

## **AKTIVITAS INHIBITOR ALFA GLUKOSIDASE DARI AKTINOMISET ASAL PHYLLOPLANE KELOR (*Moringa oleifera*)**

### ***Alpha Glucosidase Inhibitor Activity of Phylloplane Actinomycetes Isolated from Moringa oleifera***

Noor Andryan Ilsan<sup>1,\*</sup>, Siti Nurfaiah<sup>1</sup>, Maulin Inggriani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Program Studi Teknologi Laboratorium Medik, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Mitra Keluarga, Bekasi Timur, 17113, Indonesia)

\*Corresponding author: [noorandryanilsan@gmail.com](mailto:noorandryanilsan@gmail.com)

---

#### **ABSTRACT**

The exploration of alternative natural products is one of the important focuses for a researcher. Microbes are still the best source for searching the bioactive compounds. Actinomycetes are Gram-Positive bacteria which have been known able to produce various of secondary metabolite compounds such as antimicrobials and enzyme inhibitors. The aims of this study were to isolate actinomycetes from *Moringa oleifera* phylloplane also evaluate the antimicrobial and alpha glucosidase inhibitor activities. Methods of this study including isolated phylloplane actinomycetes from *Moringa oleifera* leaves, characterized of the actinomycetes colony either morphological or genomic approach, and alpha-glucosidase inhibitory assay. The result of molecular 16s rRNA gene identification showed FKU2 isolate had closest related to *Nocardia ramosiphila*. FKU2 isolate had antimicrobial activities against *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *K. pneumonia* ESBL, and *Vibrio sp.* in vitro. FKU2 also had alpha glucosidase inhibitor activity of  $7.50 \pm 1.59\%$  at  $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$  extract concentrations of compared to acarbose (control) of  $8.41 \pm 0.43\%$ .

*Keyword: Actinomycetes, Nocardia sp., alpha glucosidase inhibitor, antimicrobial, Moringa oleifera*

---

#### **PENDAHULUAN**

Pencarian produk alami alternatif merupakan suatu keharusan yang berkesinambungan (Donadio et al., 2002). Dalam pencarian senyawa bioaktif unik, kemungkinan terbaik berasal dari metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroba maupun tanaman. Beberapa tahun sebelumnya, semakin banyak ketertarikan dan investigasi terhadap pencarian senyawa bioaktif baru yang berasal dari tanaman. Tetapi, tren terbaru menunjukkan bahwa rerata eksplorasi senyawa bioaktif baru cenderung mengalami penurunan (Lam, 2007). Maka dari itu, terdapat suatu kebutuhan untuk mencari sumber baru yang potensial dan tidak membutuhkan wilayah eksplorasi dan habitat yang luas dalam

pencarian senyawa bioaktif metabolit baru. Tanaman kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dikenal sebagai penghasil senyawa biologis seperti antiproliferasi, hepatoprotektif, anti inflamasi, anti peroksidatif, anti atherosklerotik, pelindung rusaknya DNA karena agen pengoksidasi, kardioprotektif juga beragam kegunaan medis seperti inhibitor alfa glukosidase (Saini et al., 2016). Tanaman didiami oleh mikroorganisme baik bagian atas maupun bawah tanah. Phylloplane adalah bagian aerial tanaman yang didominasi oleh daun. Permukaan daun secara global memiliki habitat yang sangat luas yaitu dua kali luas permukaan daratan dunia. Jika mengasumsikan rerata jumlah bakteri per cm<sup>2</sup> permukaan daun adalah 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup>, maka seluruh jumlah bakteri phylloplane secara global adalah 10<sup>26</sup> sel. Bakteri phylloplane diketahui dapat menghasilkan senyawa seperti hormon tumbuhan (indol-2-acetic acid) dan pigmen (Vorholt 2012), Polisakarida ekstraseluler (EPS)(Chang et al., 2007), Biosurfaktan (Schreiber et al., 2005), juga antibiotik (Stoitsova et al., 2008). Semua senyawa tersebut dihasilkan karena bentuk adaptasinya terhadap lingkungan. Beragam bakteri hidup pada phylloplane seperti kelompok Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacteroidetes dan Actinobacteria (Stark et al., 2010).

