

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN FUNDAMENTAL**



**ANALISIS KEBARUAN ANTIBIOTIK DARI ACTINOMYCETES
SECARA SPEKTROSKOPI IR DAN OPTIMASI PRODUKSINYA**

Tahun ke 1 dari rencana 1 tahun

PENELITI:

Dra. Nanik Sulistyani, M.Si., Apt

NIDN. 0510126701

Iin Narwanti, M.Sc

NIDN. 0511088301

Dibiayai Oleh :

**Kopertis Wilayah V DIY Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, sesuai
dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Nomor :
1311/K5/KM/2014, Tanggal 6 Mei 2014**

**UNIVERSITAS AHMAD DAHLAN
NOPEMBER 2014**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Kegiatan : ANALISIS KEBARUAN ANTIBIOTIK DARI ACTINOMYCETES SECARA SPEKTROSKOPI IR DAN OPTIMASI PRODUKSINYA

Peneliti / Pelaksana

Nama Lengkap : Dra. NANIK SULISTYANI M.Si., Apt
NIDN : 0510126701
Jabatan Fungsional :
Program Studi : Farmasi
Nomor HP : 083869501442
Surel (e-mail) : naniksulistyani@gmail.com

Anggota Peneliti (1)

Nama Lengkap : IIN NARWANTI M.Sc.
NIDN : 0511088301
Perguruan Tinggi : Universitas Ahmad Dahlan

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra :
Alamat :
Penanggung Jawab :

Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 1 tahun

Biaya Tahun Berjalan : Rp. 50.000.000,00

Biaya Keseluruhan : Rp. 75.000.000,00



Yogyakarta, 30 - 6 - 2014,
Ketua Peneliti,



(Dra. NANIK SULISTYANI M.Si., Apt)
NIP/NIK 60960148

ABSTRAK

Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan isolasi dan skrining actinomycetes yang menghasilkan antibiotik serta analisis genetis yaitu menganalisis profil RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) dari gen NRPS (*non ribosomal peptida sintetase*) terhadap semua koloni actinomycetes yang menghasilkan antibiotik. Berdasarkan analisis gen NRPS tersebut, diperoleh 5 isolat yang perlu diteliti lebih lanjut karena memiliki profil gen NRPS yang berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan karakterisasi antibiotik yang dihasilkan oleh isolat yang menunjukkan aktivitas sebagai penghasil antibiotik.

Penelitian dilakukan menggunakan 6 isolat yaitu isolat T19, T24, T25, T37, T41 dan P301. Penelitian diawali dengan memfermentasi semua isolat pada suhu kamar selama 14 hari. Selanjutnya dilakukan penyaringan dan ekstraksi menggunakan etil asetat terhadap cairan kultur tiap isolat. Ekstrak dianalisis dengan KLT-bioautografi terhadap *S. aureus* dan *E. coli* untuk menentukan bercak kromatogram yang mengandung antibiotik. Selanjutnya dipilih satu isolat yang mempunyai aktivitas terhadap *S. aureus* dan *E. coli* untuk dilakukan optimasi waktu produksi antibiotik, kultur produksi, ekstraksi dan evaporasi. Fraksinasi ekstrak dilakukan dengan metode triturasi dilanjutkan dengan bioautografi. Karakterisasi fraksi aktif dilakukan dengan TLC Scanner dan analisis spektroskopi IR. Data spektra IR dibandingkan dengan spektra standar beberapa antibiotik. Karakterisasi isolat bakteri terpilih dilakukan dengan sekuensing gen 16S rRNA.

Hasil penelitian menetapkan isolat P301 sebagai isolat terpilih untuk kultur produksi. Waktu optimal produksi antibiotik adalah 11 hari. Fraksi yang mengandung antibiotik adalah fraksi kloroform-metanol (95:5) dan kloroform-metanol (70:30). Isolat P301 memiliki kemiripan terdekat terhadap *uncultured soil bacterium clone CS15* 16S ribosomal RNA gene (*partial sequence*) sebesar 95%.

Kata kunci : Antibiotik, spektroskopi IR, optimasi waktu.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas terselenggaranya penelitian yang berjudul ANALISIS KEBARUAN ANTIBIOTIK DARI ACTINOMYCETES SECARA SPEKTROSKOPI IR DAN OPTIMASI PRODUKSINYA. Atas terselenggaranya penelitian ini, penulis mengucapkan terimakasih yang setinggi-tingginya kepada :

1. Direktur Jenderal Pendidikan Tinggi, atas bantuan dana yang diberikan.
2. Rektor Universitas Ahmad Dahlan atas dukungan yang diberikan.
3. Kepala Lembaga Penelitian UAD atas dukungan penuh yang diberikan.
4. Dekan Fakultas Farmasi UAD atas pemberian kesempatan penelitian.

Serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu, semoga Allah S.W.T memberikan balasan yang lebih baik atas semua kebaikan yang telah diberikan. Saran dan perbaikan yang dapat menyempurnakan hasil penelitian ini sangat diharapkan. Semoga penelitian ini bermanfaat bagi para pembacanya. Amin.

Yogyakarta, Nopember 2014

Penulis

DAFTAR ISI

	HAL
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Abstrak.....	iii
Prakata	iv
Daftar isi	v
BAB I. Pendahuluan	1
BAB II. Tinjauan Pustaka	7
BAB III. Tujuan dan Manfaat Penelitian	14
BAB IV. Metode Penelitian	15
BAB V. Hasil Penelitian dan Pembahasan	20
BAB VI. Kesimpulan Dan Saran	49
Daftar Pustaka	50
Lampiran-Lampiran	55
a. Personalia Peneliti	55
b. Artikel Publikasi	56

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Munculnya resistensi mikroba patogen terhadap berbagai antibiotik (multiresisten) merupakan masalah serius dalam pengobatan penyakit infeksi. Multiresistensi mikroba patogen menyebabkan meningkatnya morbiditas dan mortalitas akibat penyakit infeksi. Multiresistensi ini mendorong para peneliti di dunia mencari antibiotik baru yang lebih sensitif melawan mikroba patogen yang resisten (Oskay *et al.*, 2004; Parungao *et al.*, 2007; Sulistyani *et al.*, 2009)

Salah satu sumber potensial molekul antibiotik baru adalah Actinomycetes. Secara historis, Actinomycetes menghasilkan jumlah terbesar antibiotik seperti golongan tetrasiklin, aminoglikosida, sefalosporin dan makrolid (Berdy, 2005). Actinomycetes juga merupakan sumber antibiotik baru dan senyawa penuntun dengan berbagai aktivitas farmakologi (Berdy, 2005; Singh *et al.*, 2010). Ogunmwonyi *et al.* (2010) menyatakan bahwa sekitar 70% antibiotik yang ditemukan berasal dari Actinomycetes, sehingga Actinomycetes menjadi sumber yang sangat potensial untuk eksplorasi menghasilkan obat, khususnya antibiotik baru (Genilloud *et al.*, 2010).

Banyak skrining telah dilakukan dan menghasilkan ribuan molekul bioaktif dari mikroba. Oleh karena itu diperlukan pendekatan baru untuk mengurangi kemungkinan penemuan kembali senyawa yang telah diketahui (Busti *et al.*, 2006). Pendekatan yang sistematis atau teknologi baru dalam pencarian senyawa calon obat baru (Baltz, 2008; Clardy *et al.*, 2006; Newman & Cragg, 2007) harus diterapkan,

sehingga proses-proses yang dilakukan tidak ada yang sia-sia. Pendekatan ini dapat dilakukan dengan penerapan analisis untuk mengidentifikasi dan menghilangkan metabolit sekunder yang sudah dikenal dalam proses penelitian sedini mungkin. Analisis ini disebut juga dereplikasi.

Dereplikasi merupakan proses untuk skrining dengan cara membandingkan senyawa atau metabolit sekunder yang sudah diketahui dengan senyawa yang diduga baru, sehingga tidak terjadi pengulangan riset untuk hasil atau senyawa yang sama (Lang *et al.*, 2008). Dereplikasi dapat diterapkan terhadap ekstrak bahan alam yang mengandung senyawa atau metabolit tertentu (Lang *et al.*, 2008), mikroba (misalnya Actinomycetes) maupun gen yang mengkode metabolitnya (Ayuso *et al.*, 2005). Berbagai pendekatan dereplikasi telah dilakukan antara lain secara molekuler, spektroskopi atau kombinasinya.

Pendekatan molekuler atau genomik menunjukkan perkembangan luar biasa pada beberapa tahun terakhir (Banik & Brady, 2008; Brady *et al.*, 2009; Corre & Challis, 2009; Craig *et al.*, 2009; Nett *et al.*, 2009; Scherlach & Hertweck, 2009). Salah satu pendekatan yang banyak dilakukan adalah dengan analisis gen Polyketide Synthase (PKS) dan gen Non Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS) (Ayuso *et al.*, 2005; Ayuso-Sacido & Genilloud *et al.*, 2005; Farida *et al.*, 2007;). Gen PKS dan NRPS merupakan gen yang mengkode poliketida dan non-ribosomal peptida. Poliketida dan non-ribosomal peptida merupakan kumpulan protein multifungsional yang mensintesis metabolit sekunder (Radjasa *et al.*, 2008). Perbedaan profil kelompok gen tersebut menunjukkan adanya perbedaan metabolit sekunder yang dihasilkan.

