



Potensi Antibakteri Isolat *Actinomyces* terhadap Aktivitas Proteolitik dan Amilolitik *Escherichia Coli* ATCC 25922

Potention of Antibacterial Isolat *Actinomyces* to Proteolytic and Amilolitic Activity *Escherichia Coli* ATCC 25922

Meiskha Bahar^{1a*}, Fajriati Zulfa^{2b}

^{1,2} Fakultas Kedokteran UPN "VETERAN" Jakarta, Indonesia

^a Email address: meiskha27@gmail.com

^b Email address: zulfafajriati@yahoo.com

HIGHLIGHTS

- Isolat *Actinomyces* mengandung senyawa yang berfungsi sebagai antiproteolitik dan antiamilolitik terhadap *E.coli* ATCC 25922

ARTICLE INFO

Article history

Received date : November 11st, 2017

Revised date : November 27th, 2017

Accepted date : February 28th, 2018

Keywords:

Actinomyces
 Anti-proteolytic
 Anti-amylolytic

Kata Kunci:

Actinomyces
 Anti-proteolitik
 Anti-amilolitik

ABSTRACT / ABSTRAK

Occurs *E. coli* resistance to class 3 cephalosporin class antibiotics and fluoroquinolone groups. The antibiotic resistance that occurs has narrowed the choice of therapy. This study aims to determine the effect of *Actinomyces* isolates on proteolytic and amylolytic enzymes *E. coli* ATCC 25922. This research is experimental research, qualitative tests of protease and amylase enzymes from *E. coli* ATCC 25922 shown by clear zones around the growth colonies. The result of *Anova One-Way* test showed a significant difference on the width of clear zone, colony zone and *PER* and *AER* score with *p* value < 0,05. This indicates that *Actinomyces* isolates contain compounds that can act as inhibitors of protease and amylase enzymes from *E.coli* ATCC 25922. It is hoped that there will be research about identification of *Actinomyces* species isolates in Bogor Botanical Garden, so that later can be cultivated and produced as an antibiotics alternative.

Terjadi resistensi *E. coli* terhadap antibiotik golongan sefalosporin generasi ke-3 dan golongan fluorokuinolon. Resistensi antibiotik yang terjadi telah mempersempit pilihan terapi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek dari isolat *Actinomyces* terhadap enzim proteolitik dan amilolitik *E. coli* ATCC 25922. Penelitian ini adalah penelitian eksperimen, dilakukan uji kualitatif terhadap enzim protease dan amilase dari *E. coli* ATCC 25922. Hasil uji *Anova One-Way* menunjukkan terdapat perbedaan luas zona bening, zona koloni, nilai *PER* dan *AER* antar kelompok perlakuan dengan nilai *p* < 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa isolat *Actinomyces* mengandung senyawa yang dapat berfungsi sebagai inhibitor terhadap enzim protease dan amilase dari *E.coli* ATCC 25922. Diharapkan dapat dilakukan penelitian tentang identifikasi spesies dari isolat *Actinomyces* yang terdapat di Kebun Raya Bogor, sehingga nantinya dapat dikembangkan dan diproduksi sebagai alternatif pengganti antibiotik.

Copyright © 2018 Jurnal Teknologi Laboratorium.
 All rights reserved

Corresponding Author:

Meiskha Bahar
 Jln.RS Fatmawati Pondok Labu Jakarta Selatan
 Email: meiskha27@gmail.com

1. PENDAHULUAN

Escherichia coli (*E. coli*) merupakan bakteri gram-negatif berbentuk batang dan memiliki sifat anaerob fakultatif. Bakteri yang termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae* ini merupakan flora normal pada usus manusia yang juga berfungsi untuk membantu sintesis vitamin K. Selain itu, *E.coli* juga dapat berkembang biak di lingkungan sekitar manusia dan berfungsi sebagai pengurai.^{1,2} *E. coli* dapat menjadi patogen terhadap manusia apabila jumlahnya meningkat di dalam tubuh. Keberadaan *E. coli* dalam air atau makanan dianggap berkaitan erat dengan ditemukannya bibit penyakit pada pangan. Bakteri ini memproduksi enterotoksin yang perannya terhadap penyakit diare telah diketahui secara luas.³

Antimicrobial Resistance Global Report of Surveillance tahun 2014 yang dilakukan oleh WHO menunjukkan bahwa terjadi resistensi *E. coli* terhadap antibiotik golongan sefalosporin generasi ke-3 dan golongan fluorokuinolon. Resistensi antibiotik yang terjadi telah mempersempit pilihan terapi.⁴ Hal ini memunculkan kebutuhan mendesak untuk membuat agen anti infeksi yang baru. Penanggulangan infeksi bakteri *E. coli* perlu dilakukan agar tidak berdampak luas bagi kesehatan manusia. Upaya yang dapat dilakukan adalah dengan pemanfaatan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman atau pemanfaatan mikroba baik dari golongan jamur atau bakteri yang dapat menghasilkan senyawa antimikroba dan bertindak antagonis jika ditumbuhkan pada lingkungan yang sama.

