

AKTIVITAS CAIRAN KULTUR 12 ISOLAT *ACTINOMYCETES* TERHADAP BAKTERI RESISTEN

Mulyadi, Nanik Sulistyani

Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
naniksulistyani@gmail.com

ABSTRAK

Latar Belakang : Munculnya berbagai patogen yang multiresisten memicu pencarian antibiotik baru. Secara historis, *Actinomycetes* adalah penghasil terbesar antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas 12 isolat *Actinomycetes* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* 25922

Metode : Penelitian dilakukan dengan mengkultur isolat *Actinomycetes* pada media *Starch Nitrate Broth* pada suhu kamar dengan penggojokan selama 14 hari. Uji aktivitas cairan kultur dilakukan dengan metode difusi sumuran terhadap *S. aureus* dan *E. coli*.

Hasil : Pertumbuhan bakteri *S. aureus* dapat dihambat oleh cairan kultur isolat-isolat *Actinomycetes* yaitu TL, T18, T19, T24, T37, T41, T43, P301, dan P302 berdasarkan munculnya diameter zone hambat pada pertumbuhan *S. aureus*. Adapun pertumbuhan *E. coli* dapat dihambat oleh TL, T18, T19, T24, T25, T41, T43, dan P301. Isolat P104 dan T34 tidak menghambat baik terhadap *S. aureus* maupun *E. coli*.

Kesimpulan : Aktivitas antibakteri dihasilkan oleh isolat TL, T18, T19, T24, T41, T43 dan P301 terhadap *S. aureus* dan *E. coli*, isolat T37 dan P302 terhadap *S. aureus* dan isolat T25 terhadap *E. coli*.

Kata Kunci : *Actinomycetes*, aktivitas, *S. aureus*, *E. coli*

ABSTRACT

Background : The emergence of various multiresistant pathogens to antibiotics stimulate the search of new antibiotics. Historically, actinomycetes are the largest producer of antibiotics. This study aimed to examine the activity of the 12 isolates of *Actinomycetes* against *Staphylococcus aureus* 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922.

Methods : The study was conducted by culturing isolates of *Actinomycetes* on *Starch Nitrate Broth* media at room temperature with shaking for 14 days. The activity of the filtrate was tested against bacteria using diffusion method against *S. aureus* and *E. coli*.

Results : The bacterial growth of *S. aureus* can be inhibited by fluid culture broth of *Actinomycetes* isolates namely TL, T18, T19, T24, T37, T41, T43, P301, and P302 based on the appearance of the growth inhibition zone diameter of *S. aureus*. The growth of *E. coli* can be inhibited by isolates TL, T18, T19, T24, T25, T41, T43, and P301. Isolates P104 and T34 did not inhibit either the *S. aureus* and *E. coli*.

Conclusion : The antibacterial activity was produced by isolates TL, T18, T19, T24, T41, T43 and P301 against *S. aureus* and *E. coli*, by isolates T37 and P302 inhibit only *S. aureus* as well as by isolate T25 inhibits only *E. coli*.

Keywords : *Actinomycetes*, activity, *S. aureus*, *E. coli*

1. PENDAHULUAN

Kejadian resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik menimbulkan masalah besar dalam praktek klinis. Banyak bakteri gram positif dan gram negatif patogen oportunistik yang menjadi resisten terhadap hampir setiap antibiotik yang

digunakan di klinik¹. Multiresistensi menyebabkan penyakit menjadi semakin parah dan bahkan menyebabkan kematian pasien. Oleh karena itu pencarian antibiotik baru merupakan hal yang urgen dan harus dilakukan untuk mengatasi hal tersebut^{2,3,4}.

Selama beberapa dekade, metabolit mikroba menjadi salah satu sumber utama obat baru, khususnya dari *Actinomycetes*⁵. Secara historis, *Actinomycetes* menghasilkan jumlah terbesar calon obat antibiotik baru⁶. Ogunmwonyi et al⁷ menyatakan bahwa sekitar 70% antibiotik yang ditemukan berasal dari *Actinomycetes*.

Salah satu masalah utama yang terkait dengan skrining empiris antibiotik adalah penemuan kembali molekul yang sudah dikenal setelah penelitian panjang dilakukan^{5,8}. Oleh karena itu perlu penerapan pendekatan sistematis. Pendekatan genomik menjadi pilihan solusi.