Lebih dari 10.000 metabolit sekunder yang berasal dari mikroba telah berhasil ditemukan (Hamaki et al., 2005). Senyawa antimikroba banyak berasal baik dari aktinomiset (bakteri berfilamen) ataupun jamur (Butler & Buss 2006, Newman & Cragg, 2007). Semua antibiotik yang digunakan lebih dari 90% berasal dari aktinomiset dan sekitar dua per tiga dari semua senyawa bioaktif yang dihasilkan mikroba berasal dari aktinomiset (Hamaki et al., 2005). Isolasi rare actinomycetes telah menjadi langkah awal dan paling krusial dalam perkembangan pencarian aktinomiset penghasil senyawa aktif. Rare actinomycetes adalah strain aktinomiset yang jarang ditemukan saat isolasi konvensional dibandingkan dengan strain *Streptomyces* (Tiwari & Gupta, 2012). Jenis rare actinomycetes menghasilkan 2500 senyawa bioaktif dari total lebih dari 10.000 senyawa yang dihasilkan oleh keseluruhan aktinomiset (Berdy, 2005). Sejak dua dekade terakhir, jenis rare actinomycetes mengalami peningkatan hingga 25-30% dalam menghasilkan antibiotik (Tishkov, 2001). Genus *Nocardia* merupakan kelompok rare-aktinomiset penting dalam pencarian senyawa bioaktif. Sebanyak lima lipopeptida terbaru yaitu peptidolipins B-F berhasil diisolasi dari *Nocardia* sp. asal laut (Tiwari & Gupta, 2012). *Nocardia levis* MK-VL\_113 diketahui menghasilkan senyawa antimikroba terhadap bakteri Gram positif, Gram negatif, khamir dan jamur berhifa (Kavitha et al., 2009).

Diabetes melitus adalah kelainan metabolis dengan ciri meningkatnya kadar glukosa dalam darah setelah makan atau postprandial. Pengendalian hiperglikemia postprandial telah diketahui menjadi faktor penting dalam pengobatan diabetes melitus. Alfa glukosidase disekresi dari epitel usus yang bertanggung jawab terhadap degradasi karbohidrat. Alfa glukosidase inhibitor menjadi kelas baru sebagai obat antidiabetes. Alfa glukosidase inhibitor memperlambat proses penguraian dan absorpsi karbohidrat sebagai inhibitor kompetitif untuk enzim glukosidase. Sejumlah alfa glukosidase inhibitor seperti akarbosa dan voglibosa diperoleh dari sumber alami (Playford et al., 2013). Hanya sedikit saja inhibitor alfa glukosidase yang tersedia secara komersil. Hal ini membuat pencarian alfa glukosidase inhibitor baru dari sumber alami menjadi hal penting. Sejauh ini belum ada penelitian tentang pencarian aktinomiset asal phylloplane kelor terutama genus *Nocardia* serta potensinya dalam menghasilkan senyawa bioaktif seperti inhibitor alfa glukosidase. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengevaluasi senyawa aktif seperti antimikroba dan inhibitor alfa glukosidase dari *Nocardia* sp. yang berasal dari phylloplane kelor.

## **METODE**

### ***Waktu dan Tempat Penelitian***

Pengambilan sampel dilakukan pada tanggal 27 Maret 2018 dari pohon kelor di sekitar Rawamangun, Jakarta, Indonesia. Identifikasi tanaman kelor dilakukan oleh Lana Maulana dari Herbarium Biologi Universitas Negeri Jakarta.

### ***Prosedur Penelitian***

#### ***Metode Isolasi Aktinomiset. Phylloplane Kelor (*Moringa oleifera*)***

Metode isolasi aktinomiset phylloplane menggunakan metode pencucian (Jacques & Morris, 1995). Sebanyak 10 g daun kelor dipotong menjadi bagian kecil kemudian dimasukkan ke dalam botol berisi 90 mL garam fisiologis steril, selanjutnya dihomogenkan selama 1 jam. Kemudian aktinomiset diisolasi dengan teknik cawan sebar pada pengenceran 10-1-10-4 menggunakan media Humic Acid Vitamin Agar (CaCO<sub>3</sub> 0.02 g l-1, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g l-1, MgSO<sub>4</sub> 0.05 g l-1, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g l-1, KCL 1.7 g l-1, Agar 20 g l-1). Sebanyak 40 mL stok *Humic Acid* (1 g *Humic acid* dimasukkan dalam 40 mL NaOH 0.4%) ditambahkan pada 1 L media. Sebanyak 5 mL Vitamin B (0.25 g Vit. B dicampurkan ke dalam 200 mL akuades steril) dimasukkan ke dalam 1 L media (Hayakawa & Nonomura, 1987). Daun diberi perlakuan panas di dalam oven pada suhu 70 °C selama 15 menit (Ilsan et al., 2016). Sebanyak 50 ppm asam nalidiksat dan 50 ppm nistatin ditambahkan pada media isolasi. Tumbuhnya isolat diamati pada 2-3 minggu masa inkubasi. Isolat yang diperoleh kemudian dimurnikan pada media padat Yeast Starch Agar (Soluble starch 10 g l-1, Kasein 0.6 g l-1, KNO<sub>3</sub> 2 g l-1, NaCl 2 g l-1, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.05 g l-1, CaCO<sub>3</sub> 0.02 g l-1, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.01 g l-1, Agar 20 g l-1, Yeast extract 2.5 g l-1).

