

Purifikasi dan karakterisasi senyawa anti-bakteri dari actinomycetes asosiasi spons terhadap bakteri patogen resisten

Purification and characterization of anti-multidrug resistances bacteria from actinomycetes associated sponge

Herlina Rante^{1,2*}, Wahyono², Yosi B.Murti² dan Gemini Alam¹

¹Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar

²Bagian Biologi Farmasi Fak.Farmasi UGM, Yogyakarta

Abstrak

Actinomycetes merupakan salah satu jenis mikroorganisme yang sangat penting sebagai penghasil metabolit sekunder untuk pengobatan. Senyawa bioaktif diperoleh melalui beberapa metode penapisan untuk menghasilkan senyawa dan strain baru. Tujuan dari penelitian ini untuk mengkarakterisasi senyawa antibakteri dari actinomycetes asosiasi spons dan mengidentifikasi bakteri actinomycetes berdasarkan karakteristik morfologi dan fisiologinya. Isolasi actinomycetes dari spons dilakukan secara *pour* dan *spread plate*. Dari beberapa isolat actinomycetes yang diperoleh dari spons yang dikoleksi dari pulau Barrang-Lompo, Makassar Sulawesi Selatan Indonesia, satu diantaranya menunjukkan aktivitas yang kuat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* resisten antibiotik hingga konsentrasi 0,0195 µg. Hasil yang diperoleh dari karakterisasi senyawa antibakteri berdasarkan data IR diduga senyawa turunan karboksilat dan identifikasi bakteri actinomycetes yang diisolasi dari spons berdasarkan karakteristik morfologi dan fisiologi menunjukkan strain *Streptomyces sp.*

Kata kunci : spons, actinomycetes, metabolit sekunder, bakteri resisten

Abstract

Actinomycetes are one kind of the microorganisms that very important producer of secondary metabolites for drugs. Active substances of microbial origin have been searched through a series of screening methods to obtain novel compounds and strains. The purpose of this research was to characterize the antibacterial compound from actinomycetes associated sponge and identification of actinomycetes base on morphology and physiology characteristic. Isolation of actinomycetes from sponge were done by pour and spread plate. A total of actinomycetes strain were isolated from sponges collected at Barrang Lompo island, Makassar, South Sulawesi, Indonesia. One of them showed strong activity against antibiotic resistant bacteria with concentration 0.0195µg. Characterisation of antimicrobial compound base on IR spectrum determined derivate of carboxylic acid. The result obtained from the morphological and physiological characterisation, determined the strain a *Streptomyces sp*

Key words: sponges, actinomycetes, secondary metabolic, bacteria resisten

Pendahuluan

Peningkatan terapi antimikroba dan penemuan anggota-anggota baru golongan antimikroba melalui cara penapisan kimia sintetik atau fermentasi, memacu

perkembangan produksi senyawa antimikroba selama dasawarsa terakhir. Di sisi lain permasalahan resistensi antimikroba juga semakin meningkat seiring dengan peningkatan penggunaannya. Hal ini memicu dilakukannya

eksplorasi terhadap sumber daya alam sebagai upaya mengatasi masalah resistensi ini.

Data dari National Cancer Institute (Washington), yang telah melakukan proses skrining menunjukkan bahwa beberapa biota laut memiliki aktivitas biologi. Lebih dari 20 kategori senyawa bioaktif yang berbeda-beda telah ditemukan, seperti antivirus, antibiotik, antiinflamasi, antileukimia, dan insektisidal, sitotoksin, antihelmentik dan antikanker (Burrens and Clement, 1993; Crews and Hunter, 1993). Senyawa bioaktif tersebut umumnya ditemukan pada kelompok spons laut (Zhang *et al.*, 2006). Beberapa mikrobia yang ditemukan berasosiasi dengan spons juga menghasilkan komponen bioaktif (Gandhimathi *et al.*, 2008). Mikrobia tersebut, misalnya kelompok actinomycetes membentuk suatu simbiotik dengan spons baik di dalam inti sel (simbiosis intranukleus), di dalam sitoplasma sel tubuh spons (simbiosis intraseluler), di sisi dalam tubuh spons (endosimbiosis ekstraseluler), serta dibagian luar tubuh spons (eksosimbiosis ekstraseluler). Actinomycetes merupakan kelompok mikrobia yang paling banyak menghasilkan senyawa bioaktif antibiotika (70 %), fungi (20 %) dan bakteri (10 %) (Atlas, 1998). Spons ini diperoleh dari Pulau Barrang lombo Makassar sebanyak 16 jenis spons yang selanjutnya dilakukan isolasi bakteri actinomycetes yang berasosiasi dengan spons tersebut, isolat actinomycetes yang diperoleh kemudian dilakukan skrining aktifitas antibakterinya terhadap bakteri uji untuk mendapatkan isolat actinomycetes yang memiliki aktifitas antibakteri yang paling besar. Tujuan penelitian ini untuk mengkarakterisasi senyawa antibakteri dari actinomycetes asosiasi spons dan mengidentifikasi bakteri actinomycetes berdasarkan karakteristik morfologi dan fisiologinya

