EKSPLORASI **AKTINOMISETES**

di Kawasan Mangrove Segara Anakan

ARI ASNANI - OEDJIJONO

EKSPLORASI AKTINOMISETES di Kawasan Mangrove Segara Anakan

ARI ASNANI
OEDJIJONO

UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
Gd. UNSOED Press
Jalan Prof. Dr. H.R. Boenyamin, 708 Pariwakerto
Kode Pos 53122 Kotak Pos 115
Telepon (0261) 626070
Email: unssoedpress@unsod.ac.id

ISBN 978-623-7144-57-1

9 786237 144571

EKSPLORASI
AKTINOMISETES

DI KAWASAN MANGROVE SEGARA ANAKAN

Oleh:

Ari Asnani
Oedjijono

Penerbit
Universitas Jenderal Soedirman
2019

Eksplorasi Aktinomisetes di Kawasan Mangrove Segara Anakan

Copyright © 2019 Universitas Jenderal Soedirman

Cetakan Kesatu, Desember 2019

Hak Cipta dilindungi Undang-undang

All Right Reserved

Penulis:

Ari Asnani

Oedjijono

Editor:

Dwi Utami Anjarwati

Foto sampul: miselium isolat aktinomisetes K-2C

Diterbitkan oleh:

UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN

Gd. BPU Percetakan dan Penerbitan (UNSOED Press)

Telp. (0281) 626070

Email: unsoedpress@unsoed.ac.id

Anggota

Asosiasi Penerbit Perguruan Tinggi Indonesia

Nomor : 003.027.1.03.2018

vii + 60 hal., 15,5 x 23 cm

ISBN : 978-623-7144-57-1

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku tanpa seizing penerbit atau penulis. Setiap publikasi atau referensi untuk penggunaan pribadi atau penelitian harus secara eksplisit mengidentifikasi sumber aslinya. Hal ini untuk menjamin hak cipta dan peningkatan ilmu pengetahuan

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI.....	i
DAFTAR TABEL.....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	v
KATA PENGANTAR	vii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Segara Anakan Cilacap.....	1
1.2 Aktinomisetes	3
1.3 Potensi Aktinomisetes	5
BAB II. ISOLASI AKTINOMISETES.....	9
2.1 Landasan Teori	9
2.2 Karakteristik Lokasi Pengambilan Sampel	12
2.3 Penerapan Perlakuan Awal	14
2.4 Isolasi Aktinomistes.....	17
BAB III. IDENTIFIKASI AKTINOMISETES	21
3.1 Landasan Teori	21
3.2 Karakterisasi Morfologi Koloni dan Hifa	24
3.3 Karakterisasi Biokimiawi Aktinomisetes	27
BAB IV. IDENTIFIKASI AKTINOMISETES BERBASIS GEN	
16S.....	31
4.1 Landasan Teori	32
4.2 Isolasi dan Amplifikasi Gen 16S rRNA	43
4.3 Identifikasi Spesies.....	46
4.4 Konstruksi Pohon Filogenetik	51
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN.....	56

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Aktinomisetes penghasil antibiotik	5
Tabel 2.	Bioaktif pigmen yang dihasilkan mikroorganisme.....	7
Tabel 3.	Karakteristik lokasi pengambilan sampel.....	13
Tabel 4.	Total isolat aktinomisetes hasil isolasi	15
Tabel 5.	Contoh isolat aktinomisetes dari Segara Anakan	18
Tabel 6.	Hasil pengamatan morfologi koloni dan hifa	26
Tabel 7.	Hasil karakterisasi biokimiawi isolat aktinomistes	28
Tabel 8.	Hasil uji nutrisi isolat aktinomisetes.....	28
Tabel 9.	Hasil uji produksi asam	29
Tabel 10.	Hasil isolasi DNA isolat W-1B, P-6G, dan P-7H.....	43
Tabel 11.	Migrasi produk amplifikasi DNA dan standard DNA...	46
Tabel 12.	Hasil pensejajaran spesies W-1B, P-6B, dan P-7H dengan BLAST.....	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Kawasan Segara Anakan Cilacap	1
Gambar 3.	Kromatograf sekuens DNA	38
Gambar 4.	Contoh BLAST nukleotida menggunakan database gen 16S	41
Gambar 5.	(A) Gel elektroforesis hasil PCR isolat (1) W-1B, (2) P-6G, dan (3) P-7H dengan marka DNA 1 Kb; (B) Grafik hubungan Log pasangan DNA dengan jarak migrasi dari standar DNA	45
Gambar 6.	Hasil pensejajaran dengan program BioEdit dari gen 16S isolat W-1B	47
Gambar 7.	Pohon Filogenetik dari isolat W-1B, P-6G, dan P-7H	52