#### ***Observasi Morfologi Isolat Aktinomiset***

Isolat Aktinomiset diobservasi pada media YSA selama 14 hari inkubasi. Isolat diobservasi menggunakan mikroskop cahaya (Olympus CX22) dan Scanning Electron Microscope (SEM). Preparasi sampel untuk observasi SEM mengacu pada metode yang dilakukan Goldstein et al. (1992). Sampel yang berisi isolat direndam pada bufer caccodylate selama 2 jam, kemudian sampel dihomogenkan pada ultrasonic cleaner selama 5 menit. Sampel difiksasi pada glutaraldehid 2.5% selama 2 hari. Selanjutnya, sampel direndam pada tannic acid 2% selama 1 hari, kemudian dibilas menggunakan bufer caccodylate selama 5 menit. Sampel kemudian didehidrasi menggunakan etanol sampai mengering. Sampel kering diletakkan diatas aluminium stub. Sampel dilapisi dengan lapisan tipis emas menggunakan ion coater. Sampel yang telah siap diamati menggunakan SEM (JEOL-JSM 5310LV) pada perbesaran 750 kali.

#### ***Isolasi DNA Genom Isolat Aktinomiset***

Isolasi DNA genom mengacu pada Sambrook & Russel (2001). Sebanyak 1.5 mL biakan bakteri berusia 24 jam inkubasi dimasukkan ke Eppendorf berukuran 1.5 mL lalu disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk dicuci dengan bufer Sodium Chloride-Tris-EDTA (STE) (komposisi: 0.3 M sukrosa; 25 mM Tris-HCL; 25 mM EDTA.2Na pH 8), kemudian disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Pelet dicuci

sebanyak 3 kali secara berulang, kemudian supernatan dibuang. Pelet ditambahkan sebanyak 200  $\mu\text{L}$  bufer STE dan 45  $\mu\text{L}$  lisozim (20 mg/mL) kemudian dihomogenisasi selanjutnya diinkubasi pada suhu 55 °C selama 1 jam. Sebanyak 20  $\mu\text{L}$  proteinase-K (20 mg/mL) ditambahkan pada campuran tersebut dan diinkubasi pada suhu 55 °C selama 60 menit. Selanjutnya ditambahkan 400  $\mu\text{L}$  10% CTAB dalam larutan 0.7 M NaCl lalu diinkubasi pada suhu 65 °C selama 30 menit. Kemudian ke dalam larutan ditambahkan 1 kali volume fenol:kloroform (25:24) dan disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Fase bening dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 0.6 kali volume isopropanol dan 20  $\mu\text{L}$  natrium asetat, inkubasi dilakukan pada suhu -20°C selama satu malam. Selanjutnya disentrifugasi 12000 rpm selama 10 menit. Bagian supernatan dibuang sedangkan pada pelet dicuci menggunakan alkohol 70 % sebanyak 1 mL. DNA dikeringanginkan selama 1 jam untuk membuang alkohol lalu dilarutkan ke dalam 50  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O steril, selanjutnya hasil isolasi DNA disimpan pada 4 °C atau -20°C.

#### *Amplifikasi Gen 16S rRNA Isolat Aktinomiset*

Gen 16S rRNA dari DNA genom diamplifikasi dengan mesin Polymerase Chain Reaction (PCR) (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems) dan primer spesifik prokariot (Marchesi et al., 1998), yaitu primer forward 63f (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') and primer reverse 1387r (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'). Komposisi reaksi PCR terdiri atas enzim La Taq DNA polimerase 0.5  $\mu\text{L}$ , 2x bufer GC 25  $\mu\text{L}$ , dNTP mixture 8  $\mu\text{L}$ , masing-masing primer (10 pmol) 1.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ , dan DNA template 4  $\mu\text{L}$ . Kondisi PCR yang digunakan yaitu pre-denaturasi (94 °C, 4 menit), denaturasi (94 °C, 45 detik), annealing (55 °C, 1 menit), elongation (72 °C, 1 menit 10 detik), dan post PCR (72 °C, 7 menit) selama 30 siklus. Pemisahan DNA produk PCR dilakukan pada mesin elektroforesis mini-gel menggunakan agarosa 1% pada tegangan listrik 75 Volt selama 45 menit. Visualisasi DNA dilakukan diatas UV transluminator menggunakan pewarna Ethidium Bromida (EtBr).

Hasil ampikon disekuensing menggunakan jasa *First Base*. Data hasil sekuensing selanjutnya di *trimming* dan di *assembling* menggunakan program ChromasPro version 1.5. Data yang telah di assembling selanjutnya di BLAST dengan data genom yang telah didaftarkan NCBI/ *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Beberapa data sekuen hasil BLAST yang merupakan spesies terdekat dan merupakan type strain dari masing-masing spesies tersebut diambil dari data GenBank di NCBI. Selanjutnya data dianalisis kembali dengan mensejajarkan sekuen tersebut dengan menggunakan program MEGA 6.1 (Tamura et al., 2011) selanjutnya dilakukan konstruksi pohon flogenetik untuk menunjukkan tingkat kekerabatan isolat FKU1 dengan mikroba lain menggunakan metode Neighbor Joining Tree dengan bootstrap yang digunakan adalah 1000 ulangan (Felsenstein, 1985).

