

AKTIFITAS ANTIBAKTERI ACTINOMYCETES YANG DIISOLASI DARI TPA PUTRI CEMPO MOJOSONGO SURAKARTA

Antibacterial Activity of Actinomycetes Isolated From Putri Cempo Landfil Mojosongo Surakarta

Umi Fatmawati, Slamet Santosa, Yudi Rinanto

Prodi Pendidikan Biologi Jurusan PMIPA FKIP Universitas Sebelas Maret Surakarta

E-mail: umifatmawati84@yahoo.com

Abstract- Actinomycetes are procaryotic organisms which are found in many habitats, such as: land, water, and plant tissue. They have numerous function for the production of antibiotics and diversity benders to pest and disease in plants. There were many researchers explored new isolates that produces a compound of a novel metabolites. One of them is screening actinomycetes isolated from the soil samples in Putri Cempo Landfill in Surakarta. The isolates obtained by testing the bacterial activity with well diffusion methods on the Gliserol-Yeast Extract media against four pathogenic bacteria, namely: *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. In this research obtained 10 isolates of actinomycetes, three of them have the ability to inhibit bacterial growth of *R. solanacearum*, one isolate having the power to against *Bacillus subtilis*, one isolates having the power of an abstruent against *Staphylococcus aureus*, and two isolates capale in inhibiting the growth of *E. coli*. The antibacterial activity were characterized from the inhibitory clear zone arround the ccolony of Actinomycetes. These isolates were: PC 12, PC 13 dan PC 15. The inhibitory clear zone were measured showed the power spectrum of the third of the isolates are belong to the broad spectrum due to their diameter of the clear zone is more than 8 mm.

Keywords: Actinomycetes, antibacterial activity, Putri Cempo Landfill, Streptomyces sp, clear zone

PENDAHULUAN

Actinomycetes sangat bermanfaat di bidang farmasi karena potensinya untuk menghasilkan metabolit sekunder dengan struktur kimiawi yang beranekaragam beserta aktivitas biologinya. Ribuan senyawa telah diisolasi dan dikarakterisasi, dan sepuluh persennya telah dikembangkan menjadi obat untuk mengobati berbagai macam penyakit pada manusia. Pencarian strain baru Actinomycetes terus dilakukan, hingga menghasilkan penemuan produk senyawa alami esensial yang digunakan untuk pengobatan (Wang. et.al, 1999).

Actinomycetes adalah gram positif, hidup bebas, bakteri saprofit, terdistribusi secara luas di tanah, air, dan membentuk kolonisasi pada jaringan tanaman atau endophit, juga penghasil berbagai senyawa aktif dari hasil metabolisme sekunder. Karakteristik morfologi dari prokaryot ini

menyerupai fungi karena memiliki hifa atau filamen namun tidak bersekat, namun mikroba ini termasuk dalam golongan bakteri karena bersifat prokaryot dan memiliki kandungan peptidoglikan pada dinding selnya. Dari 22.500 senyawa aktif yang diperoleh dari mikroba, sebanyak 45% diproduksi oleh Actinomycetes, 38% oleh jamur, dan 17% oleh bakteri uniseluler (Berdy, 2005; Rahman. et.al. 2011). Sebagian besar spesies Actinomycetes termasuk dalam genus Streptomyces yaitu sebanyak 50% dari total populasi aktinomisetes tanah dan terkenal dalam memproduksi berbagai metabolit sekunder termasuk antibiotik, imunomodulator, antikanker obat, obat antivirus, herbisida, dan insektisida yang bermanfaat dalam bidang kedokteran maupun bidang pertanian (Oskay. Et.al. 2004; Berdy, 2005).



Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Putri Cempo Mojosoongo Surakarta merupakan tempat pembuangan akhir terbesar di Kota Surakarta dengan luas wilayah 17 hektar dan terletak sejauh 15 km dari pusat kota, dan sudah ada sejak tahun 1986. Jenis sampah yang dibuang di TPA Putri Cempo berupa sampah organik maupun anorganik. Sampah organik berupa sampah domestik yang berupa sampah pertamanan, sisa sayuran, daun pisang, dan kulit buah. Sedangkan sampah anorganik yang dominan adalah berupa plastik, kertas, karet, kain dan gelas. Selain itu, banyak ditemukan puluhan hewan ternak berupa sapi dan kambing yang mencari makan di lokasi sekitar TPA Putri Cempo.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi Actinomycetes yang diperoleh dari sampel tanah di TPA Putri Cempo Surakarta. Isolata yang diperoleh akan diuji kemampuan daya hambatnya terhadap pertumbuhan bakteri patogen, diantaranya: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Ralstonia solanacearum* serta *E. coli*. Harapan dari hasil penelitian ini adalah diperoleh isolat yang mampu menghasilkan senyawa antibiotik potensial yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen, sehingga dapat dikembangkan sebagai bahan baku pembuatan antibiotik terbaru.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya adalah : sampel tanah yang diambil dari TPA Putri Cempo Mojosoongo Surakarta, Media Starch-casein agar (Pati 10 g, Casein- 0.3 g, KNO₃- 2 g, K₂HPO₄-2 g, MgSO₄- 0.05 g, CaCO₃- 0.02 g, FeSO₄- 0.01 g, Agar- 18 g, Distilled water- 1 L, pH 7± 0.1) (George.et.al. 2012), Media Gliserol-Yeast Ekstrak, Thiampenicol,

Rifampicin, dan Nystatin, Alkohol, Akuades, NaCl, Larutan Iodin, serta mikroorganisme uji meliputi: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Ralstonia solanacearum* serta *E. Coli*.

Metode Penelitian

Sampel tanah diambil dari bagian dasar tanah sedalam 10-15 cm tumpukan sampah organik yang sudah lama sebanyak 5 g. Tanah dimasukkan ke dalam botol plastik dan diberi label lokasi dan waktu pengambilan sampel. Setelah sampai di laboratorium, tanah dikeringkan selama 1 minggu, kemudian dihaluskan dan disaring. Tanah hasil ayakan yang akan digunakan untuk isolasi Actinomycetes (Kumar.et.al.2010).

Untuk setiap sampel dikumpulkan, 1 g tanah itu disuspensikan ke dalam 100 ml air fisiologis (NaCl 8,5g/1) kemudian diinkubasi dalam shaker incubator orbital pada suhu 28 °C dengan kecepatan rotasi 200rpm selama 30 menit. Campuran dibiarkan stabil, dan dilakukan pengenceran berseri hingga 10⁻⁵ dengan menggunakan air steril fisiologi cair dan diaduk dengan menggunakan vortex pada kecepatan maksimum. Masing-masing pengenceran dari 10⁻² hingga 10⁻⁵ diambil sebanyak 0,1ml dan disebarkan secara merata di atas permukaan media Starch-casein agar (Pati 10 g, Casein- 0.3 g, KNO₃- 2 g, K₂HPO₄- 2 g, MgSO₄- 0.05 g, CaCO₃- 0.02 g, FeSO₄- 0.01 g, Agar- 18 g, Distilled water- 1 L, pH 7± 0.1) (George.et.al. 2012). Pada media ditambahkan thiamphenicol 50 ug/ml dan nistatin 100 ug/ml untuk menghambat kontaminasi bakteri dan jamur. Kemudian agar plate diinkubasi pada suhu 28 °C dan 37 °C, dan dipantau setelah 5 hari dan 10 hari masa inkubasi. Setelah inkubasi pada agar plate selama 1 minggu, koloni khas Actinomycetese koloni akan terbentuk dan dapat diamati secara morfologi (Shirling dan Gottlieb, 1966 dalam George. et.al.



2012), dan dimurnikan di plate Agar Starch-casein dengan restreaking dan menginkubasi pada suhu kamar selama 96 jam.

Isolat murni Actinomycetes yang diperoleh kemudian diakarakterisasi secara morfologi dengan menggunakan Bergey's Manual of Determination serta karakterisasi fisiologi dengan mencacu pada Gordon (1966) dalam George. *et.al.* 2012. Morfologi secara umum diamati setelah 5-7 hari pertumbuhan di plate agar dengan teknik *spot*. Pengamatan dilakukan pada bentuk koloni, warna koloni, struktur hifa aerial dan warna hifa substrat, dan diamati di bawah mikroskop. Struktur diamati dibandingkan dengan Manual dan organisme telah diidentifikasi. Uji karakterisasi fisiologi ini dilakukan seperti yang dijelaskan oleh Gordon (1966) dalam George. *et.al.* (2012). Tes Fisiologis termasuk dekomposisi kasein, amilum, gelatin-pepton, serta selulosa.