Metodologi

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah spons yang dikoleksi dari pulau Barrang-Lompo Makassar, media Starch Nitrate agar (SNA), Starch Nitrate broth (SNB), Nutrient agar (NA), Nutrient broth (NB), media International Streptomyces Project (ISP), kertas cakram, isolat bakteri *Escherichia coli* ATCC 2592 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Koleksi laboratorium

mikrobiologi Farmasi UGM), *E.coli* resisten antibiotik, *S. aureus* resisten antibiotik, silica gel 60 F₂₅₄, silica gel 60 PF₂₅₄. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah penggojok, mikroskop cahaya, cawan petri, inkubator, pemotong silinder, autoklaf, dan alat-alat gelas.

Isolasi Actinomycetes

Spons-spons laut diperoleh dari perairan Pulau Barrang-Lompo Makassar, Sulawesi Selatan dengan penyelaman SCUBA (*Self contained Underwater Breating Apparatus*) pada kedalaman antara 4 sampai 20 meter dari permukaan laut.

Isolasi Actinomycetes dari spons dilakukan dengan *pour* dan *spread plate* untuk mendapatkan koloni tunggal. Spons yang ada selanjutnya dicuci dengan air laut steril sebanyak lima kali selanjutnya dipotong dengan ukuran 1cm³ dan dihomogenkan dengan 10 x volume air laut steril. Sebanyak 1 mL dari suspensi spons (pengenceran 10⁻¹) tersebut dipindahkan ke dalam 9 mL aquades steril, kemudian dibuat deretan pengenceran. Sebanyak 0,1 mL dari pengenceran tersebut disebar ke dalam medium SNA. Selanjutnya cawan diinkubasi pada suhu 28° C selama 4 minggu, dan koloni yang menunjukkan actinomycetes dilakukan re-isolasi untuk mendapatkan koloni tunggal. Koloni yang telah murni selanjutnya diinokulasikan ke dalam media SNA miring untuk digunakan pada penelitian selanjutnya.

Penentuan aktifitas antibakteri isolate actinomycetes

Identifikasi awal dari actinomycetes yang menghasilkan senyawa antibakteri dilakukan dengan cara uji hayati sebagai berikut: semua isolat actinomycetes ditumbuhkan ke dalam media SNA, kemudian cakram actinomycetes yang berumur 7 hari inkubasi pada media SNA ditempatkan di permukaan media NA yang telah berisi bakteri uji. Selanjutnya inkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Masing-masing isolat diamati kemampuannya menghambat bakteri uji yang ditandai dengan terbentuknya zona jernih disekitar cakram uji dan di evaluasi : >20 mm (*strong inhibition*), 5-10 mm (*moderate inhibition*) and <5 mm (*weak inhibition*).

Isolat yang stabil membentuk zona jernih pada 3 kali pengujian dipilih sebagai isolat untuk pengujian selanjutnya.

Fermentasi, ekstraksi dan uji aktivitas antibakteri isolat actinomycetes

Fermentasi (produksi senyawa metabolit)

Isolat aktif dibuat prekulturr pada labu erlenmeyer 500 mL yang mengandung 100 mL medium cair SNB dan diinkubasi pada suhu 28° C selama 3 hari. Prekultur (*starter*) dipindahkan

ke dalam erlenmeyer 500 mL yang mengandung 100 mL medium yang sama. Fermentasi dilakukan pada suhu 28° C selama 11 hari pada kondisi tergojok pada laju penggojokan 150 rpm.