#### *Uji Penghambatan Isolat terhadap bakteri patogen*

Uji penghambatan isolat FKU1 dan FKU2 terhadap bakteri patogen menggunakan metode plug agar (Charousova et al., 2017). Strain patogen yang digunakan adalah E. coli ATCC 25922, Staphylococcus aureus ATCC 25923, Vibrio sp., Bacillus sp., Klebsiella pneumonia yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan Klebsiella pneumonia Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) berasal dari penelitian sebelumnya yang diidentifikasi menggunakan Vitek 2 Compact (BioMerieux, USA). Inokulum bakteri patogen uji yang digunakan memiliki kepadatan 10<sup>7</sup>

CFU mL<sup>-1</sup> dengan OD 0.6 pada panjang gelombang 530 nm menggunakan spektrofotometer UV-vis. Kultur bibit bakteri patogen ditumbuhkan pada media Mueller Hinton Broth (MHB) dengan waktu inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C diatas inkubator bergoyang dengan kecepatan 120 rpm. Kemudian 1 mL kultur bibit dicampurkan pada 100 mL media Mueller Hinton Agar (MHA), selanjutnya dituang pada cawan Petri. Plug agar yang berisi kultur isolat pada media padat YSA dengan masa inkubasi 7 hari dipindahkan dengan pelubang berdiameter 6 mm sesaat setelah media bibit tersebut memadat. Kemudian media antagonis diinkubasi selama 24 jam untuk melihat adanya zona penghambatan.

#### *Uji Inhibitor Alfa Glukosidase*

Ekstrak kering kultur aktinomiset yang diperoleh dilarutkan pada Dimethyl Sulfoxide (DMSO) hingga konsentrasi mencapai 10000 µg mL<sup>-1</sup> sebagai larutan stok sampel. Stok sampel ekstrak dilarutkan hingga konsentrasi 0.01; 0.05; 1; 5; dan 10 µg mL<sup>-1</sup>. Larutan stok enzim dilarutkan pada 100 mM bufer fosfat pH 7 yang berisi BSA. Larutan enzim yang digunakan memiliki konsentrasi 0.015 u mL<sup>-1</sup>. Larutan substrat terdiri dari 20 mM p-NPG yang dilarutkan pada 100 mM bufer fosfat pH 7. Campuran reaksi mengandung 20 µL sampel, 100 µL 100 mM bufer fosfat pH 7 dan 100 µL 20 mM p-NPG. Setelah campuran reaksi diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37 °C, sebanyak 100 µL enzim ditambahkan dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37 °C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1600 µL 200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Absorban diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 400 nm. Aktivitas inhibisi alfa glukosidase ditentukan dengan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = [(C-S)/C] \times 100\%$$

Dengan C adalah selisih absorban kontrol dengan blanko, dan S adalah selisih absorban sampel S1 dengan S0 (Pujiyanto et al., 2012). Akarbosa digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian ini. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Standar deviasi ditentukan menggunakan Microsoft excell.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

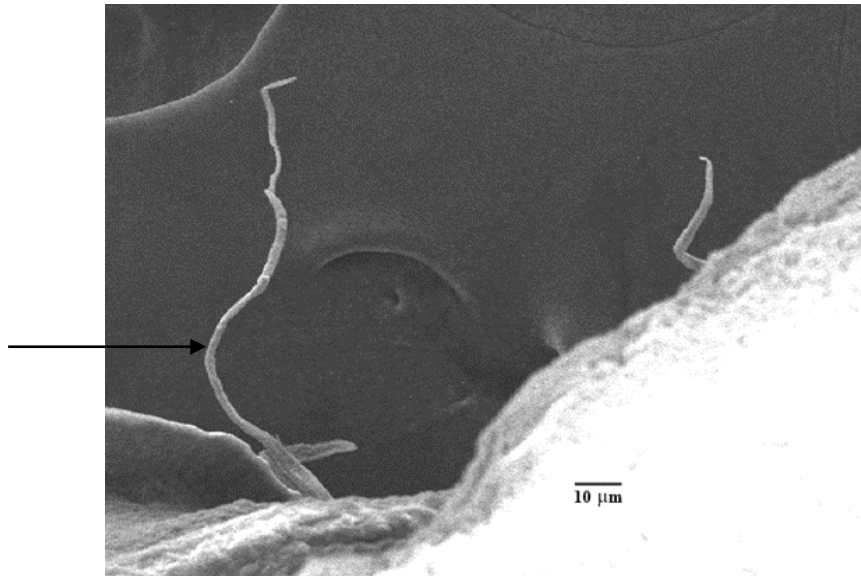
Hasil isolasi aktinomiset phylloplane kelor menggunakan media HV diperoleh total sebanyak 2 isolat yaitu FKU1 dan FKU2. Hanya isolat FKU2 yang memiliki aktivitas inhibitor alfa glukosidase sehingga isolat FKU2 dilakukan karakterisasi morfologi dan identifikasi molekuler. Observasi isolat menggunakan mikroskop cahaya dan *Scanning Electron Microscope* (SEM) (Gambar 1 dan 2).