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan pada Allah Illahi Rabbi atas rahmat dan karuniaNya sehingga buku Eksplorasi Aktinomisetes di Kawasan Mangrove Segara Anakan dapat diselesaikan. Buku ini disusun berdasarkan hasil-hasil penelitian dengan fokus utama aktinomisetes laut yang merupakan mikroba *indigenous* dari Segara Anakan Cilacap. Aktinomisetes adalah kelompok mikroorganisme yang paling berperan dalam produksi senyawa antibiotika. Hingga kini terus dilakukan pencarian strain-strain baru penghasil antibiotika serta strain-strain penghasil jenis antibiotika baru.

Penulisan buku ini bertujuan untuk memberikan informasi teknik isolasi aktinomisetes serta identifikasi isolat aktinomisetes secara morfologi, biokimia, dan gen 16S rRNA. Buku ini diharapkan dapat digunakan sebagai referensi isolasi dan identifikasi aktinomistes. Semoga buku ini mampu memberi kontribusi positif bagi penelitian aktinomisetes.

Terima kasih atas saran semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan buku ini. Saran dan kritik yang konstruktif sangat diperlukan untuk penyempurnaan buku ini pada masa yang akan datang.

Penulis

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Segara Anakan Cilacap

Segara Anakan merupakan sebuah daerah estuarine yang luas di bagian selatan Kabupaten Cilacap, Jawa Tengah. Secara geografis Segara Anakan terletak pada koordinat $7^{\circ}35'$ LS sampai $7^{\circ}50'$ LS dan $108^{\circ}45'$ BT sampai $109^{\circ}45'$ B (Purwanto & Asriningrum, 2019). Secara administratif, Segara Anakan terleteak diantara perbatasan antara Kabupaten Ciamis Provinsi Jawa Barat dengan Kabupaten Cilacap Provinsi Jawa Tengah. Daerah Segara Anakan meliputi kecamatan Kawunganten kecamatan Gandrungmangu, kecamatan Sindareja dan kecamatan Kalipucang (Gambar 1). Daerah ini merupakan kawasan laguna dengan perairan laut-payau yang memiliki beberapa pulau atau daratan berpenduduk.

Gambar 1. Kawasan Segara Anakan Cilacap

Segara Anakan merupakan tempat bermuaranya beberapa sungai antara lain S. Citandui, S.Cibereum, S. Kembang Kuning, S. Ujung Alang dan S. Donan (Ardli & Wolff, 2008). Kondisi pasang surut dan kadar

garamnya masih mencirikan sifat-sifat laut, tetapi gelombang dan arusnya sudah teredam sehingga menjadi perairan yang tenang. Kondisi salinitas yang payau disebabkan pencampuran antara perairan laut dan air tawar dari masukan sungai, yaitu sekitar 2 - 3 permil. Kondisi payau di kawasan Segara Anakan memungkinkan vegetasi mangrove tumbuh dengan subur yang menyebabkan terbentuknya hutan mangrove

Kawasan hutan mangrove di Segara Anakan sangat menguntungkan bagi perkembangan populasi dan penyebaran mikroorganisme. Luasan ekosistem mangrove di kawasan Segara Anakan mengalami fluktuasi sebagai akibat deforestasi dan tumbuhnya mangrove di area sedimentasi yang baru atau tanah timbul. Ekosistem vegetasi mangrove di sekitar laguna didominasi oleh *Rhizophora apiculata*, *R. mucronata*, *Avicennia marina*, *Sonneratia caseolaris*, *Cariops tagal*, *Aegieras corniculatum*, dan *Nypa fructican* (Hilmi, et al., 2015). Vegetasi mangrove memberikan kelembaban dan menjaga temperatur di kawasan tersebut. Area hutan mangrove juga merupakan sumber bahan organik dari pelapukan dan penguraian serasah yang sangat bermanfaat bagi mikroorganisme heterotrof semisal aktinomisetes.