Ekstraksi senyawa metabolit

Setelah fermentasi selama 11 hari, media pertumbuhan mikrobial disaring untuk memisahkan biomassa dan cairan fermentasi. Cairan fermentasi diekstraksi 2 kali dengan pelarut etilasetat (1:1 v/v) dalam corong pisah selama 20 menit. Ekstrak yang diperoleh diuapkan lalu disimpan pada desikator untuk digunakan pada uji selanjutnya.

Uji aktivitas antimikroba

Aktivitas antimikroba ditentukan dengan metode uji hayati (*bioassay method*) berdasarkan metode Badji *et al.* (2006) dan Pandey *et al.* (2004) terhadap bakteri patogen resisten antibiotik, ekstrak yang diperoleh dilakukan pengujian terhadap bakteri uji dengan cara sebagai berikut: Sebanyak 10 µL maserat yang telah diketahui konsentrasinya dimasukkan ke dalam kertas cakram (diameter 6 mm). Setelah semua pelarut menguap selanjutnya kertas cakram diletakkan pada permukaan media yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Semua plate diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C, diamati adanya aktivitas antibakteri yang ditandai oleh adanya zona hambatan pertumbuhan bakteri disekitar kertas cakram.

Pengujian KLT bioautografi

Ekstrak kasar ditotolkan pada lempeng KLT yang dikembangkan dengan campuran etilasetat-metanol (20:1). Bercak aktif dideteksi sebagai zona jernih diatas media tumbuh yang ditanami mikrobial (Pandey *et al.*, 2004). Noda aktif divisualisasikan dibawah sinar UV λ_{254} dan λ_{3675} nm. Fraksi yang menunjukkan aktivitas antibakteri paling besar selanjutnya dilakukan pemurnian dengan kromatografi kolom

Karakterisasi senyawa

Purifikasi dilakukan dengan menggunakan kromatografi cair vakum (KCV), dan kromatografi kolom. Fraksi yang menunjukkan aktivitas dilakukan purifikasi lebih lanjut sampai diperoleh senyawa murni. Senyawa murni yang diperoleh selanjutnya dilakukan analisis berdasarkan data spektroskopi.

Pengujian senyawa murni terhadap bakteri resisten antibiotik

Aktivitas senyawa antibakteri ditentukan dengan metode pengenceran berseri. Hasil purifikasi senyawa bioaktif yang diperoleh selanjutnya

diencerkan 2 kali lipat sampai diperoleh pengenceran tertinggi (10 pengenceran terakhir). Masing-masing enceran diinokulasikan ke dalam kertas cakram lalu diuji pada semua bakteri resisten patogen.

Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat actinomycetes

Isolat 20/BLP dikarakterisasi secara morfologi dan fisiologinya sesuai dengan ISP (*International Streptomyces Project*) (Shirling and Gottlieb, 1966)

Karakteristik Morfologi

Uji secara morfologi dengan pengamatan menggunakan metode *culture slide* yaitu koloni dari kultur stok digores pada media SNA dan cover glass slip diletakkan pada media, kemudian diinkubasi pada suhu 28° C selama 1 minggu, pengamatan terhadap struktur, warna dan bentuk spora dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400 x. Karakteristik dari isolat 20/BLP ditentukan pada beberapa media ISP setelah inkubasi selama 2 minggu.

Karakteristik Fisiologi

Temperatur optimal untuk pertumbuhan digambarkan oleh Nishimura *et al.*(2002). Isolat 20/BLP digores ke dalam media ISP2 (pH 7.2) dan diinkubasi pada temperatur 5-60° C selama 2 minggu. pH optimal untuk pertumbuhan menggunakan metode yang sama, media ISP2 broth diatur pada pH 4-10.