Pendekatan dengan analisis spektroskopi memegang peran penting dalam proses penemuan antibiotik. Analisis ini dapat digunakan di awal proses untuk mendeteksi keberadaan senyawa tertentu dalam ekstrak. Beberapa metode spektroskopi telah digunakan untuk dereplikasi antara lain HPLC (Tormo *et al.* (2003), NMR (Lang *et al.*, 2008) dan LC-MS (Cremin & Zeng, 2002; Genilloud *et al.* (2010).

Radiasi infra merah (IR) berpotensi dapat digunakan untuk dereplikasi. Hal ini disebabkan karena dua molekul senyawa yang berbeda struktur kimianya, akan menghasilkan spektrum IR yang berbeda pula. Hal ini disebabkan karena macam ikatan yang berbeda atau frekuensi vibrasi berbeda. Walaupun macam ikatan sama, tetapi senyawanya berbeda, maka frekuensinya berbeda pula karena ikatan yang sama tersebut berada dalam lingkungan yang berbeda (Silverstein *et al.*, 1986). Pada umumnya, molekul memiliki banyak ikatan dan setiap ikatan dapat menghasilkan beberapa macam vibrasi *IR-active*. Spektra IR bersifat kompleks dan terdapat banyak pita-pita absorpsi yang *overlapping* dan khas untuk tiap senyawa. Oleh karena itu spektrum spektra IR digunakan untuk identifikasi senyawa dengan cara membandingkan spektranya dengan spektrum IR senyawa referensi (*fingerprinting*) (Field, 2008).

Sampai saat ini, spektroskopi IR belum digunakan untuk dereplikasi metabolit Actinomycetes. Oleh karena itu penggunaan metode spektroskopi IR merupakan penerapan metode baru. Diharapkan hal ini dapat menjadi metode standar pada periode berikutnya.

Penelitian sebelumnya (Sulistiyani, 2012; Sulistiyani, 2013) telah berhasil memperoleh 13 isolat Actinomycetes yang menghasilkan antibiotik. Berdasarkan

analisis RFLP terhadap gen NRPS diperoleh 5 kelompok isolat Actinomycetes. Dari tiap kelompok dapat diambil masing-masing satu Isolat Actinomycetes yang terpilih berdasarkan profil RFLP gen NRPS untuk diteliti lebih lanjut, sehingga ada 5 isolat untuk diteliti lebih lanjut. Oleh Karena itu penelitian ini penting dilanjutkan sehingga dapat dikarakterisasi antibiotiknya dan diharapkan dapat diperoleh antibiotik baru.

B. Permasalahan Yang Akan Diteliti

Berdasarkan uraian sebelumnya maka pada penelitian ini akan dilakukan karakterisasi metabolit sekunder (antibiotik) dengan spektroskopi IR untuk mendeteksi keterbaruan senyawa antibiotik. Selanjutnya, dilakukan optimasi produksi antibiotik baru dari isolat Actinomycetes terpilih setelah dilakukan pemurnian dan elusidasi struktur terlebih dahulu.

Secara garis besar dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana profil KLT bioautografi ekstrak etil asetat cairan kultur isolat actinomycetes terpilih? Termasuk senyawa poliketida atau peptidakah bercak aktifnya?
2. Bagaimana tingkat kebaruan antibiotik yang dihasilkan oleh isolat actinomycetes berdasarkan analisis spektroskopi IR?
3. Kondisi bagaimana yang optimal untuk memproduksi antibiotik yang dihasilkan?
4. Bagaimana struktur kimia antibiotik dari isolat terpilih?

Untuk menjawab permasalahan ini maka aspek-aspek yang diteliti pada kajian ini adalah akan dilakukan karakterisasi metabolit sekunder (antibiotik) yang diawali dengan ekstraksi menggunakan etil asetat terhadap cairan kultur actinomyetes terhadap 5 isolat terpilih. Komponen dalam ekstrak dipisahkan dengan kromatografi, dilanjutkan uji bioautografi untuk menentukan bercak kromatogram yang mengandung antibiotik. Bercak diidentifikasi untuk mengetahui senyawa dalam bercak termasuk poliketida atau peptide. Bercak yang aktif dipisahkan dan dianalisis dengan spektroskopi IR untuk mendeteksi keterbaruan senyawa antibiotik. Selanjutnya, dilakukan pemurnian, elucidasi struktur dan optimasi produksi isolat antibiotik terpilih.

C. Tujuan Khusus

Diharapkan setelah rangkaian penelitian ini diselesaikan akan diperoleh isolat murni antibiotik, informasi kebaruannya, struktur kimianya, dan sekaligus diperoleh kondisi optimum untuk memproduksinya. Penemuan antibiotik baru sangat diharapkan mengingat banyak kejadian resistensi terhadap antibiotik yang sudah ada.

