

AKTIVITAS ANTITUBERKULOSIS EKSTRAK KULTUR CAIR *Streptomyces* ENDOFIT RIMPANG *Kaempferia galanga* TERHADAP *Mycobacterium tuberculosis* RESISTEN

Siti Nur Azizah*, Mikhania Cristiningtyas Eryani*,
Akademi Farmasi Jember
Jl. Pangandaran No. 42 Antirogo Jember
*Email: azizah.ariza@gmail.com

ABSTRACT

The objective of this research was to examine the antituberculosis activity of drug resistant stains using liquid culture extracts Streptomyces Kaempferia galanga rhizomes. The endophytes Streptomyces, there were KJ.3A, KJ3B, KJ.4, and KJ.11. Two resistant strain of Mycocacterium tuberculosis were used, there were HE strain which resistant to isoniazid dan etambutol and SR stains which resistant to streptomisin and rifampisin. The liquid culture extracts of Streptomyces endophytes was obtained from centrifugation method by growing Streptomyces colony into YMB media Antituberculosis activity was using Lowen-stein Jensen (LJ) methode after incubation for 8 weeks. The result showed that the four liquid culture extracts Streptomyces endophytes have not been able to inhibit the growth of Mycobacterium tuberculosis in both HE and SR strains

Keywords: Antituberculosis, endofit *Streptomyces*, resistant *M. tuberculosis*

PENDAHULUAN

Peningkatan kasus resistensi obat tuberkulosis (TB) di Indonesia masih tergolong cukup tinggi di dunia, terutama pada *Multidrug Resistant Tuberculosis*/MDR-TB. Resistensi obat TB ini tidak hanya disebabkan oleh kegagalan pengobatan namun juga karena munculnya bakteri dengan strain resisten yang ditransmisikan oleh penderita MDR-TB (Dye *et al.*, 2002). Oleh karena itu upaya pencarian senyawa bioaktif terbaru dari bahan alam terus dilakukan untuk meningkatkan program pemerintah terkait pengobatan TB yang efektif dan efisien.

Potensi *Streptomyces* endofit asal tanaman obat sebagai antituberkulosis masih sedikit dikaji. Selain itu belum pernah ada laporan tentang potensi *Streptomyces* endofit yang mampu menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis* galur resisten maupun sensitif penyebab TB pada manusia. Penelitian ini menggunakan *Streptomyces* endofit asal rimpang *Kaempferia galanga* (kencur). Hal ini mengacu pada penelitian Fauziyah *et al.* (2017) menyebutkan bahwa kencur merupakan satu-satunya tanaman obat yang memiliki kemampuan tinggi dalam menghambat pertumbuhan *M.tuberculosis* galur MDR dan galur sensitif dengan nilai persentase penghambatan kurang dari 1%.

Setiap tanaman dapat mengandung beragam mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa bioaktif yang sama dengan inangnya. Hal ini diduga sebagai akibat transfer genetik

dari tanaman inang ke dalam mikroba endofit (Taghavi *et al.*, 2005). Keuntungan penggunaan mikroba endofit dibanding tanaman antara lain bahwa mikroba relatif lebih mudah dan efisien untuk produksi bioaktif. Keragaman molekul biologis mikroba endofit lebih tinggi untuk mendukung penemuan bioaktif terbaru. Selain itu, sifat simbiosisnya yang menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dari mikroba endofit cenderung memiliki toksisitas rendah. Hal ini penting bagi medis sebagai obat potensial yang tidak berdampak buruk pada sel manusia (Alvin *et al.*, 2017)

Berdasarkan penelitian Azizah dan Eryani (2019)^a serta Azizah dan Eryani (2019)^b telah melakukan isolasi *Streptomyces* dari rimpang kencur dan beberapa tanaman obat lainnya. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak kultur cair *Streptomyces* endofit belum mampu menghambat *M. tuberculosis* galur sensitif. Potensi setiap spesies mikroba berbeda-beda tergantung potensi sifat dari gen yang menyandikan protein penghasil senyawa antibakteri. Ada spesies mikroba yang hanya menghambat bakteri galur sensitif, atau galur resisten saja bahkan dapat menghambat kedua galur. Sehingga potensi *Streptomyces* endofit ini perlu dikaji kembali berdasarkan habitat aslinya yang berada didalam jaringan kencur yang berpotensi sebagai antituberkulosis resisten. Oleh karena itu pada penelitian bertujuan untuk melanjutkan uji antituberkulosis pada galur resisten obat yaitu galur HE dan SR menggunakan ekstrak kultur cair *Streptomyces* endofit.