Penggunaan Sumber Karbon dan Nitrogen

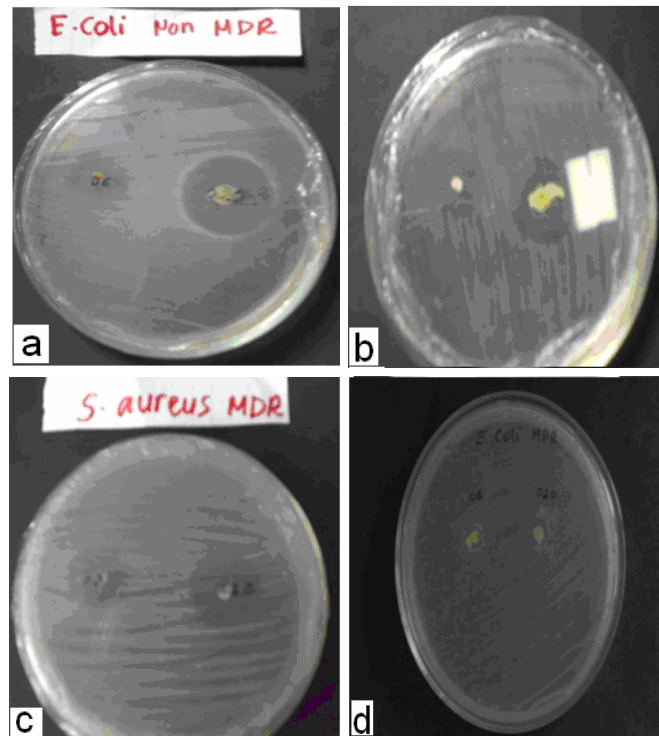
Kultur stok (20/BLP) digores diatas media ISP9 (60 mg dari tiap gula disterilkan dengan etil eter dan ditambahkan ke dalam media ISP9). Pertumbuhan koloni tiap plate dibandingkan dengan kontrol positif (medium ISP dengan glukosa), lalu diinkubasi pada 30° C selama 2 minggu.

Aktivitas Hidrolisis

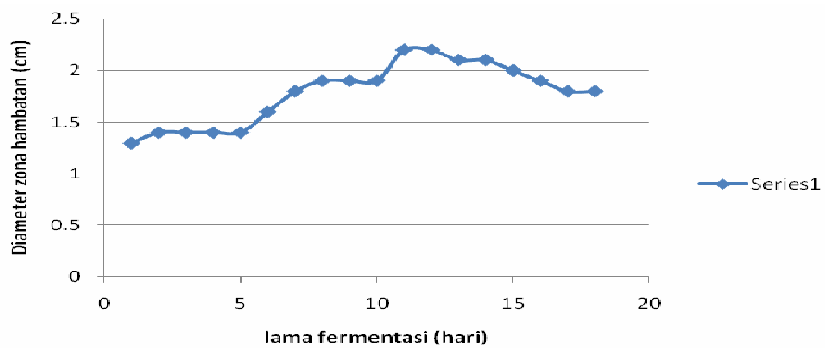
Hydrolysis starch, gelatin, tween-80, casein and chitin sebagaimana digambarkan oleh Badji *et al.* (2006).

Hasil dan Pembahasan

Hasil isolasi actinomycetes dari spons yang diperoleh dari Pulau Barrang Lompo Makassar Sulawesi Selatan sebanyak 5 isolat actinomycetes, namun dari ke lima isolat tersebut hanya 2 yang berhasil ditumbuhkan kembali. Kedua isolat actinomycetes tersebut memperlihatkan kemampuan menghambat bakteri gram negatif (*E.coli*) dan



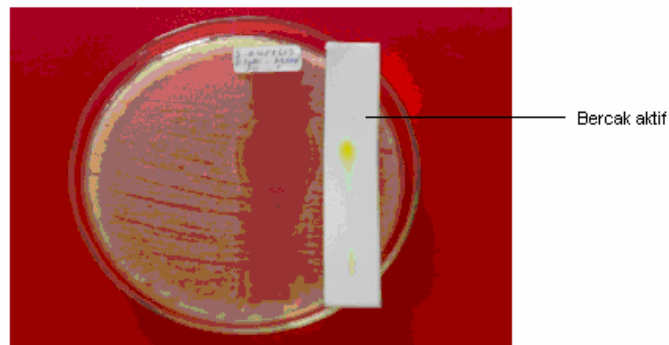
Gambar 1. Zona penghambatan pertumbuhan yang disebabkan oleh metabolit yang dihasilkan oleh isolat 20/BLP A. Bakteri *E.coli* ,B. Bakteri *S.aureus*, C. *S.aureus* Resisten, D. *E.coli* Resisten.