D. Urgensi Penelitian

Munculnya berbagai patogen yang multiresisten terhadap antibiotik menjadi problem yang pelik dalam terapi klinis. Multiresistensi menyebabkan penyakit menjadi semakin parah dan bahkan menyebabkan kematian pasien. Oleh karena itu pencarian antibiotic baru merupakan hal yang urgen dan harus dilakukan untuk mengatasi hal tersebut dengan pendekatan yang sistematis sehingga prosesnya menjadi efisien. Selain itu, dari penelitian sebelumnya telah diperoleh isolat-isolat Actinomycetes

penghasil antibiotik. Hal ini perlu dilanjutkan untuk mengetahui karakteristik antibiotiknya, kondisi optimal produksinya.

E. Temuan Yang Ditargetkan

Penelitian ini diharapkan bisa mendapatkan isolat actinomycetes yang menghasilkan antibiotik baru dan kondisi optimum untuk memproduksinya. Isolat antibiotik baru berpotensi mendapatkan paten. Hasil penelitian ini dapat diteruskan untuk dilakukan penelitian berikutnya seperti formulasi sediaan, uji praklinik dan uji klinik sehingga dapat dipatenkan dan digunakan untuk pengobatan.

F. Kontribusi Mendasar Pada Bidang Ilmu

Selama ini, proses pencarian antibiotik baru dilakukan dengan metode konvensional sehingga setelah melakukan rangkaian penelitian panjang, ternyata tidak mendapatkan antibiotik yang baru. Yang diperoleh adalah hanya antibiotik yang sudah dikenal (replikasi). Penelitian ini memperkenalkan metode yang baru dan dapat mencegah penemuan kembali antibiotik yang sudah dikenal. Metode ini juga dapat diaplikasi untuk memperoleh berbagai metabolit baru dengan berbagai aktivitas farmakologik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Actinomycetes

Ribuan mikroorganisme berpotensi sebagai sumber metabolit sekunder seperti bakteri, fungi dan beberapa mikroba lainnya. Salah satu kelompok mikroorganisme yang memiliki potensi tersebut adalah Actinomycetes. Actinomycetes merupakan bakteri berbentuk batang, gram positif, bersifat anaerobik atau fakultatif. Struktur Actinomycetes berupa filamen lembut disebut hifa atau miselia, memiliki konidia pada hifa menegak seperti pada fungi. Actinomycetes bereproduksi dengan pembelahan sel, sensitif terhadap penisilin tetapi resisten terhadap antifungi (Rollin & Joseph, 2000; Ambarwati & Azizah, 2009). Actinomycetes menghasilkan miselium bercabang dan biasanya mengalami fragmentasi atau pembelahan untuk membentuk spora (Todar, 2009). Mikroorganisme uniseluler ini tersebar luas tidak hanya di tanah tetapi juga di kompos, lumpur, dasar danau dan sungai (Suwandi, 1989).

Actinomycetes termasuk dalam filum Bacteria, Actinobacteria, Ordo Actinomycetales (Walksman & Henrici, 1943). Beberapa genus yang termasuk didalamnya adalah Actinomyces, Corynebacterium, Nocardia, Propionibacter, Streptomyces, Micromonospora and Frankia. Sebagian besar Actinomycetes memiliki habitat dalam tanah. Mikroorganisme ini berperan penting dalam dekomposisi aerobik senyawa organik, biodegradasi dan siklus karbon. Salah satu

produk metabolitnya yang disebut geosmins menimbulkan bau tanah yang khas (Todar, 2009).

Di alam, Actinomycetes dapat berupa konidia atau bentuk vegetatif. Populasi di alam dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kandungan organik, pH, kelembaban, temperatur, musim, kedalaman dan sebagainya. Di daerah iklim panas populasinya lebih besar dari pada daerah dingin. Mikroorganisme ini tidak toleran terhadap pH rendah (Suwandi, 1989).

Actinomycetes menghasilkan lebih dari separo senyawa bioaktif (Lazzarini *et al.*, 2000), meliputi antibiotik (Berdy, 2005; Abdelmohsen *et al.*, 2010, Elleuch *et al.*, 2010), immunosupresan (Mann, 2001), antitumor (Cragg *et al.*, 2005; Olano *et al.*, 2009) dan enzim (Oldfield *et al.*, 1998). Actinomycetes merupakan penghasil antibiotik paling besar di antara kelompok mikroorganisme penghasil antibiotik (Todar, 2009). Sekitar 70% dari seluruh senyawa antibiotik yang telah ditemukan dihasilkan oleh Actinomycetes (Ogunmwonyi *et al.*, 2010). Streptomyces menghasilkan berbagai antibiotik seperti bleomisin, eritromisin, josamisin, kanamisin, neomisin, tetrasiklin dan masih banyak lagi. Actinomycetes non-Streptomyces penghasil antibiotik lainnya antara lain Mikromonospora (gentamisin, fortimisin, sisomisin), Nocardia (rifamisin, mikomisin) dan lain-lain (Suwandi, 1989).