METODELOGI PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli hingga September 2018. Penelitian bertempat di Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Jember dan Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

Mikroba uji

Isolat *Streptomyces* endofit kencur terdiri dari KJ.3A, KJ3B, KJ.4, dan KJ.11 diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi FMIPA Jember hasil penelitian Azizah dan Eryani (2019)^a. Isolat *M. tuberculosis* merupakan galur resisten HE dan SR yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya.

Peremajaan Isolat *Streptomyces*

Isolat *Streptomyces* dari stok diremajakan pada media Yeast Malt Agar (YMA) dengan cara streak kuadran untuk menentukan kemurnian isolat. Biakan diinkubasi selama 12 hari pada suhu ruang. Pengamatan dilakukan pada *single colony* dan dicocokkan dengan Azizah dan Eryani (2019)^a

Uji Aktivitas Antituberkulosis

Produksi ekstrak kultur cair *Streptomyces*

Koloni tunggal *Streptomyces* berumur 10 hari dimedia YMA diambil menggunakan *cork bore* (0,5 mm) sebanyak 2 lup dan diinokulasikan ke dalam 100 ml media produksi ISP2 cair dan diinkubasi menggunakan *shaker* 100 rpm pada suhu ruang selama 12 hari. Hasil inkubasi

kultur cair selanjutnya disentrifugasi 6000 rpm pada suhu ruang. Supernatan hasil sentrifugasi merupakan ekstrak kultur cair yang mengandung metabolit dan berpotensi sebagai antimikroba. Rendaman/endapan tidak digunakan karena mengandung sel *Streptomyces*. Bahan aktif dalam pengujian antituberkulosis tidak boleh berupa sel, namun berupa senyawa atau suatu ekstrak. Ekstrak kultur cair disimpan pada 4 °C untuk uji lanjutan Azizah dan Eryani (2019)^b.

Pembuatan sampel uji kedalaman media LJ

Ekstrak kultur cair diuji pada konsentrasi 10-20% media LJ. Ekstrak kultur cair yang diuji menggunakan konsentrasi 100% karena penelitian ini masih merupakan tahapan awal dalam skrining senyawa aktif yang berpotensi. Kontrol atau obat pembanding yang digunakan adalah rifampisin (40 µg/mL), isoniazid (0,2 µg/mL), etambutol (2,0 µg/mL), dan streptomisin (4,0 µg/mL). Media LJ ditambahkan ke dalam tabung yang berisi larutan ekstrak atau obat pembanding sehingga volume total menjadi 5 ml kemudian diaduk sampai homogen. Tabung dimiringkan kemudian dimasukkan ke dalam oven 85 °C selama 1 jam agar media menjadi padat. Media ini akan digunakan untuk inokulasi *M. tuberculosis* (Germana *et al.*, 2011).

Inokulasi dan pengamatan

Inokulasi dilakukan terhadap *M. tuberculosis*. Bakteri disuspensikan ke dalam NaCl 0,9 % hingga diperoleh kekeruhan 10-3 dan 10-5 McF. Masing-masing suspensi bakteri sebanyak 0,1 mL diinokulasikan pada permukaan media yang mengandung ekstrak kultur cair, obat pembanding, atau pelarut. Semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C. Metode ini menginterpretasikan pertumbuhan koloni bakteri pada media LJ yang diamati setiap minggu mulai minggu ke-4 sampai minggu ke-8. Koloni yang tumbuh pada kelompok perlakuan dan kontrol kemudian dibandingkan dan dihitung persentase resistensinya (Germana *et al.*, 2011; Kemenkes RI, 2012). Rumus perhitungan persentase resistensi sebagai berikut:

$$\text{Persentase resistensi} = \frac{\text{Jumlah koloni pada perlakuan}}{\text{Jumlah koloni pada kontrol}} \times 100\%$$

Suatu bakteri dikatakan resisten terhadap anti bakteri bila nilai persentase resistensinya $\geq 1\%$, namun jika nilainya $\leq 1\%$ maka bakteri tersebut masih sensitif terhadap antibakteri (Kemenkes RI, 2012).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian antituberkulosis bertujuan untuk mengetahui potensi *Streptomyces* endofit rimpang kecur dalam menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis* penyebab penyakit TBC. Uji aktivitas antituberkulosis telah dilakukan secara *in vitro* terhadap dua galur bakteri yang resisten obat yaitu galur HE dan SR. Menurut Germana *et al* (2011), *M. tuberculosis* galur HE sudah resisten terhadap isoniazid dan etambutol sedangkan galur SR resisten terhadap

streptomisin dan rifampisin. Sehingga kedua galur resisten ini sangat sulit dan butuh waktu pengobatannya yang lebih lama dari galur sensitif.



