkan uji pada *Eschericia coli* diameter zona hambat sebesar 20,75 mm (termasuk lubang sumuran). Kedua diameter zona hambat termasuk dalam kategori aktivitas penghambatan sangat kuat.

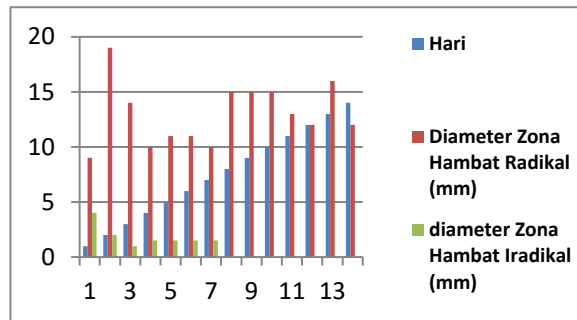
C.Optimasi Waktu Produksi Metabolit Sekunder isolat Actinomycetes Kode AL35

Hasil pengukuran diameter zona hambat radikal terhadap *Staphylococcus aureus* menunjukkan pada hari ke-1 cairan kultur isolat Actinomycetes kode AL35 sudah menghasilkan metabolit sekunder sebagai penghasil antibiotik dengan zona hambat sebesar 9 mm, diameter pada hari ke-2 menghasilkan ukuran yang terbesar dari pada diameter hari-hari berikutnya, dan mulai konstan hari ke-8.

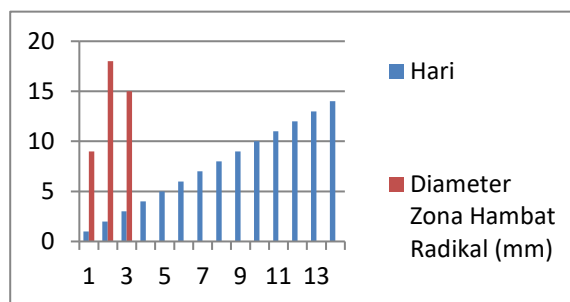
Dari data diatas dapat diketahui bahwa pada hari pertama isolate actinomycetes kode AL-35 sudah mampu untuk memproduksi metabolit sekunder walaupun pada diameter zona hambatnya terdapat

zona hambat iradikal, kondisi ini menunjukkan pada awal inkubasi isolat sudah berada pada fase stasioner, kondisi ini menunjukkan bahwa isolate membutuhkan waktu singkat untuk beradaptasi dengan medium fermentasi yang baru.

Inkubasi hari ke-2 merupakan puncak terbentuknya metabolit sekunder yang ditandai dengan diameter zona hambat yang paling besar dan zona hambat iradikal yang semakin kecil. Pada inkubasi selanjutnya diameter zona hambat mengalami fluktuasi disebabkan senyawa antibiotic terbentuk pada awal dan akhir inkubasi. Gambar profil optimasi waktu produksi metabolit sekunder terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dapat dilihat pada gambar 1 dan gambar 2 dibawah ini



Gambar 1. Profil optimasi waktu produksi metabolit sekunder terhadap *Staphylococcus aureus*

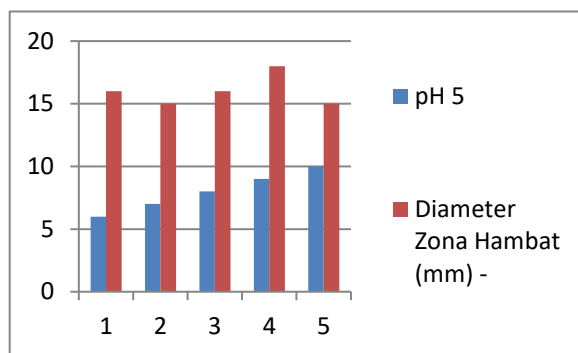


Gambar 2. Profil optimasi waktu produksi metabolit sekunder terhadap *Escherichia coli*

Waktu pemanenan antibiotik yang optimal adalah pada hari ke-2 dan ke-13 karena pada waktu itu diameter zona hambat yang terbesar dari hari yang lainnya. Hasil pengukuran diameter zona hambat radikal terhadap *Escherichia coli* menunjukkan pada hari pertama inkubasi isolat actinomycetes kode AL35 mampu menghasilkan metabolit sekunder berupa antibiotik, namun pada hari ke-2 menghasilkan diameter zona hambat yang optimal sebesar 18 mm. Pada hari ke-2 inkubasi merupakan waktu optimum untuk pemanenan antibiotik.

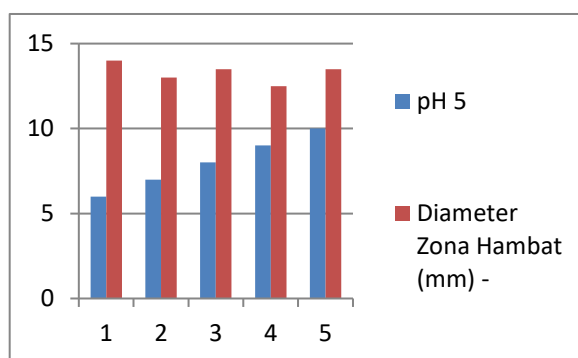
D.Optimasi pH Produksi Metabolit Sekunder isolat Actinomycetes Kode AL35