Pendekatan genomik ini menunjukkan perkembangan luar biasa pada beberapa tahun terakhir^{9,11-15}. Salah satu metode pendekatan genomik ini adalah menganalisis keberagaman isolat *Actinomycetes* melalui analisis sequencing gen 16S rDNA¹⁶⁻²⁰. Perbedaan profil sekuen gen tersebut menunjukkan adanya perbedaan strain mikroba yang dianalisis terhadap strain yang sudah ditemukan di seluruh dunia. Isolat mikroba berpotensi besar menghasilkan metabolit sekunder yang berbeda pula.

Namun demikian, sebelum dilakukan analisis genomik, perlu dianalisis terlebih dahulu kemampuan isolat *Actinomycetes* dalam menghasilkan antibiotik. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat-isolat *actinomycetes* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Eschericia coli* 25922.

2. METODE PENELITIAN

A. Bahan: Media Starch Nitrate Agar, Starch Nitrate Broth, media *Brain Heart Infusion*, media agar Mueller Hinton, isolat bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Eschericia coli* 25922 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Kedokteran UGM

B. Jalannya Penelitian

1. Penyiapan kultur *Actinomycetes* pada media cair
Sejumlah 2 plug koloni *Actinomycetes* dinokulasi pada 50 mL media *Starch-Nitrat Broth* dalam Erlenmeyer 250 mL, lalu diinkubasi pada rotary shaker 200-250 rpm selama 5 hari pada suhu kamar. Hasil kultur 5 hari disebut sebagai kultur starter.
2. Penyiapan metabolit sekunder :
Sebanyak 20 mL kultur starter *Actinomycetes* diinokulasi ke dalam 200 mL SNB dalam Erlenmeyer 500 mL diinkubasi pada shaker suhu kamar 14 hari. Kemudian kultur dipindah ke tabung konikal dan disentrifus 3000 rpm 15 menit. Supernatan diambil sebagai sumber metabolit sekunder.
3. Penyiapan Suspensi Bakteri
Satu ose bakteri dari stok bakteri disuspensikan ke dalam 1 mL media cair BHI, diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu diambil 100 µL, dimasukkan dalam 1 mL BHI dan diinkubasi selama 4-8 jam pada suhu 37°C. Kemudian diencerkan dengan NaCl 0,9% sampai kekeruhannya sama dengan standar Mc Farland (10^8 CFU/mL). Selanjutnya larutan suspensi diencerkan kembali sampai kekeruhannya 10^6 CFU/mL dengan media BHI DS. Suspensi yang terbentuk disebut suspensi bakteri.

4. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Sumuran
Media Agar Mueller Hinton ditanami (diusap dengan kapas steril) biakan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* 10^8 CFU/mL, lalu dibuat sumuran dengan diameter 6 mm. Sumuran diberi 25 μ l supernatant cairan kultur. Lalu diinkubasi 18-24 jam suhu 37°C untuk kemudian diukur diameter zona hambatnya². Adanya senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh isolat *Actinomycetes* dianalisis berdasarkan munculnya zone steril pada kultur bakteri uji di media padat.

3. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan 12 isolat *Actinomycetes* yang dikultur terlebih dahulu pada media *Starch Nitrate Broth* (SNB). Media pertumbuhan yang baik merupakan media yang mampu menyediakan sumber karbon dan mineral-mineral lain yang dibutuhkan untuk pertumbuhan maupun aktivitasnya²⁰. Penelitian ini menggunakan media SNB karena mempunyai kandungan karbon dan mineral. Sumber karbon media SNB berasal dari soluble starch yang mengandung sejumlah C yang beragam dari pati dan gliserol²¹. Sumber nitrogen anorganik (NO_3^-) berasal dari KNO_3 , mineral-mineral yang berasal dari magnesium, natrium, besi, kalium yang merupakan komposisi dari media SNB.

Ke 12 isolat yang digunakan diberi kode T18, T19, T24, T25, T34, T37, T41, T43, P104, P301, P302 dan TL. Kultur dalam media SNB diperoleh dari pengambilan dua plug isolat *Actinomycetes* dan diinkubasi dalam media SNB selama lima hari. Hal ini digunakan untuk membuat kultur starter di mana ada proses penyesuaian dengan media yang digunakan dan sudah mencapai fase eksponensial, yaitu fase pertumbuhan sel yang paling optimal. Kultur starter kemudian disubkultur ke media SNB dengan volume yang lebih besar dan diinkubasi selama 14 hari. Pada umumnya selama 14 hari tersebut, *Actinomycetes* sudah memasuki fase stasioner, yang merupakan fase mikrobial menghasilkan metabolit sekunder, diantaranya adalah pigmen dan antibiotik. Selama pengamatan, sebagian besar kultur sudah menghasilkan pigmen sebagaimana tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Warna Cairan Kultur Inkubasi Hari ke-1 dan Hari ke-14