Skrining awal untuk kegiatan uji aktifitas antibiotik dari isolat adalah dengan menggunakan teknik *well diffusion* pada media agar Gliserol- Yeast-ekstrak (GYE). Sebanyak 1 ml isolat actinomycetes yang ditumbuhkan dalam media Gliserol-

Yeast Ekstrak cair murni disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm selama 3 menit, kemudian diperoleh supernatant yang kemudian diteteskan dalam sumuran Agar GYE yang sudah diswab dengan 4 macam bakteri uji untuk masing-masing petri dish. Media agar GYE kemudian diinkubasi pada 32°C selama 7 hari supaya memungkinkan isolat untuk mengeluarkan antibiotik ke dalam media, dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar sumuran. Kemampuan daya hambat atau aktifitas antibakteri diukur dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk dalam skalamilimeter (Kafur, 2011).

Isolat Actinomycetes yang telah diujicoba untuk mengetahui daya hambat terhadap bakteri *R. solanacearum* dilakukan uji aktivitas antibiotik terhadap berbagai jenis bakteri patogen lain selain *R. solanacearum*. Adapun bakteri uji yang digunakan adalah: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *E.coli* dan *Ralstonia solanacearum*. Penggunaan media agar dan masa inkubasi sama seperti pada langkah di atas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Karakteristik Koloni isolat Actinomycetes yang tumbuh pada Media Starch-Casein

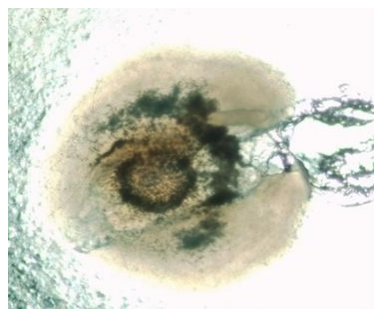
No	Isolat	Karakteristik Koloni				
		Morfologi Koloni	Hifa aerial	Hifa Substrat	Kelompok Streptomyces*	Jumlah (%)
1	PC11	Circular, filamentus	Putih	kuning	<i>Albosporus</i>	18
2	PC12	Circular, filamentus	Putih	coklat	<i>Aureus</i>	50
3	PC13	Circular, filamentus	merah	merah	<i>Roseosporus</i>	10
4	PC14	Circular, filamentus	Abu-abu	Coklat kekuningan	<i>Albosporus</i>	15
5	PC15	Circular, filamentus	Putih	kuning	<i>Aureus</i>	5
6	PC21	Circular, filamentus	Abu-abu	Abu-abu	<i>Griseofucus</i>	44,8
7	PC22	Circular, filamentus	Putih	kuning	<i>Albosporus</i>	6,8
8	PC23	Circular, filamentus	merah	merah	<i>Roseosporus</i>	3,4
9	PC24	Circular, filamentus	Abu-abu	kuning	<i>Aureus</i>	41,38
10	PC25	Circular, filamentus	Putih	pink	<i>Rosesoporus</i>	3,4

*Penggolongan kelompok Streptomyces berdasarkan warna mengacu Tan. *et.al* (2006)

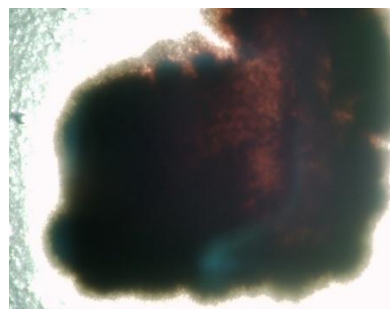


Berdasarkan uraian karakteristik morfologi Tabel 1 di atas, maka isolate Actinomycetes dapat dikelompokkan Streptomyces. Isolat Actinomycetes yang memiliki kemiripan morfologi dengan *Streptomyces arochromogenes* dimasukkan dalam kelompok *Aeris* dimana memiliki warna hifa aerial abu-abu dan hifa substrat kuning atau oranye (Tan, *et.al*, 2006). Sedangkan isolate yang memiliki kemiripan dengan *Streptomyces*