Pertumbuhan isolat Actinomycetes kode AL35 pada pH 5–10 digunakan untuk menguji aktivitas anti mikroba guna mengetahui stabilitas penghambatan pada kondisi asam, netral, dan basa. Hasil uji menunjukkan bahwa pada pH 9 merupakan pH yang optimal untuk penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus*, diameter zona hambat sebesar 18 mm. Profil optimasi pH *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Profil optimasi pH terhadap *Staphylococcus aureus*

Uji terhadap *Escherichia coli* menunjukkan bahwa pH 6 adalah pH optimum untuk penghambatan, diameter zona hambat sebesar 14 mm. Perbedaan pH optimum terjadi karena setiap isolate menghasilkan beberapa antimikroba yang mempunyai pH optimal berbeda satu dengan yang lain. Aktivitas penghambatan mengalami penurunan ketika ada perubahan pH. Perubahan tersebut mempunyai pengaruh berbeda terhadap aktivitas penghambatan pada bakteri satu dengan yang lainnya. Augustine *et al.*, (2005) juga menyatakan bahwa perubahan pH pada media produksi merangsang senyawa baru yang berpengaruh pada produksi antibiotik. Profil optimasi pH *Escherichia coli* dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Profil optimasi pH terhadap *Escherichia coli*

E.Optimasi Media Pertumbuhan Isolat Actinomycetes Kode AL35

Uji ini dilakukan optimasi pertumbuhan isolate pada beberapa media yaitu ISP 1, ISP 2, ISP 3, ISP 4, ISP 5, dan SNA. Dari hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada media ISP 4 pertumbuhan isolate actinomycetes kode AL35 lebih subur disbanding dengan media yang lainnya. Media ISP4 sebenarnya adalah media yang miskin akan nutrisi, banyak mengandung mineral dan pati sebagai sumber karbonnya.

Pati pada media ISP 4 terlebih dahulu di degradasi menjadi senyawa yang lebih pendek rantainya dengan menghasilkan enzim amylase yang bertujuan untuk merombak pati menjadi karbon yang lebih tersedia. Pati merupakan polimer kompleks terdiri atas 20 % amilosa yang dapat larut dan 80 % amilopektin yang sukar larut. Amilosa terpecah menjadi D–glukosa dan maltose. Amilopektin dihidrolisis menjadi dekstrin, maltose dan isomaltosa baru terbentuk D–glukosa. Isolat actinomycetes kode AL35 mampu bertahan untuk memecah pati menjadi sumber karbon yang lebih sederhana yang selanjutnya digunakan untuk pertumbuhannya. Mineral – mineral yang terkandung dalam media juga mampu untuk menyuplai energy untuk pertumbuhan isolat.

IV.KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian dapat diambil kesimpulan bahwa cairan kultur isolate Actinomycetes AL35 mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Berdasarkan uji aktivitas pemanenan antibiotik yang optimal dapat dilakukan pada inkubasi hari ke dua. pH optimum untuk penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* pada pH 9 dan *Escherichia coli* pada pH 6. Media

yang dapat mempengaruhi pertumbuhan sehingga menjadi subur adalah ISP4 – ISP5 – SNA – ISP2 – ISP3 – ISP1.

V.SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut sequencing DNA untuk mengetahui strain dari isolat Actinomycetes kode AL35 dan mengoptimasi waktu produksi metabolit sekunder dengan memperhatikan suhu dan media fermentasi

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya disampaikan penulis kepada pembimbing dan teman yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, Alimuddin. 2009. *Skrining dan Karakteristik Parsial Senyawa Antifungi dari Actinomycetes Asal Limbah Padat Sagu Terdekomposisi* : Berk, Panel. Hayati : 14 (219-225).
- Ambarwati dan Gama T, Azizah. 2009. *Isolasi Actinomycetes dari Tanah Sawah Sebagai.Penghasil Antibiotik. Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*, Vol.10, No.2 : 101-111.LPPM UMS.
- Apriliasari, 2012, *Isolasi Actinomycetes Penghasil Antibiotik Terhadap Escherichia coli dan Staphylococcus aureus Dari Tanah Sawah Kota Gede, Yogyakarta.*, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Augustine SK, Bhavsar SP, Kapadis BP, 2005. *Production of growthdependent metabolit active agains dermatophytes by Streptomyces rochei* Ak 39. *Indian Journal of Medicine* 121 : 164-170
- Hayakawa M., 2003, *Selective Isolation of Rare Actinomycetes Genera Using Pretreatment Techniques*, Ipek Kurtboke (Ed.). University of The Sunshine Coast, Faculty of Science. Queensland. Pp 58-81.
- Isnaini, Salihah N. 2010 *Isolasi Rare Actinomycetes dari Pasir Pantai Depok Daerah Istimewa Yogyakarta yang Berpotensi antibiotik terhadap Propionibacterium acne*. Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Oskay M, Tamer U, Azeri C. 2004. Antibacterial activity of some Actinomycetes isolate from farming of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 3 (9):441-446.
- Radji, M., 2010, *Buku Ajar Mikrobiologi Paduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*, Penerbit Buku Kedokteran ECG, Jakarta.
- Rahayu, Triastuti., 2007, *Streptomyces Sebagai Sumber Antibiotik Baru di Indonesia*, *Prosiding Seminar Nasional Biologi*, <http://jurnal.fkip.uns.ac.is/index.php/prosbio/articel/view/991/644>, diakses tanggal 18 April 2013.
- Rao, N. S. S., 1994, *Mikrobiologi Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*, diterjemahkan oleh Susilo, H., 38-39,63, UI Press, Jakarta