(a)

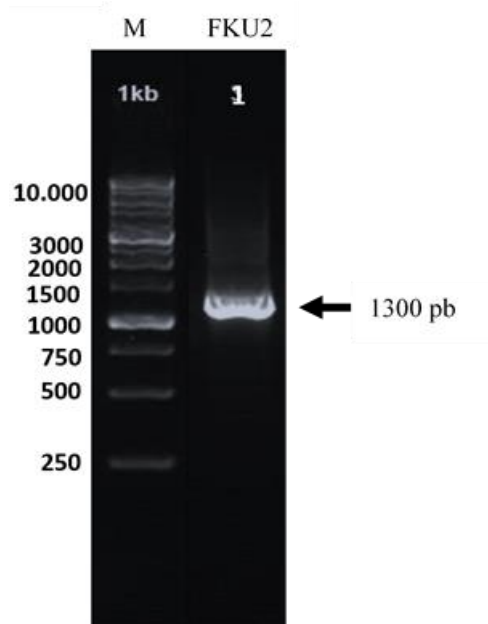
(b)

Gambar 1. Pengamatan karakteristik morfologi isolat FKU2. Pertumbuhan koloni di media YSA umur 14 hari (a), Pengamatan koloni di media YSA umur 14 hari pada perbesaran 100x. Tampak hifa terlihat seperti serabut halus (b), Pengamatan hifa tanpa pewarnaan pada perbesaran 400x



Gambar 2. Pengamatan *Scanning Electron Microscope* (SEM) Hifa isolat FKU2 . Tanda panah menunjukkan hifa koloni yang khas pada aktinomiset

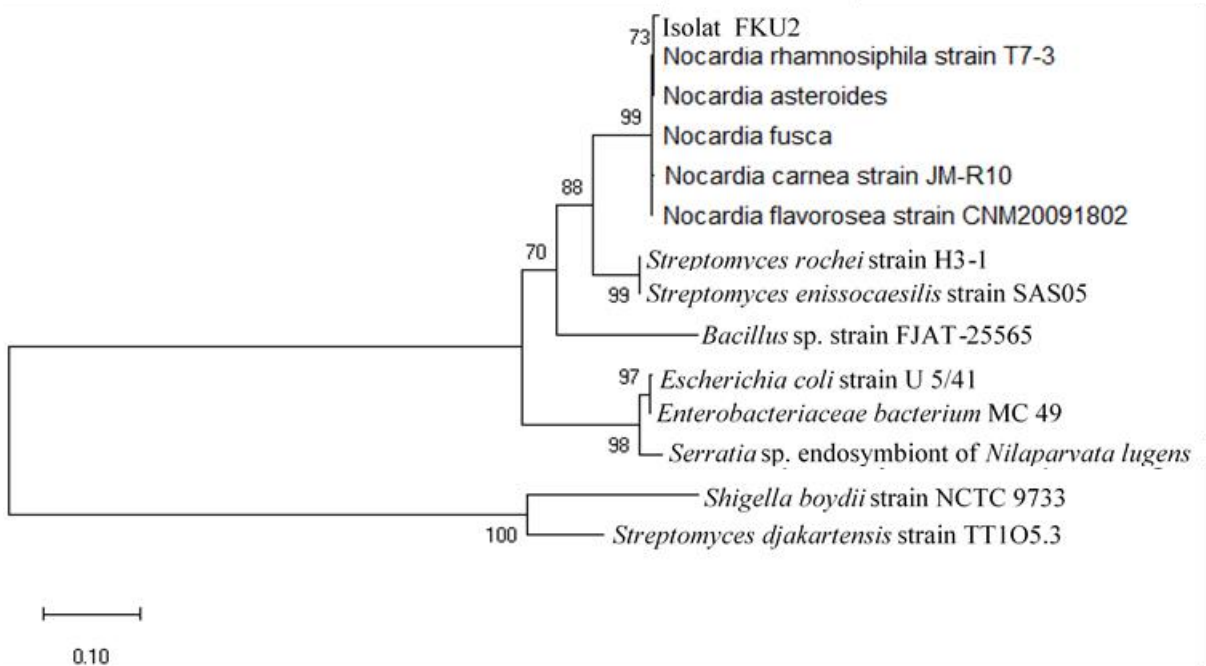
Hasil amplifikasi gen 16S rRNA isolat aktinomiset menunjukkan panjang pasang basa sesuai dengan target yaitu 1300 pb (Gambar 3). Sekuen parsial gen 16S rRNA isolat FKU2 hasil amplifikasi memiliki kemiripan dan berkerabat dekat dengan gen 16S *Nocardia rhamnosiphila* sebesar 99% (Tabel 1 dan Gambar 4).