Mikroorganisme yang terdapat di tanah antara lain dari jenis Actinomycetes terutama genus *Streptomyces*. Jamur golongan ini memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Ada beberapa penelitian yang telah membuktikan bahwa Actinomycetes mengandung senyawa atau enzim yang berguna sebagai antimikroba.⁵ Tahun 1999 Indriasari berhasil menemukan 186 isolat Actinomycetes dari 78 sampel sedimen ekosistem air hitam yang terletak di Kalimantan Tengah, dari 186 isolat diketahui 58 isolat dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, 38 isolat mampu menghambat *Escherichia coli* dan 17 isolat mampu menghambat keduanya. Penelitian Nedialkova & Naidenova (2005), juga berhasil menemukan 40 strain Actinomycetes yang diisolasi dari Antarctica. Setelah diujikan pada 7 spesies bakteri didapatkan hasil 60% strain berpotensi sebagai antibiotik, dan 10 strain mempunyai daya hambat dengan spektrum yang luas.^{6,7} Ambarwati pada tahun 2012 juga berhasil mengisolasi Actinomycetes dari rizosfer padi (*Oryza sativa*). Penelitian ini dilakukan dengan mengambil sampel isolat dari kebun Raya Bogor karena tempat ini merupakan kebun botani terbesar dan memiliki beragam koleksi tanaman dan didukung dengan iklim yang mendukung pertumbuhan beberapa jenis mikroba tanah seperti Actinomycetes dan diharapkan dari penelitian ini dapat dilakukan pengembangan penelitian terhadap kandungan Actinomycetes di Kebun Raya Bogor sebagai pengembangan potensi dari senyawa metabolit yang berpotensi sebagai senyawa alternatif dalam uji resistensi bakteri.

2. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

2.1. Desain penelitian

Penelitian ini adalah penelitian True eksperimental. Perlakuan dengan menguji efektivitas dari isolat Actinomycetes terhadap aktivitas proteolitik dan amilolitik *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.2. Lokasi penelitian

Lokasi penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Pembangunan Nasional Jakarta.

2.3. Sampel penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah *Actinomycetes* yang diambil dari tanah di Kebun Raya Bogor.

2.4. Bahan dan alat penelitian

- a. Isolat *Actinomycetes* yang digunakan dalam penelitian yang diisolasi dari tanah di perkebunan Bogor.
- b. Suspensi *E. coli* ATCC 25922 yang dibiakan di MHA selama 24 jam.

- c. Media selektif untuk isolasi *Actinomycetes* adalah *Strach Casein Agar* (SCA)
- d. Media *Skim Milk Agar* untuk uji Protease
- e. Antibiotik kloramfenikol (kontrol positif)
- f. Antibiotik untuk memastikan *Actinomycetes* kontrol antibiotik spesifik yaitu *Cyclohexamide*
- g. Antifungi *Nystatin*
- h. *Waterbath*
- i. *Incubator*
- j. *Autoclave*
- k. Mikropipet

2.5. Koleksi/tahapan penelitian

a. Pengamatan Aktivitas Protease *E. coli* dengan Metode Difusi

Isolat *Actinomycetes* diencerkan dalam tiga jenis konsentrasi berbeda (10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6}) ditambahkan ke cawan petri masing-masing, kemudian dicampur dengan 10mL *Casein Agar*. Pada media *Skim Milk Agar* yang sudah mengeras, dibuat lubang ditengahnya dengan diameter 3 mm, kemudian sebanyak 1 mL bakteri *E. coli* yang telah diremajakan dimasukkan ke dalam lubang tersebut dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Ditambahkan indikator *Bromocresol Purple*. Aktivitas proteolitik *E. coli* yang ditumbuhkan pada media *Skim Milk Agar* ditunjukkan dengan terlihatnya zona bening yang muncul disekitar koloni yang terbentuk. Indeks proteolitik dihitung dengan cara mengukur luas areal bening dan luas koloni bakteri. Perhitungan indeks proteolitik adalah perbandingan luas areal bening dengan luas koloni bakteri