Masuknya aliran sungai ke daerah laguna dan sekitarnya menyebabkan terjadinya akumulasi nutrien yang bermanfaat sebagai sumber nutrien dan bahan organik bagi mikroorganisme. Adanya pergerakan air pasang dan surut menambah kemungkinan penyebaran nutrien dan keragaman mikroorganisme. Populasi mikroorganisme di daerah pasang surut akan tinggi demikian pula penyebaran dan keragamannya. Faktor-faktor tersebut mendukung kawasan Segara Anakan sebagai habitat yang khas bagi mikroorganisme. Habitat yang khas dapat mengandung mikroorganisme yang spesifik pula sifat-sifatnya. Disamping itu, mikroorganisme yang hidup di daerah perairan payau dan laut memiliki sifat toleransi terhadap kadar garam atau bersifat halotoleran.

1.2 Aktinomisetes

Aktinomisetes merupakan mikroorganisme kelompok bakteri Gram positif yang sangat berpotensi menghasilkan antibiotik. Sekitar 70% antibiotik yang telah ditemukan dihasilkan oleh aktinomisetes terutama dari genus *Streptomyces*, sehingga sasaran penapisan mikroba penghasil antibiotik ditujukan pada kelompok tersebut. Hingga saat ini, kebutuhan antibiotik baru masih sangat diperlukan, terutama antibiotik yang efektif melawan bakteri resisten, virus, protozoa, fungi maupun tumor. Oleh karena itu, eksplorasi isolat aktinomisetes yang potensial terus menerus dilakukan untuk mendapatkan mikroba jenis baru.

Penyebaran aktinomisetes di alam sangat luas, tidak hanya di dalam tanah tetapi juga di dalam habitat lain seperti kompos, lumpur, lumpur sungai, dasar danau, atau perairan. Aktinomisetes paling banyak diisolasi dari lingkungan tanah dengan berbagai jenis tanah, baik tanah pertanian, padang pasir, hutan hujan tropis, lingkungan gua, maupun kompos dan sampah terutama aktinomisetes jenis termofilik. Faktor-faktor yang mempengaruhi jumlah dan jenis aktinomisetes di dalam tanah antara lain adalah letak geografi, temperatur tanah, pH tanah, tipe tanah, kandungan bahan organik, pengolahan tanah, aerasi dan kelembaban. Jumlah aktinomisetes meningkat dengan adanya bahan organik yang mengalami degradasi. Populasi aktinomisetes tertinggi terdapat pada bagian atas dengan kedalaman sekitar 4 cm, dimana semakin bertambah kedalaman tanah maka populasinya semakin berkurang.

Selain lingkungan tanah, lingkungan akuatik juga merupakan habitat sesuai bagi aktinomisetes. Sebagai contoh adalah kawasan laguna Segara Anakan Cilacap yang merupakan daerah estuarine yang unik dengan area hutan mangrove yang sangat luas. Masuknya aliran sungai ke daerah laguna dan sekitarnya menyebabkan terjadinya akumulasi nutrisi yang pada akhirnya bermanfaat sebagai sumber nutrisi dan bahan organik bagi mikroorganisme. Luasnya kawasan hutan mangrove di

Segara Anakan juga sangat menguntungkan bagi perkembangan populasi mikroba karena area hutan mangrove merupakan sumber bahan organik dari pelapukan dan penguraian serasah yang sangat bermanfaat bagi mikroorganisme heterotrof semisal aktinomisetes.

Aktinomisetes merupakan mikroorganisma kelompok bakteri Gram positif yang membentuk miselium uniseluler sehingga memiliki kenampakan morfologi seperti kapang. Koloni aktinomisetes tumbuh perlahan, melekat pada substrat dan memiliki kemampuan memproduksi spora. Aktinomisetes melakukan reproduksi melalui pembelahan sel. Kondisi lingkungan yang sesuai akan menstimulasi pertumbuhan spora yang selanjutnya akan berkembang menjadi miselium yang terdiri dari hifa bercabang-cabang dengan diameter hifa 0,5-0,8 μm . Aktinomisetes memiliki dua tipe hifa yaitu hifa vegetatif dan hifa aerial. Hifa vegetatif atau substrat merupakan hifa yang tumbuh di dalam medium, sedangkan hifa aerial adalah hifa yang tumbuh menjulang ke udara. Pertumbuhan koloni pada awalnya berkembang sebagai hifa vegetatif yang kemudian diikuti oleh perkembangan hifa aerial. Hifa aerial dapat berwarna putih, kelabu, lembayung, merah, kuning, coklat, hijau atau warna lain akibat pigmentasi.