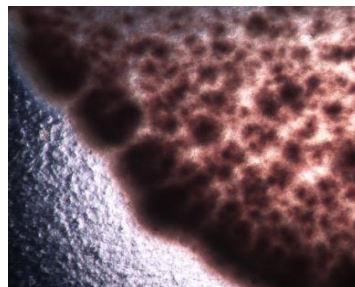
roseocaneus dimasukkan dalam kelompok *Roseosporus* yang memiliki hifa aerial berwarna merah, pink atau oranye, dan hifa substrat berwarna kuning, oranye, atau pink. Pembagian lain seperti *Albosporus* karena memiliki kemiripan dengan morfologi *Streptomyces aburaviensis*, *Griseofucus* mirip dengan *Streptomyces griseus* serta kelompok *Flavus*.



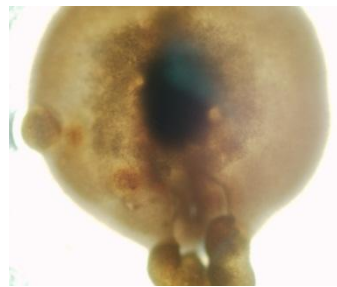
Gambar 1. Isolat warna abu-abu



Gambar 2. Isolat warna merah



Gambar 3. Isolat warna ungu



Gambar 4 Isolat warna kuning

Aktifitas antibakteri dari kultur cair Gliserol-Yeast Ekstrak (GYE) dilakukan dengan menggunakan metode *well diffusion* agar (Kafur, *et.al*. 2011; Khanna.*et.al*.2011) terhadap empat species bakteri: *Ralstonia solanacearum*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus*. Bakteri uji ditumbuhkan pada media LB cair (pH 7) selama 24 jam, setelah itu diinokulasikan pada media GYE dengan metode swab. Sumuran dibuat dengan menggunakan cetakan pipa plastik steril yang berdiameter 5 mm. Sebanyak 50 ul supernatant dari masing-masing isolate Actinomycetes ditambahkan pada masing-masing sumuran

dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Pada akhir pertumbuhan bakteri dapat diamati dengan terbentuknya zona hambat berupa zona bening yang kemudian diukur dengan skala millimeter. Intensitas penghambatan dapat dikelompokkan sebagai berikut: ++/sangat baik = 11-19 mm, +/baik= 2-10 mm, +/-kurang= < 1 mm, dan -/tidak ada aktifitas = 0 mm. Berikut ini adalah data profil aktifitas antibakteri dari 10 isolate Actinomycetes serta kemampuannya dalam menghidrolisis senyawa polimer seperti, casein, pati, selulosa, dan gelatin – pepton.

Tabel 2. Profil Aktifitas Antibakteri Actinomycetes serta Kemampuan Hidrolisisnya Senyawa Komplek

No	Isolat	Daya Hambat (mm)				Hidrolisis			
		<i>R. Solanacearum</i>	<i>B.subtillis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	casein	pati	Celulosa	Gelatin-Pepton
1	PC11	-	-	-	-	+	+	+	+
2	PC12	8	15	8	-	+	+	+	+
3	PC13	14	-	-	-	+	+	+	+
4	PC14	-	-	-	-	+	+	+	+
5	PC15	8	-	12	8	+	+	+	+
6	PC21	-	-	-	8	+	+	+	+
7	PC22	-	-	-	-	+	+	+	+
8	PC23	-	-	-	-	+	+	+	+
9	PC24	-	-	-	-	+	+	+	+
10	PC25	-	-	-	-	+	+	+	+

Berdasarkan tabel 2 di atas dapat dilihat bahwa 4 isolat Actinomycete yang memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen, yaitu: PC12, PC13, PC 15 dan PC 21. Isolat PC12 mampu menghambat pertumbuhan bakteri *R. Solanacearum*, *Bacillus subtilis*, dan *E.coli*. PC15 mampu menghambat pertumbuhan bakteri *R. solanacearum*, *E. coli* dan *Staphylococcus aureus*. Sedangkan PC 13 dan PC 21 masing-masing memiliki kemampuan dalam menghambat *R. solanacearum* dan *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan panjang diameter zona bening, keempat isoat di atas termasuk dalam kemampuan baik dan sangat baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