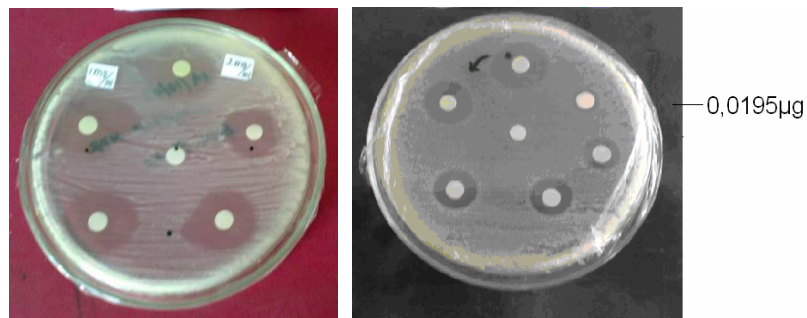
Gambar 2. Kurva pertumbuhan berdasarkan lama fermentasi(hari) terhadap diameter zona hambatan (cm).

gram positif (*S.aureus*) namun hanya satu isolat yang dapat menghambat bakteri patogen resisten (*S.aureus*) yang diberi nama 020/BLP (Gambar 1). Kemampuan dari isolat 020/BLP yang hanya menghambat bakteri gram positif

sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat 20/BLP dapat menghasilkan metabolit yang digolongkan sebagai antibakteri spektrum sempit.



Gambar 3. Profil KLT-bioautografi Ekstrak etilasetat dengan fase gerak (etil asetat-metanol 20:1) dengan Rf. 0,7 terhadap bakteri resisten *S. aureus*.



Gambar 4. Zona hambatan senyawa hasil purifikasi terhadap *S.aureus* resisten.

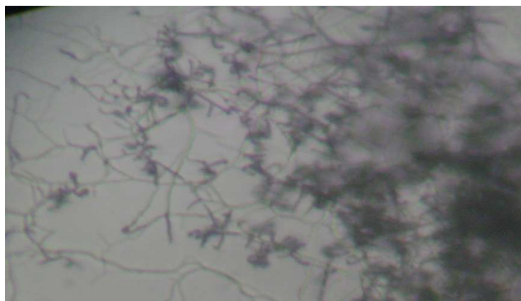
Fermentasi dilakukan terhadap isolat actinomycetes yang memiliki aktifitas penghambatan terhadap bakteri *S.aureus* resisten antibiotik yaitu 020/BLP dalam media SNB dan diinkubasi pada suhu 28 °C pada kondisi tergojok pada laju penggojokan 150 rpm. Lama fermentasi didasarkan pada aktifitas penghambatan supernatan terhadap bakteri uji. Dan diperoleh bahwa hari ke 11 dan 12 fermentasi merupakan waktu yang optimum berdasarkan pada kurva pertumbuhan (Gambar 2). Selanjutnya hasil fermentasi hari ke 12 di saring dan supernatan diekstraksi dengan etil asetat.

Untuk pengujian KLT bioautografi, ekstrak etilasetat ditotolkan pada lempeng KLT yang dikembangkan dengan campuran etilasetat-metanol (20:1). Bercak aktif dideteksi secara bioautografi diatas media tumbuh bakteri yang telah ditanami bakteri uji. Bercak aktif

yang menunjukkan aktivitas antibakteri (Gambar 3) selanjutnya dipisahkan untuk mendapatkan senyawa murni.

Proses purifikasi dilakukan terhadap ekstrak etilasetat yang menunjukkan aktivitas antibakteri. Proses purifikasi awal dengan Kromatografi cair vakum menggunakan fase gerak hexan : etilasetat dengan gradien konsentrasi, diperoleh 13 fraksi kemudian di lihat profilnya pada plat KLT. Berdasarkan pada profil KLT dari ekstrak yang aktif pada KLT-bioautografi maka fraksi 10,11,dan 12 digabung jadi 1 fraksi untuk dilakukan proses pemurnian selanjutnya dengan KLT preparatif.

Hasil purifikasi senyawa bioaktif yang diperoleh selanjutnya diencerkan 2 kali lipat sampai diperoleh pengenceran tertinggi (11 pengenceran terakhir). Masing-masing pengenceran diinokulasikan ke dalam kertas cakram lalu diuji pada bakteri *S.aureus* resisten.