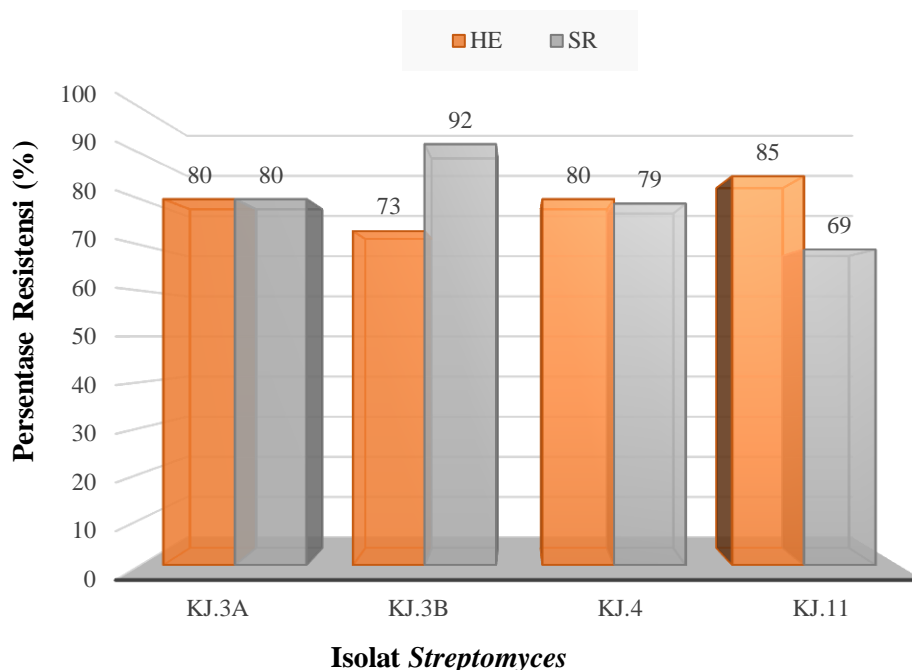
(a)

(b)

Gambar 1. Pengamatan hasil pengujian antituberkulosis menggunakan ekstrak kultur cair *Streptomyces* terhadap *M.tuberculosis* galur resisten pada pengamatan minggu ke-4. a) koloni *M.tuberculosis* yang tumbuh dipermukaan media LJ setelah diberi ekstrak kultur cair *Streptomyces*. b) kontrol tidak adanya pertumbuhan *M.tuberculosis* pada media LJ tanpa ekstrak kultur cair *Streptomyces* atau setelah ditambah obat pembanding

Pengujian antituberkulosis menggunakan metode proporsional. Pada metode ini, digunakan dua konsentrasi inokulum bakteri yaitu 10^{-5} dan 10^{-3} McF dan pengamatan hasil uji dilakukan pada minggu ke-4 sampai ke-6 (Gambar 1). Hal ini bertujuan agar diperoleh jumlah koloni yang dapat dihitung pada salah satu konsentrasi sehingga jumlah total koloni yang teramati dapat ditentukan. Jumlah bakteri yang resisten dapat ditentukan dari perbandingan koloni yang tumbuh pada kelompok perlakuan terhadap total populasi bakteri pada kelompok kontrol atau biasa disebut persentase resistensi.

Hasil pengujian aktivitas antituberkulosis resisten obat menunjukkan bahwa keempat ekstrak kultur *Streptomyces* tidak dapat menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis* pada kedua galur resisten (HE dan SR). Hasil ini dibuktikan karena nilai persentase resistensi dari empat ekstrak kultur *Streptomyces* pada galur *M. tuberculosis* antara 69% hingga 92% (Tabel 1). Nilai persentase resistensi ini sudah $\geq 1\%$. Menurut Kemenkes RI (2012), suatu bakteri dikatakan resisten terhadap antibakteri bila nilai persentase resistensinya $\geq 1\%$. Oleh karena itu keempat ekstrak kultur cair ini tidak dapat menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* galur resisten.



Gambar 2. Persentase resistensi *Mycobacterium tuberculosis* galur resisten HE dan SR setelah pengamatan 8 minggu yang kontak dengan keempat ekstrak kultur cair *Streptomyces*

Semua ekstrak kultur cair *Streptomyces* belum mampu menghambat pertumbuhan kedua *M. tuberculosis* galur resisten. Hal ini dapat disebabkan oleh banyak faktor. Ekstrak kultur cair *Streptomyces* yang digunakan dalam penelitian ini masih belum dilakukan tahapan presipitasi dengan menggunakan pelarut, sehingga konsentrasi senyawa aktif dalam supernatan ekstrak kultur cair masih sangat rendah dibandingkan setelah dilakukan presipitasi. Tahapan presipitasi belum dilakukan karena umumnya dalam tahapan skrining senyawa bioaktif yang diuji potensinya, sampel uji yang akan diuji terlebih dahulu adalah ekstrak kasar atau ekstrak kultur cair/sebelum di presipitasi. Sehingga adanya presipitasi supernatan dapat meningkatkan aktivitas sampel uji. Jika hasil presipitasi sampel uji belum mampu menghambat *M.tuberculosis*, maka perlu dilakukan pengujian potensi lain dari *Streptomyces* ini selain sebagai antituberkulosis, seperti pengujian antifungi, antidiare, antihipertensi, antioksidan atau antikanker.