B. Penapisan antibiotik

Salah satu cara efisien untuk menemukan antibiotik baru adalah melalui isolasi mikroorganisme baru (Pratiwi, 2008, Ogunmwonyi *et al.*, 2010). Sampel mikroorganisme dari berbagai sumber, termasuk tanah dari berbagai tempat diuji

kemampuannya dalam menghasilkan antibiotik. Eksplorasi lebih dianjurkan dilakukan terhadap habitat dan tanah baru untuk mendapatkan *rare microorganism* yang dapat menghasilkan beberapa antibiotik (Nolan & Cross, 1988). *Rare Actinomycetes* berpotensi menjadi sumber antibiotik baru (Okami & Hotta, 1988).

Secara umum, proses penapisan atau isolasi terdiri dua tahap yaitu skrining primer dan skrining sekunder. Tahap skrining primer meliputi pencarian sumber penghasil, menumbuhkan mikroorganisme yang didapat, mengisolasi dan mengumpulkan mikroorganisme, lalu uji kemampuan isolat (Pratiwi, 2008). Tahap skrining sekunder meliputi diperolehnya koloni mikroorganisme terpilih, mencari kondisi optimal untuk pertumbuhan, identifikasi mikroorganisme (morfologi, kimiawi atau genetik), lalu identifikasi metabolit sekunder (Pratiwi, 2008).

Isolat alam yang biasa menghasilkan bahan penting dengan nilai komersial, termasuk antibiotik, sangat rendah kadarnya (Pratiwi, 2008). Sebagai contoh, pada produksi platensimisin oleh isolat alam diperoleh titer 2-9 ug/mL dalam 1 atau 2 media cair, sedangkan dari strain mutan diperoleh perbedaan yang sangat signifikan yakni 323 ug/mL (Smanski *et al.*, 2009; Genilloud *et al.*, 2010). Oleh karena itu, sebelum dimanfaatkan dalam proses industri harus diupayakan untuk dapat meningkatkan produktivitas dari organisme terpilih. Hasil yang lebih besar mungkin dapat dicapai dengan optimasi kultur media dan optimasi kondisi pertumbuhan. Modifikasi secara genetik juga dapat digunakan dalam perbaikan strain untuk meningkatkan produksi metabolit (Pratiwi, 2008).

Secara umum, dalam memproduksi antibiotik baru, strain dalam taksa baru harus: (1) dapat menghasilkan metabolit sekunder; (2) memiliki jalur diversifikasi

untuk metabolisme sekunder; (3) menyajikan keragaman genetik yang signifikan; (4) dapat diambil dalam jumlah besar, dan (5) dapat dilakukan *scale-up* untuk fermentasi volume besar (Busti *et al.*, 2006).

D. Pendekatan Baru Dalam Penemuan Senyawa Bioaktif Dari Mikroorganisme

Banyak skrining telah dilakukan dan menghasilkan ribuan molekul bioaktif mikroba. Oleh karena itu diperlukan pendekatan baru untuk mengurangi kemungkinan penemuan kembali senyawa yang telah diketahui (Busti *et al.*, 2006). Pendekatan yang sistematis atau teknologi baru dalam pencarian senyawa calon obat baru (Baltz, 2008; Clardy *et al.*, 2006; Newman & Cragg, 2007) harus diterapkan, sehingga proses-proses yang dilakukan tidak ada yang sia-sia. Pendekatan ini dapat dilakukan dengan penerapan analisis untuk mengidentifikasi dan menghilangkan metabolit sekunder yang sudah dikenal dalam proses penelitian sedini mungkin. Proses ini disebut proses dereplikasi. Berbagai pendekatan untuk dereplikasi telah dilakukan antara lain secara molekuler, spektroskopi atau kombinasinya.

Pendekatan molekuler (genomik) telah banyak digunakan untuk pencarian obat (senyawa penuntun) baru (Challis, 2008; Hornung *et al.*, 2007; Tohyama *et al.*, 2004; Zazopoulos *et al.*, 2003). Berdasarkan hipotesis bahwa metabolit sekunder dengan struktur serupa disintesis oleh kluster gen yang menandung gen-gen homolog tertentu, maka gen-gen homolog ini dapat berlaku sebagai penanda kluster-kluster gen *natural product* yang berbeda. (Liu *et al.*, 2003, Zazopoulos *et al.*, 2003). Pendekatan ini dapat dilakukan dengan analisis gen *Polyketide Synthase* (PKS) dan gen *Non Ribosomal Peptide Synthetase* (NRPS) (Ansari *et al.*, 2004; Ayuso *et al.*, 2005). PKS dan NRPS adalah multi-enzimatik, multi-domain megasynthase yang

terlibat dalam biosintesis peptida nonribosomal and poliketida. Metabolit sekunder ini menunjukkan aktivitas biologis bermanfaat secara klinis sebagai anti-mikroba, anti-fungi, anti-parasit, anti-tumor dan immunosupresan (Cane *et al.*, 1998; Cane & Walsh, 1999; Marahiel *et al.*, 1997). Sebagian besar senyawa bioaktif disintesis oleh PKS dan NRPS (Marahiel, 1997; Metsa-Ketela *et al.*, 1999; Ayuso-Sacido & Genilloud, 2005).