Kode isolat	Warna hari 1	Warna hari 14
T18	putih	kecoklatan
T19	putih kotor	coklat kehitaman
T24	putih	kecoklatan
T25	putih	kuning
T34	putih	putih kekuningan
T37	putih	kuning
T41	putih	putih kekuningan
T43	putih	putih kekuningan
P104	putih	putih kekuningan
P301	putih	kuning
P302	putih	putih kekuningan
TL	kecoklatan	coklat kemerahan

Dapat diamati dari Tabel 1 bahwa warna kultur pada hari ke 14 cukup beragam dan sebagian besar mengeluarkan pigmen kuning.

Cairan kultur 14 hari tersebut selanjutnya diuji aktivitas terhadap bakteri uji untuk memastikan adanya kandungan antibiotik di dalam cairan kulturnya. Uji dilakukan terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan *E coli* ATCC 25922. Selain itu juga diuji sifat resistensi bakteri uji yang digunakan terhadap antibiotik. Uji

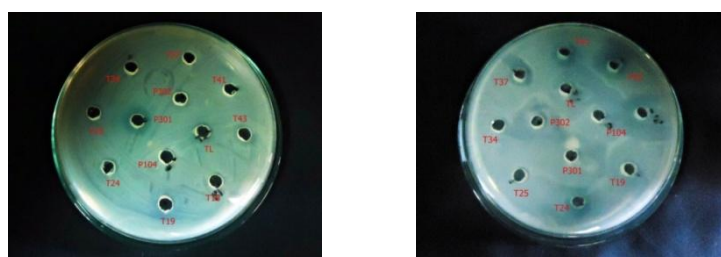
resistensi dilakukan menggunakan tujuh macam antibiotik yaitu ampisilin (AMP), penisilin (P), kloramfenikol (C), tetrasiklin (TE), siprofloksasin (CIP), meropenem (MEM) dan eritromisin (E). Hasil uji resistensi disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil uji resistensi bakteri *E.coli* (gambar kiri) dan *S. aureus* (gambar kanan). Disk antibiotik yang digunakan adalah (1) siprofloksasin, (2) kloramfenikol, (3) meropenem, (4) penisilin, (5) eritromisin, (6) tetrasiklin dan (7) ampisilin

Hasil uji menunjukkan bahwa zone hambat besar terhadap *E. coli* muncul pada antibiotik siprofloksasin dan meropenem sehingga dapat disimpulkan bahwa *E. coli* ATCC 25922 masih sensitive terhadap siprofloksasin dan meropenem, namun sudah resisten terhadap ampisilin, penisilin, kloramfenikol, tetrasiklin dan eritromisin. Adapun pada *S. aureus*, zone hambat besar muncul pada antibiotik siprofloksasin dan meropenem, namun masih merupakan zone iradikal. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa *S. aureus* ATCC 25923 resisten terhadap semua antibiotik yang diujikan. Disk antibiotik yang digunakan memiliki mekanisme aktivitas yang berbeda-beda¹⁰. Ampisilin dan penisilin adalah antibiotik beta lactam dan bersifat menghambat sintesis dinding sel bakteri. Antibiotik meropenem adalah antibiotik baru yang dihasilkan oleh *Streptomyces cattleya*. Meropenem memiliki struktur kimia mirip dengan beta laktam dan bersifat menghambat sintesis dinding sel bakteri juga. Hasil menunjukkan bahwa kedua bakteri uji sudah resisten terhadap penisilin dan ampisilin, namun masih sensitif terhadap meropenem. Perbedaan ini dapat disebabkan karena titik tangkap kerja meropenem berbeda dengan antibiotik beta lactam. Kloramfenikol, tetrasiklin dan eritromisin merupakan penghambat sintesis protein dengan titik tangkap yang berbeda-beda. Hasil penelitian menunjukkan kedua bakteri uji sudah resisten terhadap antibiotik penghambat sintesis protein yang digunakan pada penelitian ini. Adapun siprofloksasin merupakan penghambat replikasi DNA dengan cara berikatan pada enzim girase DNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua bakteri uji masih sensitif terhadap siprofloksasin.