Hasil penelitian ini juga serupa dengan penelitian Khumjamayum et al (2017), hanya sampel uji yang digunakan sudah berupa ekstrak kultur cair *Streptomyces* yang sudah diendapkan/dipresipitasi menggunakan pelarut etil asetat. Hasil penelitian tersebut juga mengungkapkan bahwa ekstrak kultur cair *Streptomyces* belum mampu digunakan sebagai antituberkulosis karena belum mampu menghambat pertumbuhan *M.tuberculosis* baik sensitif dan resisten, hanya mampu menghambat *M.stegmatis* dan *M. bovis* sebagai penyebab TBC pada hewan. Menurut Azizah dan Mikhania (2019), ekstrak kultur cair keempat *Streptomyces* juga belum mampu menghambat galur sensitif *M.tuberculosis*. Sehingga sampai saat ini masih belum ditemukan *Streptomyces* endofit yang dapat menghambat *M.tuberculosis* baik

galur sensitif ataupun resisten. Oleh karena itu diperlukan identifikasi tingkat spesies pada keempat *Streptomyces* endofit kencur ini menggunakan gen penyandi 16s rRNA untuk mengetahui potensi lain dari spesies *Streptomyces* tersebut.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Streptomyces endofit rimpang kencur KJ.3A, KJ.3B, KJ.4, dan KJ.11 telah diuji potensinya sebagai antituberkulosis resisten obat yaitu galur HE dan SR menggunakan metode LJ. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel uji berupa ekstrak kultur cair keempat *Streptomyces* memiliki nilai persentase resistensi yang sudah $\geq 1\%$ terhadap dua galur *M. tuberculosis* HE dan SR.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian menyarankan bahwa keempat *Streptomyces* endofit rimpang kencur perlu diuji potensi lain sebagai antimikroba pada bakteri gram positif dan negatif penyebab infeksi pada manusia selain genus *Mycobacterium*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Akademi Farmasi Jember yang telah memberikan dana penelitian PDP Tahun 2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Azizah SN, dan M.C Eryani. 2019a. Isolation and Characterization of Endophyte Actinomycetes From Antituberculosis Medical Plants. *Conference on Agromedicine and Tropical Disease*. Jember.
- Azizah SN, dan M.C Eryani. 2019b. Potensi *Streptomyces* Endofit Rimpang Kencur dan Daun Sirih Merah sebagai Antituberkulosis pada *Mycobacterium tuberculosis* Galur Sensitif. *Jurnal Ilmu Farmasi Akademi Farmasi Jember* . 3.1 . 14-22.
- Alvin A, Kristin, K.I.Miller, and B.A. Neilan. 2017. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiological Research*. 169. 483-495.
- Dye, C., Espinal, M.A., Watt, C.J., Mbiaga, C., Williams, B.G. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. 2002. *Journal of Infection Diseases*. 185.8. 1197-1202.
- Garmana AN, E.Y. Sukandar, and I. Fidrianny. 2011. Uji aktivitas ekstrak beberapa tumbuhan terhadap *Mycobacterium tuberculosis* galur sensitif dan resisten. *Acta Pharmaceutica Indonesia*. 36.3. 35-39
- Fauziyah PN, E.Y. Sukandar, D.K. Ayuningtyas. 2017. Combination effect of antituberculosis drugs and ethanolic extract of selected medicinal plants against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Scientia Pharmaceutica*. 84. 14. 2-9.
- Kemendes RI. 2012. *Petunjuk Teknis Pemeriksaan Biakan, Identifikasi, dan uji kepekaan Mycobacterium tuberculosis pada Media Padat*. Jakarta.

- Khunjamayum R, K. Tamreihao, S.N. Debananda, S.D. Athokpam, N. Salam, B. Sharmistha, S. Swetha, and R. Arshad. 2017. In-vitro antimycobacterial activities of endophytic bacteria associated with medicinal plant of manipur. *Journal of Bacteriology and Mycology*. 4. 4. 1-4.
- Taghavi, S., Barac, T., Greenberg, B., Borremans, B., Vangronsveld, J., Van der Lelie, D. 2005. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. *Applied and Environmental Microbiology*. 71. 8500-8505.