Gambar 5. Morfologis *aeria myselium* pada medium SNA yang berumur 7 hari (400x perbesaran).

Tabel I. Karakteristik kultur dari strain *Actinomyces sp* 20/BLP

Medium	Colony Colour	Growth	Aerial Mycelium	Substrate Mycelium
ISP2	Krem	Kurang	Kekuningan	Kekuningan
ISP3	Abu-abu	Lebat	Krem	Kekuningan
ISP4	Putih	Lebat	Krem	Kekuningan
ISP5	Putih	Lebat	Krem	Kecoklatan
SNA	Putih	Lebat	Krem	Kekuningan
Bennett	Putih Abu-Abu	Lebat	Krem	Kekuningan
Nutrient Agar	Putih	Kurang	Krem	Kekuningan

Pengenceran hasil purifikasi senyawa dimulai dari konsentrasi 2 mg/mL hingga 0,000977 mg/mL lalu dari tiap seri konsentrasi tersebut diinokulasikan ke dalam kertas cakram sebanyak 10 μ L atau setara dengan 20 μ g-0,000977 μ g. Berdasarkan zona hambatan yang terbentuk diperoleh bahwa pada konsentrasi 0,0195 μ g senyawa tersebut masih memperlihatkan aktifitas penghambatan terhadap bakteri resisten antibiotik (Gambar 4).

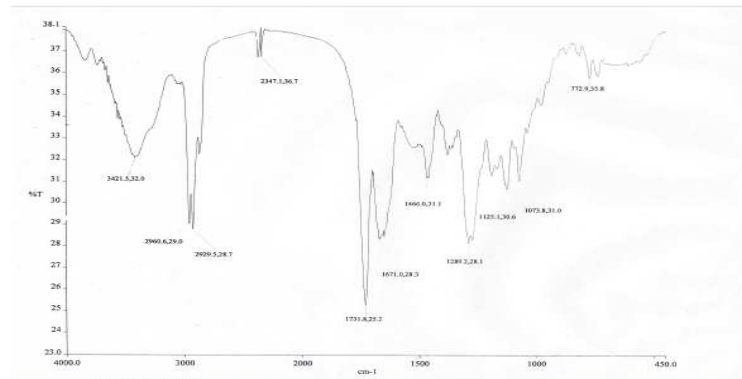
Data IR memperlihatkan adanya puncak melebar pada peak 3421 menunjukkan adanya gugus OH, serta terdapat 2 peak di sebelah kanan 3000 cm^{-1} menunjukkan CH aliphatic, serta adanya gugus C=O pada puncak 1731 cm^{-1} , sehingga dugaan sementara senyawa tersebut merupakan senyawa turunan karboksilat (Gambar 6).

Pengamatan secara morfologis pada strain yang ditumbuhkan pada medium SNA selama 7 hari menunjukkan bahwa isolat tersebut dikelompokkan dalam genus *Streptomyces* sp. Hasil pengamatan secara mikroskopik (400x perbesaran) menunjukkan adanya pembentukan miselium

substrat bercabang yang membawa spora berbentuk rantai spiral (Gambar 5).

Hasil pengujian untuk karakterisasi isolat 20/BLP pada beberapa media uji menunjukkan bahwa isolat 20/BLP tumbuh baik pada media tersebut kecuali pada nutrient agar. Warna *aerial* dan *substrate myselium* pada medium tersebut dapat ditunjukkan pada Tabel I. Warna *aerial myselium* krem sampai kekuningan, sedangkan warna sebaliknya kekuningan sampai kecoklatan, tetapi ada difusi pigmen yang dihasilkan dalam media uji oleh isolat tersebut yang berwarna kekuningan

Selanjutnya hasil uji sifat-sifat fisiologis strain 20/BLP tertera pada Tabel II. Strain mampu tumbuh pada semua sumber karbon yang diujikan kecuali maltosa, akan tetapi tidak mampu tumbuh pada sumber nitrogen yang digunakan. Uji hidrolisis menunjukkan bahwa strain mampu memecah amilum, kasein, gelatin dan kitin yang ditunjukkan oleh pembentukan zona bening di sekitar koloni. Akan tetapi, strain 20/BLP tidak mampu memecah tween-80.