Gambar 3. Amplifikasi PCR isolat FKU2 menggunakan daerah gen 16S rRNA dengan primer 63f dan primer 1387r; M = marker 1 Kb ladder.

Tabel 1. Hasil BLAST sekuen gen 16S rRNA

Isolat	Deskripsi	Query cover (%)	E-value	Identity (%)	Accession No.
FKU 2	<i>Nocardia rhamnosiphila</i> strain T7-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100	00.00	99	KJ571083.1



Gambar 4. Pohon Filogenetik yang menggambarkan kedekatan isolat FKU2 terhadap bakteri lain dalam satu clade maupun terhadap clade lain. Konstruksi berdasarkan metode Neighbor Joining Tree dengan nilai bootstrap 1000x

Isolat aktinomiset memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae* ESBL, dan *Vibrio sp.* secara in-vitro (Tabel 2).

Tabel 2. Aktivitas penghambatan isolat aktinomiset terhadap pertumbuhan bakteri patogen. Diameter zona bening diukur dalam mm

Patogen uji	Diameter zona Inhibisi (mm)					
	FKU 1	FKU 2	$\Delta$	Awal	Akhir	$\Delta$
<i>E. coli</i>	6	6	6,58±0,16 <sup>a</sup>	11,36	23,66	12,31±0,16 <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	6	6,69±0,11 <sup>a</sup>	11,78	24,35	12,57±0,18 <sup>a</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6	7,19±0,13 <sup>b</sup>	9,58	22,77	13,19±0,07 <sup>b</sup>
<i>K. pneumoniae</i> ESBL	6	6	7,54±0,11 <sup>c</sup>	11,36	24,89	13,54±0,24 <sup>c</sup>
<i>Vibrio sp.</i>	6	7	7,16±0,29 <sup>b</sup>	9,79	22,97	13,19±0,08 <sup>b</sup>

Hasil menunjukkan hanya Isolat FKU2 memiliki aktivitas inhibitor alfa glukosidase (Tabel 3).

Tabel 3. Aktivitas inhibitor alfa glukosidase isolat FKU 1 dibandingkan dengan akarbosa

Konsentrasi ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Inhibisi (%)	
	Akarbosa	FKU2
0.01	$8.14 \pm 0.430$	$7.50 \pm 1.591$
0.05	$45.30 \pm 0.036$	$9.71 \pm 1.801$
1	$56.41 \pm 0.012$	$9.18 \pm 0.314$
5	$81.33 \pm 0.056$	$9.45 \pm 0.314$
10	$84.19 \pm 0.006$	$8.62 \pm 0.913$

Bakteri berfilamen atau dikenal dengan aktinomiset merupakan bakteri Gram-Positif yang telah diketahui dapat memproduksi beragam senyawa bioaktif seperti antimikroba, inhibitor enzim dan enzim pendegradasi bahan organik. Aktinomiset juga telah diketahui mampu menghasilkan beragam senyawa bioaktif yaitu sekitar 70% senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri (Berdy, 2005). Isolasi aktinomiset pada penelitian ini menggunakan media *Humic Acid Vitamin* (HV) dengan komposisi utama asam humat serta sampel daun dilakukan pre-treatment berupa pemberian panas di dalam oven pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Metode isolasi merupakan hal yang krusial dalam pencarian aktinomiset yang dapat dikultur. Penelitian dalam mengisolasi aktinomiset asal phylloplane belum banyak dilakukan sehingga membutuhkan beberapa modifikasi dari isolasi aktinomiset asal tanah baik media, inhibitor maupun pre-treatment. Media selektif yang mengandung asam humat digunakan luas untuk memacu pertumbuhan aktinomiset dari tanah dan air serta menekan kontaminan seperti bakteri dan jamur (Hayakawa & Nonomura, 1987; Khanna et al., 2011). Perlakuan pemanasan kering sampel menyebabkan koloni bakteri tertekan sedangkan aktinomiset yang tumbuh lambat akan terpacu untuk tumbuh (Hayakawa, 2008).

Sebanyak dua isolat yang diduga aktinomiset berhasil diisolasi dari phylloplane kelor. Jumlah isolat yang berhasil diisolasi pada penelitian ini cukup kecil dibandingkan dengan isolasi pada daun tanaman lain seperti padi (Ilsan et al., 2016). Jenis media dan perlakuan sampel daun sebelum dilakukan isolasi menjadi faktor kritis dalam keberhasilan proses isolasi aktinomiset. Pengamatan morfologi isolat baik menggunakan mikroskop cahaya dan *Scanning Electron Microscope* (SEM) (Gambar 1 dan 2) menunjukkan bahwa isolat FKU2 yang berhasil diisolasi memiliki hifa/filamen. Ciri khas dari aktinomiset adalah bakteri Gram-Positif yang memiliki hifa. Hasil amplifikasi gen 16S rRNA isolat FKU2 menunjukkan panjang fragmen DNA yang diharapkan yaitu sepanjang 1300 pb (Gambar 1). Sekuen parsial gen 16S rRNA dibandingkan dengan sekuen gen 16S rRNA pada database Genbank (Tabel 1). Hasil BLAST menunjukkan bahwa sekuen parsial gen 16S rRNA isolat FKU2 memiliki kemiripan 99% dengan *Nocardia rhamnosiphila* strain T7-3. Analisis pohon filogenetik menunjukkan isolat FKU2 berkerabat dekat dengan *Nocardia rhamnosiphila* strain T7-3 (Gambar 4).