Semua isolate Actinomycetes yang diisolasi menunjukkan reaksi positif dalam menghidrolisis senyawa polimer, dalam hal ini: pati, casein, selulosa, dan gelatin-pepton. Hal ini ditandai dengan terbentuknya zona degradasi (*clear zone*) disekitar koloni Actinomycetes yang telah ditumbuhkan pada media Starch casein, CMC agar, dan Gelatin-Peptide Agar. Pengamatan zona degradasi pada media Starch Casein dapat dilihat secara langsung setelah 7 hari inkubasi, sedangkan pada media CMC dapat dilihat dengan mewarnai permukaan agar dengan larutan Congo-Red

selama 10 menit, kemudian dicuci dengan larutan NaCl ,1 N kemudian diamati zona beningnya (Kanti, 2005). Pada pengamatan zona degradasi uji proteolitik dapat dilakukan pada media gelatin-pepton Agar dengan meneteskan larutan HgCl₂ 1,5% kemudian diamati zona bening terbentuk

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil isolasi Actinomycetes dari sampel tanah di TPA Putri Cempo Mojosoong Surakarta didapatkan 10 isolat Actinomycetes yang termasuk golongan Streptomyces.
2. Sebanyak 3 isolat mampu menghambat pertumbuhan *R. solanacearum*, dan bakteri uji lain: *B. subtilis*(1 isolat), *E. coli* (2 isolat) dan *S. aureus* (3 isolat). Keseluruhan isolat yang tumbuh bereaksi positif dalam mendegradasi polimer: pati, casein, selulosa dan gelatin.

DAFTAR PUSTAKA

- Berdy. J. 2005. *Bioactive microbial metabolites: a personal view*. Journal of Antibiotics, vol. 58, no. 1, pp. 1–26, 2005.
- George, M, A. Anjumol, G. George and A. A. Mohamed Hatha. 2012. *Distribution and bioactive potential of soil*



- Actinomyceteses from different ecological habitats*. African Journal of Microbiology Research Vol. 6(10), pp. 2265-2271, 16 March, 2012
- Kafur, A & Khan, A.B. 2011. *Isolation of endophytic actinomycetes from Catharanthes roseus (L.) G. Don leaves and their antimicrobial activity*. IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY, Vol. 9, No. 4, October 2011
- Kanti, A.2005. Actinomycetes Selulolitik dari Tanah Hutan Taman Nasional Bukit Duabelas, Jambi. Jurnal Biodiversitas. Vol 6 No 2 hal 85-89 April 2005
- Khanna, M; Solanki, R & Lal, R. 2011. *Selective Isolation of Rare Atinomycetes Producing Novel Antimicrobial Compund*. International Journal of Advanced Biotechnology and Research ISSN 0976-2612, Vol 2, Issue 3, 2011, pp 357-375
- Kumar, N, R K Singh, Mishra S.K, Singh A.K,Pachouri U.C. 2010. *Isolation and screening of soil Actinomyceteses as source of antibiotics active against bacteria*. International Journal of Microbiology Research, ISSN: 0975-5276, Volume 2, Issue 2, 2010, pp-12-16
- Oskay, M, A. Üsame Tamer and Cem Azeri. 2004. *Antibacterial activity of some Actinomyceteses isolated from farming soils of Turkey*. African Journal of Biotechnology Vol. 3 (9), pp. 441-446, September 2004. ISSN 1684-5315 © 2004 Academic Journals
- Rahman, M.A; Islam MZ & Ul Islam, AM. 2011. *Antibacterial Activities of Actinomycetese Isolates Collected from Soils of Rajshahi*, Bangladesh. SAGE-Hindawi Access to Research Biotechnology Research International Volume 2011, Article ID 857925, 6 pages doi:10.4061/2011/857925
- Tan HM; L.X Cao; ZF He; G.J Su; B Lin & S.N Zou. 2006. *Isolation of Endophytic Actinomyceteses from Different Cultivars of Tomato and their Activities Against Ralstonia solanacearum in vitro*. World J Microbiol Biotechnol (2006) 22:1275-1280
- Wang, Y; ZS Zhang; JS Ruan; YM Wang; and SM Ali. 1999. Investigation of actinomycete diversity in the tropical rainforests of Singapore. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (1999) 23, 178-187