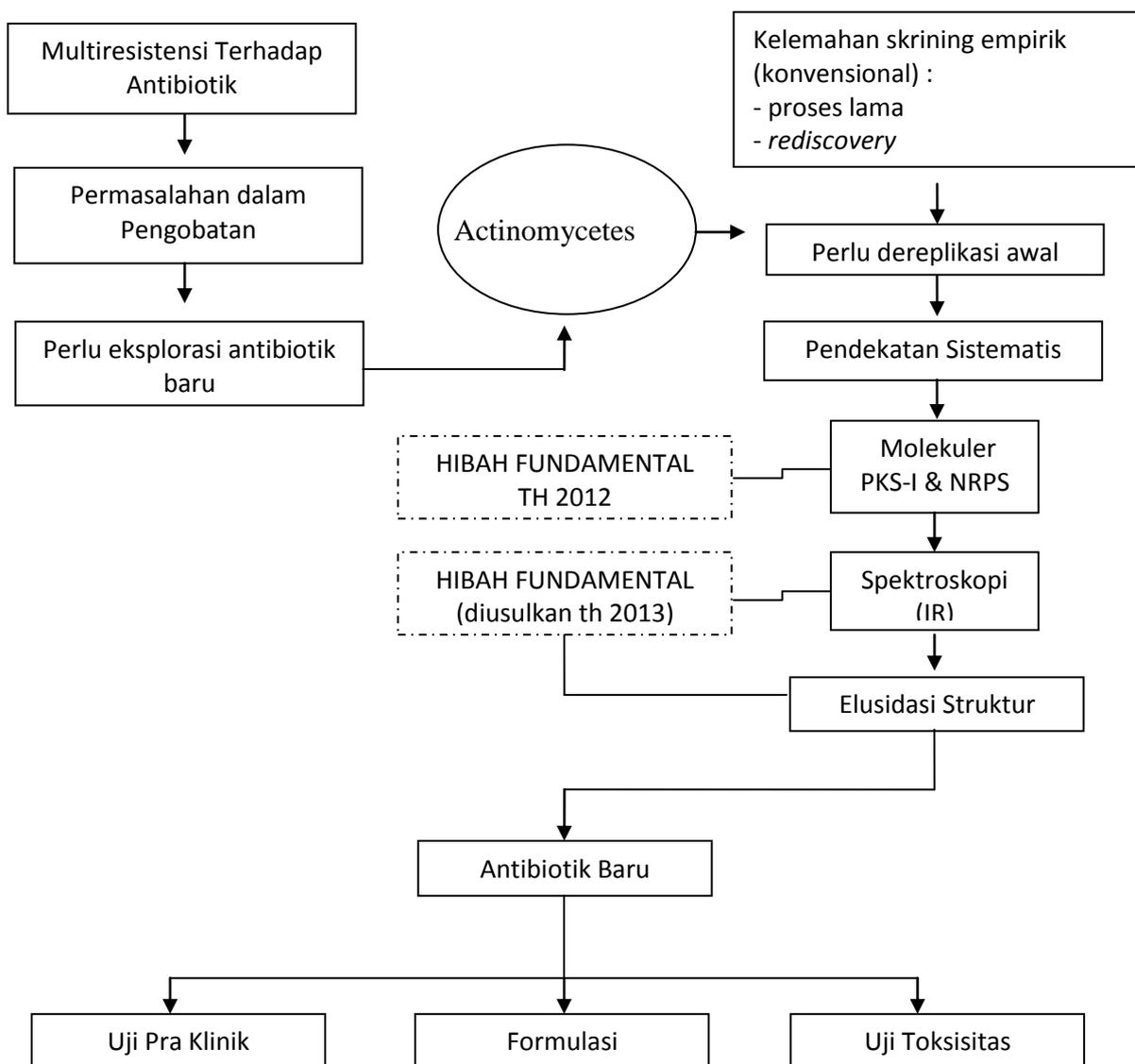
Pendekatan spektroskopi memegang peran penting dalam proses penemuan antibiotik. Analisis ini dapat digunakan di awal proses untuk mendeteksi keberadaan senyawa tertentu dalam ekstrak. Tormo *et al.* (2003) menggunakan HPLC untuk mendeteksi munculnya metabolit Actinomycetes dalam rangka memilih media produksinya. Lang *et al.* (2008) menggunakan kombinasi HPLC dan NMR untuk melakukan dereplikasi pada ekstrak bahan alam. Dereplikasi yang dilakukan Lang *et al.* (2008) adalah proses untuk membedakan antara ekstrak yang mengandung senyawa yang sudah diketahui dengan ekstrak yang mengandung senyawa baru yang diinginkan. Cremin & Zeng (2002) menggunakan LC-MS untuk mendeteksi metabolit baru dari fraksi-fraksi hasil pemurnian parsial dari bahan tanaman. Metoda ini digunakan Genilloud *et al.* (2010) untuk proses dereplikasi awal sehingga dapat diperoleh antibiotik baru dari Actinomycetes yaitu platensimisin dari *Streptomyces platensin*.