Aktinomiset merupakan kelompok penting yang termasuk dalam kategori bakteri pembentuk spora yang dapat berasosiasi dengan tanaman. Telah diketahui bahwa aktinomiset dapat menjadi pengendali hayati patogen tanaman, pemacu tumbuh tanaman serta interaksinya dengan tanaman. Aktinomiset yang paling sering dijumpai adalah *Nocardia*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, dan *Agromyces*. Kelompok ini telah ditemukan pada phylloplane aprikot (Jo et al., 2015) dan banyak tanaman yang toleran terhadap salinitas (del Rocio Mora-Ruiz et al., 2015). Rare actinomycetes adalah



kelompok aktinomiset yang bukan merupakan anggota genus *Streptomyces*. Sekarang ini, eksplorasi rare actinomycetes telah menjadi penting dalam mencari senyawa bioaktif baru dan memiliki aktivitas yang tinggi terutama sebagai antimikroba. *Nocardia* merupakan salah satu genus dari rare actinomycetes yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif. *Nocardia* umum berada di tanah (Kavitha et al., 2009) tetapi jenis tertentu juga dapat menyebabkan penyakit. *Nocardia levis* MK-VL\_113 yang berasal dari tanah diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen maupun jamur (Kavitha et al., 2010). *Nocardia levis* MK-VL\_113 memiliki aktivitas yang baik dalam menghambat pertumbuhan diantaranya *Bacillus subtilis*, *E. coli* serta *Staphylococcus aureus*. Hal ini serupa dengan hasil yang diperoleh bahwa isolat FKU2 yang merupakan genus *Nocardia* memiliki aktivitas antibakteri secara in-vitro terhadap bakteri patogen seperti *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBL), dan *Vibrio* sp. (Tabel 2).

Isolat FKU2 yang merupakan genus *Nocardia* memiliki aktivitas inhibitor alfa glukosidase (Tabel 3) walaupun aktivitasnya tidak sebaik akarbose sebagai kontrol. Akarbose merupakan inhibitor alfa glukosidase komersil yang telah dikenal luas sebagai obat untuk diabetes melitus tipe 2. Isolat FKU2 memiliki aktivitas inhibitor alfa glukosidase sebesar  $7.50 \pm 1.59$  % penghambatan pada konsentrasi ekstrak  $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$  dibandingkan dengan akarbose (kontrol) yaitu sebesar  $8.41 \pm 0.43$  %. Inhibitor alfa glukosidase adalah salah satu obat dalam mengatasi penyakit diabetes melitus tipe 2. Mekanisme inhibitor alfa glukosidase adalah dengan menghambat pemecahan karbohidrat kompleks (pati) menjadi glukosa dari usus menuju ke darah. Inhibitor alfa glukosidase dapat diproduksi oleh beberapa organisme, termasuk mikroba. Sebagai contoh adalah akarbose, yaitu inhibitor alfa glukosidase komersial yang diproduksi oleh *Actinoplanes* sp. yang merupakan aktinomiset yang berhasil diisolasi dari Kenya (McGown, 2006).

## SIMPULAN

Sebanyak dua isolat aktinomiset berhasil diisolasi. Isolat FKU2 telah diidentifikasi secara molekuler memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Nocardia rhamnosiphila*. Isolat FKU2 memiliki aktivitas antimikroba terhadap *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae* ESBL, *Vibrio* sp. secara in-vitro. Isolat FKU2 memiliki aktivitas inhibitor alfa glukosidase sebesar  $7.50 \pm 1.59$  % penghambatan pada konsentrasi ekstrak  $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$  dibandingkan dengan akarbose (kontrol) yaitu sebesar  $8.41 \pm 0.43$  %.

## ACKNOWLEDGMENT

Penelitian ini terlaksana atas bantuan dana hibah Penelitian Dosen Pemula dari Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia (RISTEK DIKTI) untuk dosen STIKes Mitra Keluarga, Prodi Teknologi Laboratorium Medik pendanaan tahun 2018. Maka dari itu, kami mengucapkan terima kasih atas dana yang diberikan untuk terlaksananya penelitian ini

## DAFTAR PUSTAKA

Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiotic*. 58:1-26.