Gambar 6. Spektrum data IR senyawa antibakteri dari actinomycetes asosiasi spons.

Tabel II. Karakter fisiologi *Actinomycetes* sp 20/BLP

	Hasil
Penggunaan sumber karbon:	
<i>Dextrose</i>	+
<i>D (+) Glucose</i>	+
<i>L (+) Arabinose</i>	+
α <i>Lactose</i>	+
<i>Xylan</i>	+
<i>Xylose</i>	+
<i>Sucrose</i>	+
<i>D-Mannitol</i>	+
<i>Maltose</i>	-
<i>Glyserol</i>	+
Penggunaan sumber N:	
<i>DL-Butirate</i>	-
<i>L-Valine</i>	-
<i>L-Isoleusine</i>	-
<i>L-Asparagine</i>	-
Hidrolisis oleh:	
<i>Gelatine</i>	+
<i>Casein</i>	+
<i>Starch</i>	+
<i>Tween 80</i>	-
Pertumbuhan:	
<i>NaCl</i>	0 – 12 %
<i>pH</i>	6 – 10 (<i>Optimum</i> 10)
<i>Temperature</i>	20 – 37 °C (<i>Optimum</i> 25)

Keterangan: + = Tumbuh
 - = Tidak tumbuh

Kesimpulan

Senyawa antibakteri yang dihasilkan dari actinomycetes asosiasi spons berdasarkan data IR diduga merupakan senyawa turunan karboksilat serta

Isolat actinomycetes yang diisolasi dari spons termasuk ke dalam genus *Streptomyces* sp yang menghasilkan metabolit sekunder aktif terhadap bakteri *S.aureus* resisten antibiotik

dengan kadar yang masih bisa menghambat 0,0195 µg.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didanai oleh DIPA UGM No.LPPM-UGM/1142/2009 (Hibah Penelitian Mahasiswa Program Doktor, Tahun Anggaran 2009).

Daftar Pustaka

- Atlas, R., 1998. *Principle of Microbiology*. WmC. Brown Publisher, USA
- Burrens, N. S., and Clement, J. J., 1993. Biomedical Potential Marine Natural Product, Edited by Atawwa *et al*,(I), *Pharmaceutical and Bioactive Natural Product Plenum Press*, New York and London: 13-14
- Badji,B., Zitouni,A., Mathieu,F., Lebrihi, A., and Sabaou, N, 2006. Antimicrobial compounds produced by Actinomadura sp AC104 isolated from an Algerian Sahara soil. *Can J of Mic*, 55 (4),373-382
- Crew, P., and Hunter, L. M., 1993. The Search for Antimicrobia Parasitic Agent from Marine Animals, Marine Biotechnology, (I): *Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*, Edited by Davied *et al*, New York: 352-382
- Gandhimathi, R., Arunkumar, M., Selvin, J., Thangavelu, T., Sivaramakrishnan, S., Kiran, G. S., Shanmughapriya,S., and Nataragaseenivasan, K., 2008. Antimicrobial potential of sponge Associated Marine Actinomycetes. *J. de micologie medicale*. 28, 16-22
- Nishimura,T., Meguro, A., Hasegawa, S., Nakagawa, Y., Shimizu, M., and Hunoh, H ,2002. An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. AOK-30, isolated from Mountain Laurel and its antifungal activity. *J.Gen.Plant Patbol*. 68, 390-397.
- Pandey, B., Ghimirel, P., and Agrawal, V.P. 2004. Studies on the antibacterial activity of the actinomycetes isolated from the Kumbu region of Nepal. *Brazi J. Mic*, 67 (4), 24-31
- Shirling, E.B., and Gottlieb, D., 1966. Methods for characterization of Streptomyces species. *Lnter. J. Syst Bact* 13, 313-340.
- Zhang, H., Lee, Y.K., Zhang, W., and Lee, H.K., 2006. Culturable Actinobacteria from the Marine Sponge *Hymeniacidon perleve* : Isolation and Phylogenetic Diversity by 16 Sr RNA gene RFLP Analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*. 90, 159 – 169.

*) Koresponden : Herlina Rante
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar
Email : h_rante@yahoo.co.id