Metode spektroskopi lain yang berpotensi dapat digunakan untuk dereplikasi adalah spektroskopi IR. Dua molekul senyawa yang berbeda struktur kimianya, akan menghasilkan spektrum IR yang berbeda pula. Hal ini disebabkan karena macam ikatan yang berbeda atau frekuensi vibrasi berbeda. Walaupun macam ikatan sama,

tetapi senyawanya berbeda, maka frekuensinya berbeda pula karena ikatan yang sama tersebut berada dalam lingkungan yang berbeda (Silverstein *et al.*, 1986).

Pada umumnya, molekul memiliki banyak ikatan dan setiap ikatan dapat menghasilkan beberapa macam vibrasi *IR-active*. Spektra IR bersifat kompleks dan terdapat banyak pita-pita absorpsi yang *overlapping* dan khas untuk tiap senyawa. Oleh karena itu spektra IR digunakan untuk identifikasi senyawa dengan cara membandingkan spektranya dengan spektrum IR senyawa referensi (*fingerprinting*) (Field, 2008).

Secara skematis, rangkaian penelitian saat ini dan ke depan dapat dibuat roadmap pada gambar 1.



Gambar 1. Roadmap Penelitian

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

A. TUJUAN

Diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi kebaruan antibiotik melalui pendekatan spektroskopi IR yang dilakukan. Penemuan antibiotik baru sangat diharapkan mengingat banyak kejadian resistensi terhadap antibiotik yang sudah ada.

B. MANFAAT PENELITIAN

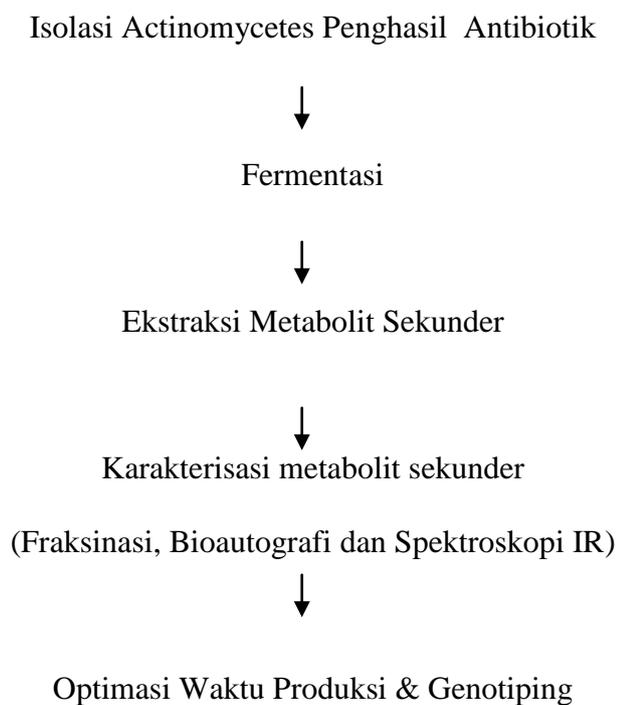
Selama ini, proses pencarian antibiotik baru dilakukan dengan metode konvensional sehingga setelah melakukan rangkaian penelitian panjang, ternyata tidak mendapatkan antibiotik yang baru. Yang diperoleh adalah hanya antibiotik yang sudah dikenal. Penelitian ini memperkenalkan metode yang baru dan dapat mencegah penemuan kembali antibiotik yang sudah dikenal. Metode ini juga dapat diaplikasi untuk memperoleh berbagai metabolit baru dengan berbagai aktivitas. Selanjutnya, informasi yang diperoleh dapat menjadi dasar kajian dan pengembangan penelitian berikutnya sehingga terdapat potensi yang besar. Hasil penelitian ini dapat diteruskan untuk dilakukan penelitian berikutnya seperti elusidasi struktur senyawa murni yang diperoleh, uji praklinik dan uji klinik sehingga dapat dipatenkan dan digunakan untuk pengobatan.