Adapun hasil uji aktivitas cairan kultur terhadap bakteri *S. aureus* ditampilkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil uji aktivitas cairan kultur isolat *Actinomyces* dengan volume 50uL (gambar kiri) dan 100 uL (gambar kanan) terhadap *S. aureus*.

Hasil uji menunjukkan bahwa pada volume 50 uL cairan kultur, isolat *Actinomycetes* yang menunjukkan zona hambat terhadap pertumbuhan *S. aureus* adalah isolat T19, TL, P301, T24 dan T43. Namun setelah volume cairan kultur ditingkatkan menjadi 100 uL, jumlah isolat yang menunjukkan zona hambat bertambah yaitu T19, TL, P301, T24, T43, T37, T41, P302 dan T18. Zona hambat adalah zona jernih di sekitar sumuran yang disebabkan karena berkurangnya atau tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri uji karena perlakuan cairan kultur, sehingga daerah tersebut tampak lebih jernih dibandingkan dengan daerah yang lebih jauh dari sumuran. Aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri uji disebabkan karena metabolit aktif dalam cairan kultur berdifusi ke agar di sekitar sumuran. Bila metabolit bersifat tidak aktif, maka tidak menyebabkan penghambatan pertumbuhan bakteri uji. Adapun hasil uji aktivitas terhadap *E. coli* sebagaimana tercantum pada Gambar 3 menunjukkan bahwa isolat *Actinomycetes* yang bisa dihambat pertumbuhannya oleh 50 uL adalah T19, TL, P301, T24, T41 dan T25. Cairan kultur 100 uL yang dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* adalah T19, TL, P301, T24, T41, T25, T18 dan T43. Hasil tersebut dapat dirangkum pada Tabel 2. Hasil rangkuman menunjukkan bahwa isolat T18, T19, T24, T41, T43, P301 dan TL bersifat menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli*. Ada dua kemungkinan yang menyebabkan isolat-isolat tersebut aktif terhadap kedua bakteri uji. Pertama, isolat-isolat *Actinomycetes* tersebut menghasilkan antibiotik yang memiliki spektrum luas sehingga bisa aktif menghambat bakteri gram positif (*S. aureus*) dan gram negatif (*E. coli*). Kedua, isolat-isolat tersebut menghasilkan lebih dari satu macam antibiotik sehingga ada antibiotik yang aktif ke *S. aureus* dan antibiotik lain yang aktif ke *E. coli*. Namun demikian, hal ini belum bisa diungkap pada penelitian ini, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang zat aktif yang dihasilkan masing-masing isolat *Actinomycetes*. Adapun isolat T37 dan P302 hanya menghambat *S. aureus*. Kemungkinan kedua isolat menghasilkan antibiotik yang lebih spesifik atau memiliki spektrum sempit. Demikian pula isolat T25 yang hanya menghambat *E. coli*. Sementara itu, isolat P104 dan T34 tidak menunjukkan kemampuan menghambat terhadap *S. aureus* maupun *E. coli*. Hal ini menunjukkan bahwa kedua isolat *Actinomycetes* tersebut kemungkinan tidak menghasilkan antibiotik, khususnya yang bersifat antibakteri. Namun tidak menutup kemungkinan bahwa kedua isolat tersebut menghasilkan antifungi atau anti tumor atau aktivitas lain yang tentu memerlukan penelitian lebih lanjut.



Gambar 3. Hasil uji aktivitas cairan kultur isolat *Actinomycetes* dengan volume 50uL (gambar kiri) dan 100 uL(gambar kanan) terhadap *E. coli*.

Tabel 2. Aktivitas cairan kultur isolat Actinomycetes terhadap *S. aureus* dan *E. coli*

Kode isolat	Aktivitas terhadap <i>S. aureus</i>	Aktivitas terhadap <i>E. coli</i>
T18	menghambat	menghambat
T19	menghambat	menghambat
T24	menghambat	menghambat
T25	tidak menghambat	menghambat
T34	tidak menghambat	tidak menghambat
T37	menghambat	tidak menghambat
T41	menghambat	menghambat
T43	menghambat	menghambat
P104	tidak menghambat	tidak menghambat
P301	menghambat	menghambat
P302	menghambat	tidak menghambat
TL	menghambat	menghambat

4. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Cairan kultur isolat TL, T18, T19, T24, T41, T43 dan P301 menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli*. Isolat T37 dan P302 hanya menghambat *S. aureus*. Isolat T25 hanya menghambat *E. coli*, sedangkan Isolat P104 dan T34 tidak menghambat *S. aureus* maupun *E. coli*.