Secara keseluruhan anggota aktinomisetes dimasukkan ke dalam Ordo Actinomycetales yang dibagi ke dalam empat Famili, yaitu Streptomycetaceae, Actinoplanaceae, Actinomycetaceae dan Mycobacteriaceae. Famili Streptomycetaceae dan Actinoplanaceae membentuk konidi atau spora, sedangkan anggota Famili Actinomycetaceae dan Mycobacteriaceae tidak membentuk konidia atau spora. Genus aktinomisetes dibedakan berdasarkan morfologi dan komponen kimia marker pada dinding sel, membran dan hidrolisat seluruh sel. Kriteria kimia didasarkan pada tipe asam amino dibasic pada dinding sel dan tipe gula yang ada pada hidrolisat seluruh sel.

1.3 Potensi Aktinomisetes

Aktinomisetes dikenal sebagai kelompok mikroorganisme yang paling berperan dalam produksi senyawa antibiotik (Tabel 1). Potensi aktinomisetes sebagai bakteri penghasil senyawa antibiotik telah membuat kelompok mikroba ini menjadi sangat penting. Senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh aktinomisetes tidak terbatas efeknya terhadap bakteri saja namun juga beragam efek, yaitu sebagai agensia anti-fungi, anti-kanker dan beberapa diantaranya bersifat sebagai anti-virus. Potensi tersebut terdapat pada tingkat strain, dan hingga kini terus dilakukan pencarian strain-strain baru penghasil antibiotika serta strain-strain penghasil jenis antibiotika baru (Genilloud, 2017).

Tabel 1. Aktinomisetes penghasil antibiotik

Genus	Jumlah Jenis Antibiotik
<i>Streptomyces</i>	981
<u>Rare aktinomisetes</u>	
<i>Actinomadura</i>	91
<i>Actinoplanetes</i>	36
<i>Amycolatopsis</i>	20
<i>Dactylosporangium</i>	14
<i>Kibdelosporangium</i>	13
<i>Micromonospora</i>	49
<i>Nocardia</i>	27
<i>Nocardiopsis</i>	15
<i>Saccharopolyspora</i>	23
<i>Saccharothrix</i>	5
<i>Streptosporangium</i>	5

Aktinomisetes diketahui mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen pada manusia seperti *Bacillus cereus*, *S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, dan *Candida utilis* ((Khucharoenphaisan, et al., 2012) . Naorungrote, et al. (2011) melaporkan bahwa *Streptomyces* sp. CFJ2, *Streptomyces antibioticus*

strain 1022-257, *Streptomyces flaveolus* strain NRRL B-1334, *Streptomyces psammoticus* strain NBRC 13971, dan *Streptomyces* sp. b26 mampu menghambat 10 isolat klinis MRSA. Saraswathi *et al.* (2015) berhasil mengisolasi aktinomisetes dari sedimen laut yang menghasilkan senyawa antibakteri dan menunjukkan aktivitas antagonis terhadap bakteri *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, dan *Bacillus subtilis*. Devi *et al.* (2006) menyatakan bahwa *Actinopolyspora*, *Nocardia* dan *Streptomyces* sp. yang diisolasi dari air laut Dhanushkodi mampu melawan bakteri dan jamur patogen *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. Pneumoniae*, *S. typhi* dan *Aspergillus niger*. *Streptomyces* sp. yang diisolasi dari tanah pesisir laut mampu menghambat *Multi Drug Resistant Staphylococcus aureus* (MDRSA) (Sathish & Kokati, 2012).

Asnani & Ryandini, (2011) telah melaporkan 26 isolat aktinomisetes dari kawasan Mangrove Segara Anakan Cilacap yang berpotensi sebagai sumber senyawa anti-bakteri. Berdasarkan pengamatan morfologi koloni dan sel, isolat aktinomisetes tersebut memiliki sifat morfologi genera *Nocardia*, *Thermomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Actinosynnema*, dan *Streptomyces*. Pemanfaatan hasil penelitian ini secara berkelanjutan akan dilakukan melalui pengembangan berbagai potensi aktinomisetes sebagai antibakteri.