b. Pengamatan Aktivitas Amilolitik *E. coli* dengan Metode Difusi

Isolat *Actinomycetes* diencerkan dalam tiga jenis konsentrasi berbeda (10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6}) ditambahkan ke cawan petri masing-masing, kemudian dicampur dengan 10mL *Casein Agar*. Pada media *Starch Agar* yang sudah mengeras, dibuat lubang ditengahnya dengan diameter 3 mm, kemudian sebanyak 1 mL bakteri *E. coli* yang telah diremajakan dimasukkan ke dalam lubang tersebut dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Ditambahkan indikator JKJ 1%. Aktivitas amilolitik *E. coli* yang ditumbuhkan pada media *Starch Agar* ditunjukkan dengan terlihatnya zona bening yang muncul disekitar koloni yang terbentuk

2.6. Analisis data

Data yang telah terkumpul selanjutnya diolah dan dianalisis secara statistik. Data analisis yang digunakan adalah *Anova One Way*, untuk mengetahui perbedaan pengaruh isolate *Actinomycetes* terhadap aktivitas protease dan amilase terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* yang telah dilakukan tiap kelompoknya

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil Pengukuran Luas (mm) Zona Bening, Zona Koloni, dan *PER* Pada Seluruh Kelompok Perlakuan

Pengulangan	Perlakuan											
	Actinomycetes 10^{-4}			Actinomycetes 10^{-5}			Actinomycetes 10^{-6}			Kontrol positif		
	Zona bening	Zona koloni	<i>PER</i>	Zona bening	Zona koloni	<i>PER</i>	Zona bening	Zona koloni	<i>PER</i>	Zona benin	Zona koloni	<i>PER</i>
1	13,81	25,73	1,53	12,27	23,71	1,52	9,97	17,42	1,57	2,43	24,59	1,10
2	10,63	16,94	1,62	9,10	9,91	1,92	10,03	11,92	1,84	1,73	30,26	1,15
3	9,28	12,97	1,72	8,80	10,02	1,88	9,31	13,15	1,71	1,83	22,34	1,11
4	11,34	17,45	1,65	9,90	13,27	1,75	7,13	10,44	1,68	1,57	20,87	1,07
5	9,62	16,17	1,59	8,56	12,31	1,69	7,28	8,59	1,85	1,53	28,69	1,05

Sumber: Data primer 2017

Tabel 2. Hasil Pengukuran Luas (mm) Zona Bening, Zona Koloni, dan AER Pada Seluruh Kelompok Perlakuan

Pengulangan	Perlakuan											
	Actinomycetes 10 ⁻⁴			Actinomycetes 10 ⁻⁵			Actinomycetes 10 ⁻⁶			kontrol positif		
	Zona bening	Zona koloni	AER	Zona bening	Zona koloni	AER	Zona bening	Zona koloni	AER	Zona bening	Zona koloni	AER
1	10,20	14,49	1,70	9,99	12,31	1,81	9,18	13,44	1,68	2,43	24,59	1,10
2	9,19	15,34	1,59	7,66	12,40	1,61	7,32	9,91	1,74	1,73	30,26	1,15
3	7,52	12,25	1,61	7,93	12,79	1,62	8,07	9,80	1,82	1,83	22,34	1,11
4	8,87	14,40	1,62	8,81	12,60	1,69	8,08	9,98	1,81	1,57	20,87	1,07
5	9,54	15,85	1,60	8,58	11,31	1,76	8,53	9,88	1,86	1,53	28,69	1,05

Sumber: Data primer 2017

Tabel 3. Uji ANOVA *Proteolytic Enzymatic Rate* (PER)

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.423	3	.474	41.440	.000
Within Groups	.183	16	.011		
Total	1.606	19			

Sumber: Data primer 2017

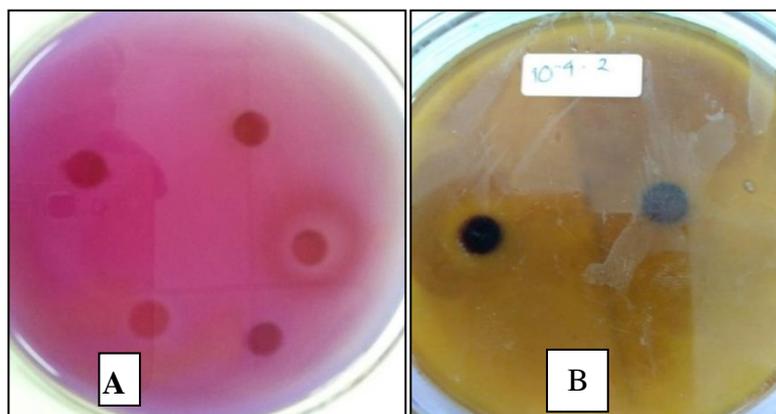
Pada uji *One Way Anova* diperoleh nilai p signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa paling tidak terdapat perbedaan PER yang bermakna pada dua kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan peningkatan zona lisis Protein dari Actinomycetes per konsentrasi dan kontrol positif terhadap bakteri *E.coli*.