- Butler MS, Buss AD. 2006. Natural products-the future scaffolds for novel antibiotics? *Biochem. Pharmacol.* 71:919–929.
- Chang WS, Mortel M, Nielsen L, Guzman GN, Li X, Halverson LJ. 2007. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *J. Bacteriol.* 189, 8290–8299.
- Charousova I, Medo J, Halenarova E, Javorekova S. 2017. Antimicrobial and enzymatic activity of actinomycetes isolated from soils of coastal islands. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 8(2):46-51.
- del Rocío Mora-Ruiz M, Font-Verdera F, Díaz-Gil C. 2015. Moderate halophilic bacteria colonizing the phylloplane of halophytes of the subfamily Salicornioideae (Amaranthaceae). *Syst. Appl. Microbiol.* 38:406–416.
- Donadio S, Monciardini P, Alduina R, Mazza P, Chiocchini C, Cavaletti L, Sosio M, Puglia A-M. 2002. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J. Biotechnol.* 99:187–198.
- Felsenstein. J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39(4):783–791.
- Goldstein JIDE, Newbury P, Echlin DC, Joy AD, Romig, Jr, CE, Lyman C, Fiori, Lifshin E. 1992. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis: A text for biologist, materials scientist, and cytologist. 2nd ed. Plenum Press, New York, 820 p.
- Hayakawa M, Nonomura H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Tech.* 65:501-509.
- Hayakawa M. 2008. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes. *Actinomycetologica.* 22:12-19.
- Hamaki T, Suzuki M, Fudou R, Jojima Y, Kajiura T, Tabuchi A, Sen K, Shibai H. 2005. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *J. Biosci. Bioeng.* 99:485–492.
- Ilsan NA, Nawangsih AA, Wahyudi AT. 2016. Rice Phyllosphere actinomycetes as biocontrol agent of bacterial leaf blight disease on rice. *Asian. J. Plant. Pathol.* 10(1-2):1-8.
- Jacobs JL, Carroll TL, Sundin GW. 2005. The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria. *Microbiol. Ecol.* 49:104–113.
- Jacques MA, Morris CE. 1995. A review of issues related to the quantification of bacteria from the phyllosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18:1-14.
- Jo Y, Cho JK, Choi H. 2015. Bacterial communities in the phylloplane of Prunus species. *J. Basic Microbiol.* 55:504–508.
- Kavitha A, Prabhakar P, Vijayalakshmi M, Venkateswarlu Y. 2009. Production of bioactive metabolites by *Nocardia levis* MK-VL\_113. *Let. Appl. Microbiol.* 49:494-490.
- Kavitha A, Prabhakar P, Narasimhulu M, Vijayalakshmi M, Venkaterwarlu Y, Rao KV, Raju VBS. 2010. Isolation, characterization and biological evaluation of bioactive metabolites from *Nocardia levis* MK-VL\_113. *Micriobiol. Res.* 165:199-210.
- Khanna M, Solanki R, Lal R. 2011. Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.* 2:357- 375.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Dymock D, Wade WG. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:795-799.
- Lam KS. 2007. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiol.* 15(6):279-289.
- McGown J. 2006. Out of Africa: Mysteries of Access and Benefit Sharing. Washington (USA): The Edmonds Institute.

- Mikami Y. 2007. Biological work on medically important *Nocardia* species. *Actinomycetologica*. 21:46–51.
- Newman DJ, Cragg GM. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70:461–477.
- Playford RJ, Pither C, Gao R. 2013. Use of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose in patients with ‘Middleton syndrome’: normal gastric anatomy but with accelerated gastric emptying causing postprandial reactive hypoglycemia and diarrhea. *Can. J. Gastroenterol.* 27:403–404.
- Pujiyanto S, Lestari Y, Suwanto A, Budiarti S, Darusman LK. 2012. Alpha-glucosidase inhibitor activity and characterization of endophytic actinomycetes isolated from some Indonesian diabetic medicinal plants. *Int. J. Pharm. Pharm Sci.* 4(1):327-333.
- Saini RK, Sivanesan I, Keum Y. 2016. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. *3 Biotech.* 6(203):1-14.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- Schreiber L, Krimm U, Knoll D, Sayed M, Auling G, Kroppenstedt RM. 2005. Plant–microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytol.* 166:589–594.
- Stark M, Berger SA, Stamatakis A, von Mering C. 2010. MLTreeMap - accurate Maximum Likelihood placement of environmental DNA sequences into taxonomic and functional reference phylogenies. *BMC Genomics.* 11:461.
- Stoitsova SO, Braun Y, Ullrich MS, Weingart H. 2008. Characterization of the RND-type multidrug efflux pump MexAB-OprM of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3387–3393.
- Tishkov S. 2001. Bioactive Products from Actinomycetes—antibiotics, Enzyme Inhibitors, Immunomodulators. In: Moncheva P, Tishkov S, Chipeva V, ed. *Innovative Aspects in Biotechnology of Prokaryotes*. Sofia: National bank for industrial microorganisms and cell cultures. 111–138.
- Tiwari K, Gupta RK. 2012. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32:108–132.
- Vorholt JA. 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Rev. Microbiol.* 10:828-840.