B. Saran

Penelitian ini perlu dilanjutkan dengan mengidentifikasi isolat *Actinomycetes* dan pemurnian senyawa aktifnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Greenberg EP., Bacterial communication and group behaviour, *J. Clin. Invest*, 112, 1288-90. 2003.
- Oskay M, Tamer AU, Azeri C., Antibacterial activity of some Actinomycetes isolated from farming soil of Turkey, *Afr J Biotechnol*, 3(9), 441-446, 2004.
- Parungao MM, Maceda EBG, Villano MAF., Screening of Antibiotic-Producing Actinomycetes from Marine, Brackish and Terrestrial Sediments of Samal Island, Philippines, *Journal of Research in Science, Computing, and Engineering*, 4(3), 29-38. 2007.
- Sulistiyani N, Muhlis M, Kustanti ND, Erinto E, Aquina H, Zainab, Studi Resistensi *Staphylococcus aureus* Yang Diisolasi Dari Limbah Cair Beberapa Rumah Sakit Terhadap Antibiotika, *Prosiding Seminar Nasional Kesehatan Lingkungan Untuk Mewujudkan Sehat Jasmani Rohani Bagi Anak Bangsa*, Fakultas Kesehatan Masyarakat UAD, Yogyakarta. 2009.
- Genilloud O, Gonzalez I, Salazar O, Jesus Martin J, Tormo JR, Vicente F., Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products, *J Ind Microbiol Biotechnol*, DOI 10.1007/s10295-010-0882-7. 2010.
- Berdy J., Bioactive microbial metabolites, A personal view, *J Antibiot*, 58(1), 1-26. 2005.
- Ogunmwonyi IH, Mazomba N, Mabinya L, Ngwenya E, Green E, Akinpelu DA, Olaniran AO, Bernard K, and Okoh AI., Studies on the culturable marine

- actinomycetes isolated from the Nahoon beach in the Eastern Cape Province of South Africa, *Afr. J. Microbiol, Res*, 2223-2230. 2010.
8. Busti E, Monciardini P, Cavaletti L, Bamonte R, Lazzarini A, Sosio M, Donadio S., Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes, *Microbiology*, 52, 675–683. 2006.
 9. Banik JJ, Brady SF., Cloning and characterization of new glycopeptides gene clusters found in an environmental DNA megalibrary, *Proc Natl Acad Sci*, 105,17273–17277. 2008.
 10. Pratiwi ST., *Mikrobiologi Farmasi*, Penerbit Erlangga, Jakarta. 2008
 11. Brady SF, Simmons L, Kim JH, Schmidt EW., Metagenomic approaches to natural products from free-living and symbiotic organisms, *Nat Prod Rep*, 26,1488–1503. 2009.
 12. Corre C, Challis GL., New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining, *Nat Prod Rep*, 26, 977–986. 2009.
 13. Craig JW, Chang FY, Brady SF., Natural products from environmental DNA hosted in *Ralstonia metallidurans*, *ACS Chem Biol*, 4, 23–28. 2009.
 14. Nett M, Ikeda H, Moore BS., Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes, *Nat Prod Rep*, 26, 1362–1384. 2009.
 15. Scherlach K, Hertweck C., Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms, *Org Biomol Chem*, 7, 1753–1760. 2009.
 16. Anderson AS, Wellington EMH, The taxonomy of *Streptomyces* and related genera, *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, 797–814. 2001.
 17. Egan S, Wiener P, Kallifidas D, Wellington EMH., Phylogeny of *Streptomyces* species and evidence for horizontal transfer of entire and partial antibiotic gene clusters, *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 127–133. 2001.
 18. Morningstar A, Gaze WH, Tolba S, Wellington EM., *Evolving gene clusters in bacteria*, In: Logan A, Lappin-Scott HM, Oyston PC (eds) *Prokaryotic diversity, mechanisms and significance*, Cambridge University Press, Cambridge. 2006.
 19. Guo Y, Zheng W, Rong X, Huang Y., A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematic, *Int J Syst Evol Microbiol*, 58, 149–159. 2008.
 20. Todar K., *Online Textbook of Microbiology*, Madison, Wisconsin. 2009
 21. Ali A., Skrining dan Karakterisasi Parsial Senyawa Antifungi dari Actinomycetes Asal Limbah Padat Sagu Terdekomposisi, *Berk Penel Hayati*, 14, 219–225. 2009.