Tabel 4. Uji ANOVA *Amylolytic Enzymatic Rate* (AER)

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.437	3	.479	118.973	.000
Within Groups	.064	16	.004		
Total	1.501	19			

Sumber: Data primer 2017

Pada uji *One Way Anova* diperoleh nilai p signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa paling tidak terdapat perbedaan AER yang bermakna pada dua kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan peningkatan zona lisis Amilase dari Actinomycetes per konsentrasi dan kontrol positif terhadap bakteri *E.coli*.

Gambar 1. Zona Bening dan zona koloni pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25922

- A. Aktivitas Proteolitik isolat Actinomycetes (konsentrasi 10^{-4})
 - B. Aktivitas Amilolitik isolate Actinomycetes (konsentrasi 10^{-4})
- Sumber: Bahar, 2017

Untuk mengetahui aktivitas proteolitik *Escherichia coli* pada berbagai kelompok perlakuan, telah dilakukan pengukuran diameter zona koloni dan zona bening yang terbentuk dalam masing-masing cawan. Dari hasil pengukuran tersebut, didapatkan *Proteolytic Enzymatic Rate (PER)* dengan cara membagi antara jumlah diameter zona koloni ditambah dengan diameter zona bening terhadap diameter zona koloni. Dari hasil pengukuran zona bening untuk Uji Protease, pada Tabel 1 menunjukkan adanya perbedaan luas zona bening yang signifikan per konsentrasi. Hal ini juga sejalan dengan dengan nilai $p < 0,05$ untuk masing-masing kelompok perlakuan yang berbeda. Dari hasil tersebut terlihat bahwa semakin besar daya hambat terhadap enzim Protease dari *E.coli* ATCC 25922 maka semakin sempit luas zona bening yang terbentuk. Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme penghambatan terhadap enzim protease yang diproduksi oleh *E.coli* dilakukan oleh senyawa bioaktif dari hasil metabolit sekunder yang dihasilkan dari isolat Actinomycetes. Dari hasil pengukuran zona koloni Uji Protease *E.coli* ATCC 25922 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna luas zona koloni antar kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa Actinomycetes mengandung senyawa yang dapat berfungsi sebagai inhibitor terhadap enzim protease dari *E.coli* ATCC 25922. Semakin besar penghambatan terhadap enzim protease *E.coli* maka semakin luas zona koloni yang terbentuk. Actinomycetes khususnya dari jenis Streptomyces mengandung inhibitor protease alkalin, α -amilase dan inhibitor peptide dan protease protein.⁸ Senyawa ini menghambat enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri *E.coli* dengan cara menghambat reseptor bakteri sehingga bakteri tidak dapat memproduksi atau proses produksi enzim protease dari bakteri akan terganggu atau malah tidak akan bekerja.⁹ Dari hasil pengukuran zona bening untuk Uji Amilase, menunjukkan adanya perbedaan luas zona bening yang signifikan dengan nilai $p < 0,05$ untuk masing-masing kelompok perlakuan yang berbeda. Dari hasil tersebut terlihat bahwa semakin besar daya hambat terhadap enzim Amilase dari *E.coli* ATCC 25922 maka semakin sempit luas zona bening yang terbentuk. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dari hasil metabolit sekunder yang dihasilkan dari isolat Actinomycetes dapat menghambat enzim Amilase yang diproduksi oleh *E.coli*. Dari hasil pengukuran zona koloni Uji Amilase *E.coli* ATCC 25922 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna luas zona koloni antar kelompok perlakuan dengan nilai $p < 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa Actinomycetes mengandung senyawa yang dapat berfungsi sebagai inhibitor terhadap enzim amilase dari *E.coli* ATCC 25922.

Penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Raja tahun 2010 yang mengisolasi 17 strain Actinomycetes dari sedimen mangrove menunjukkan hasil bahwa mikroorganisme tersebut memiliki kemampuan untuk menghambat kerja enzim amylase.¹⁰ Hal ini juga sejalan dengan penelitian Meng et.al tahun 2013 yang berhasil mengisolasi 21 jenis Streptomyces dari beberapa tempat di Cina, menyimpulkan bahwa bakteri-bakteri ini memiliki kemampuan untuk menghambat enzim α -amilase.¹¹ *E.coli* memproduksi α -amilase sitoplasma, mekanisme kerja penghambat enzim α -amilase yang dimiliki oleh Actinomycetes adalah disebabkan oleh struktur sikliknya analog dengan substrat amilase, sehingga dapat menghambat produksi enzim amylase oleh *E.coli*. Menurut Meliawati dalam Sutiamihardja 2008, menjelaskan bahwa kemampuan atau daya amilolitik suatu mikroba ditandai dengan terbentuknya zona bening dalam medium yang mengandung pati. Zona bening yang terbentuk menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu glukosa.¹²

Hasil dari penelitian ini jika dibandingkan dengan penelitian terdahulu menunjukkan bahwa isolat Actinomycetes dari tanah di kebun Raya Bogor ternyata dapat menghambat aktivitas enzim Protease dan Amilase dari bakteri *E.coli* sedangkan pada penelitian sebelumnya, tidak dinilai dari aktivitas enzim yang spesifik dari bakterinya. Dikarenakan keterbatasan waktu dan sumber daya, penilaian efek isolat Actinomycetes terhadap aktivitas proteolitik dan amilolitik *E.coli* hanya dapat dilakukan secara kualitatif saja dan tidak dilanjutkan ke penilaian secara kuantitatif. Hasil penilaian aktivitas proteolitik dan amilolitik *E.coli* hanya dapat dinilai melalui perubahan nilai *PER* dan *AER* tanpa dilakukan penilaian lebih lanjut terhadap perubahan nilai *PU (Protease Unit)* dan *AU (Amylase Unit)* per konsentrasi.

4. SIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil pengukuran zona bening untuk Uji protease dan amilase menunjukkan adanya perbedaan luas zona bening yang signifikan dengan nilai $p < 0,05$ untuk masing-masing kelompok perlakuan yang berbeda. Dari hasil tersebut terlihat bahwa semakin besar daya hambat terhadap enzim Protease dan amilase bakteri *E.coli* ATCC 25922 maka semakin sempit luas zona bening yang terbentuk.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Rektor UPN Veteran Jakarta melalui LPPM yang telah memberikan kesempatan dan bantuan dana penelitian, pihak Kebun Raya Bogor yang telah memberikan keluasaan kepada kami untuk mengambil sampel, mahasiswa yang telah membantu dalam pengambilan sampel dan Bu Titik yang telah membantu pengerjaan di Laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

1. Arisman. *Buku Ajar Ilmu Gizi Keracunan Makanan*. Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2009.
2. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, Jawetz, Melnick, Adelberg. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2008.
3. Lavor AKLS, Et.al. Association between drugs and herbal products: in vitro enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae). *Eur J Integr Med*. 2014;6.
4. Martha D, Achmad S, Tejasari M. *Escherichia coli* resisten terhadap seftriakson dan siprofloksasin. In: *Pendidikan Dokter Universitas Islam Bandung*. Bandung; 2015.
5. Adriani Y, Febriwanti T. Isolasi dan Karakterisasi Actinomycetes Sebagai Penghasil Antibiotik Dari Sampel Peternakan Sapi di Kecamatan Galesong Kabupaten Takala. *Biogenesis*. 2013;1(2):97-100.
6. Nediakolva D, Naidenova M. Screening The Antimicrobial Activity of Actinomycetes Strains Isolated from Antarctica. *J Cult Collect*. 2005;4:29-35.
7. Pandhare J. studies of an alkaline protease inhibitor from a *Streptomyces* sp. *Div Biochem Sci Natl Chem Lab*. 2002.
8. Karthik L, Et.al. Protease Inhibitors From Marine Actinobacteria as a Potential Source for Antimalarial Compound. *PLoS One*. 2014;9(3). doi:10.1371/journal.pone.0090972.
9. Raja S, Ganesan S, Sivakumar K, Thangaradjou T. Screening of marine actinobacteria for amylase enzymes inhibitors. *Indian J Microbiol*. 2010;50:233.
10. Meng P, Xie C, Geng P, Et.al. Inhibitory effect of components from *Streptomyces* species on α -glucosidase and α -amylase of different origin. *Appl Biochem Microbiol*. 2003;49(8):160.
11. Zhibin S, Et.al. Isolation and characterization of a Proteinaceous α -amylase inhibitor AAI-CC5 from *Streptomyces* sp. CC5 and It's Gene Cloning and Expression. *PubMed*. 2014. doi:10.1007/s10482-014-0333-y.
12. Nurhalijah S. *Isolasi Bakteri Dan Uji Aktivitas Amilase Kasar*. Medan; 2008.