Selain mampu memproduksi antibiotik, aktinomisetes juga mampu menghasilkan pigmen (zat warna) yang meliputi semua warna pelangi. Soliev, et al., (2011) telah mengulas bioaktif pigmen yang dihasilkan oleh mikroorganisma halotoleran. Pigmen tersebut memiliki warna tertentu serta mempunyai aktivitas, semisal anti-kanker, antibakteri, anti-inflamasi, antoksidan, serta antibiotik. Contoh bioaktif pigmen serta mikroba yang menghasilkan pigmen tersebut tercantum pada Tabel 2.

Tabel 2. Bioaktif pigmen yang dihasilkan mikroorganisme

Pigmen	Warna	Aktivitas	Spesies Mikroba
Undecylprodigiosin	Merah	Anti-kanker	<i>Streptomyces rubber</i>
Cycloprodigiosin	Merah	Immunosuppressant; Anti-kanker; Anti-malaria	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>
Heptyl prodigiosin	Merah	Antiplasmodial	α -Proteobacteria
Prodigiosin	Merah	Anti-bakteri; anti-kanker; <i>algicidal</i>	<i>Pseudoalteromonas rubra</i> ,
Astaxanthin (carotene)	Oranye	Antioksidan	<i>Agrobacterium aurantiacum</i>
Violacein	Ungu	Antibiotik; Antiprotozoan; Anti-kanker	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> ; <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 520P1; <i>Collimonas</i> CT
Methyl sapphenate (phenazine derivative)	Kuning	Antibiotik	<i>Pseudonocardia</i> sp. B6273
Indigoidine	Biru	Pewarna makanan	<i>Alteromonas nigrofaciens</i>
Tambjamines (BE-18591, pyrrole and their analogs)	Kuning	Antibiotik ; anti-kanker	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i>
Melanins	Kuning	<i>Protection from UV irradiation</i>	<i>Shewanella colwelliana</i> ; <i>Alteromonas nigrofaciens</i> ; <i>Cellulophaga tyrosinolydans</i>
Scytonemin	Kuning-hijau	<i>Protection from UV irradiation</i> Anti-inflamasi, Antiproliferative	<i>Cyanobacteria</i>
Tryptanthrin	Kuning	Antibiotik	<i>Cytophaga/Flexibacteria</i> AM13,1 strain

*) Sumber (Soliev et al., 2011)

Asnani, et al. (2016) telah melaporkan aktinomisetes yang diisolasi dari Segara Anakan Cilacap. Aktinomisetes K-2C, K-3E, dan K-4B, dan U3-3B mampu menghasilkan pigmen yang berpotensi antibakteri. Pigmen alami yang dihasilkan adalah warna merah (K-2C), kuning (K-3E), dan merah keunguan (K-4B). Ketiga pigmen tersebut mengalami perubahan warna sesuai dengan pH media. Identifikasi morfologi mengindikasikan isolat K-2C, K-3E, dan K-4B, dan U3-3B sebagai genus *Streptomyces*. Aplikasi pigmen dari aktinomistes K-4B sebagai pewarna sabun gliserin juga telah dilaporkan oleh Herlina, et al. (2017).

Selain kemampuan aktinomisetes menghasilkan pigmen yang meliputi semua warna pelangi, aktinomisetes juga mampu membentuk asam-asam organik. Medium pertumbuhan kultur aktinomisetes menjadi bersifat alkalin karena produksi asam-asam organik, terutama ketika medium pertumbuhan mengandung prosentase karbohidrat atau senyawa organik non-nitrogen lain yang tinggi.

Potensi lain dari aktinomisetes adalah kemampuannya menghasilkan enzim protease, amilase, invertase, pektinase dan oksidase. Aktinomisetes laut yang mampu menggunakan bahan organik menjadi dasar analisis potensi aktinomisetes dalam memproduksi beragam enzim. Asnani, et al. (2014) telah melaporkan isolat aktinomisetes laut K-2C, K-3E, K-4B, K-10A, U2-7A, dan U3-3B yang mampu menghidrolisis pati dan CMC. Potensi tersebut menjadikan isolat aktinomisetes laut tersebut sebagai mikroba potensial untuk memproduksi enzim amilase dan selulase.