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Bagan Alir Penelitian

Desain penelitian pada kajian ini secara umum digambarkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Skema Alir Penelitian

B. Jalannya Penelitian

Bahan: Media Solid Starch Nitrat, media *Nutrient Agar*, media agar Mueller Hinton, *Staphylococcus aureus*, DNA sequencing kit, kit isolasi DNA, bahan elektroforesis gel agarose, etil asetat, pelat KLT, silica gel untuk kolom kromatografi, heksan.

1. Isolasi dan Karakterisasi Metabolit Sekunder dari Isolat P301

a. Penyiapan metabolit sekunder

1 ose (lup) koloni actinomycetes yang menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri uji dinokulasi pada 5 ml media Liquid Starch-Nitrat cair. Lalu diinkubasi pada rotary shaker 200-250 rpm selama 5 hari pada suhu kamar. Kultur diinokulasi ke dalam 100 ml Liquid Starch-Nitrat dalam Erlenmeyer 500ml. diinkubasi pada shaker suhu kamar 11 hari. Kemudian kultur dipindah ke tabung konikal dan disentrifus 3000 rpm 15 menit. Supernatan diambil sebagai sumber metabolit sekunder.

b. Ekstraksi dan isolasi metabolit sekunder (Riyanti et al, 2009)

Supernatan metabolit sekunder diekstraksi dengan etil asetat. Ke dalam corong pisah dimasukkan supernatant dan etil asetat (1:1)(v/v) dikocok selama 10 menit. Lapisan atas diambil dengan pipet Pasteur dimasukkan dalam tabung. Ekstraksi dilakukan 2 kali. Fase etil asetat dikumpulkan dan dialirkan melalui kolom yang telah diisi Natrium sulfat. Selanjutnya, filtrat diuapkan hingga volume 1 ml dan disimpan dalam refrigerator untuk uji berikutnya (Riyanti et al, 2009).

Terhadap ekstrak etil asetat dilakukan KLT dengan FD silica gel GF254 (E. merck), FG BAW 4:5:1 v/v dan kloroform-metanol-air (CMW) 90:10:1 v/v). Deteksi kromatogram dilakukan dengan sinar uv 254 dan 366 (Farida et al, 2007).

c. Uji Bioautografi

Plat KLT yang mengandung bercak kromatogram dilakukan uji bioautografi terhadap bakteri uji pada media agar Mueller Hinton. Uji dilakukan dengan menyentuhkan plat KLT selama 30 menit pada media agar Mueller Hinton yang ditanami bakteri uji. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Adanya zone steril (tidak ada pertumbuhan koloni bakteri) pada hasil inkubasi menunjukkan bahwa bercak kromatogram tersebut mengandung senyawa antibiotik.

d. Fraksinasi dan Analisis Spektroskopi IR

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan kromatografi cair vakum (KCV), dan kromatografi kolom preparatif. Fraksi yang diperoleh selanjutnya dianalisis aktivitasnya.

2. Optimasi Waktu Produksi metabolit

Optimasi waktu produksi metabolit sekunder dilakukan terhadap isolat P301. Optimasi dilakukan dengan modifikasi sistem pertumbuhan meliputi optimasi waktu pertumbuhan metabolit.

3. Identifikasi isolat P301

1) Penyiapan kultur media cair

1 ose (lup) koloni isolat P301 yang menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri uji dinokulasi pada 5 ml media Liquid Starch-Nitrat. Lalu diinkubasi pada rotary shaker 200-250 rpm selama 5 hari pada suhu kamar.

2) Ekstraksi DNA genom

Sampel isolat bakteri dari media SNB 1 ml disentrifuse dengan kecepatan 5000 g selama 10 menit. Pellet dicuci dengan buffer TE(200 µL) lalu pellet dicampur dengan 50 µl lisozim (digunakan lisozim 20mg/ml dalam buffer lisis, dibuat segera sebelum digunakan). Suspense diinkubasi selama 60 menit, kemudian ditambah SDS (50 µL) dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 65°C (tiap 1 jam ditambahkan 50 ul NaCl 5 M) dengan inverse setiap 30 menit. Sentrifugasi dilakukan pada 13000 rpm 10 menit, fase air dipindah ke tabung baru. DNA diperoleh dari fase air dg cara penambahan isopropanol dingin (50 µL), inkubasi pada -20C semalam. Sampel disentrifuse 13000 rpm 5 menit, supernatant dibuang, pellet DNA dibersihkan dengan 50 ul etanol 70%, sentrifus 13000 rpm 10 menit, pellet diresuspensi dg 50 ul buffer TE (10 mmol/L Tris-HCl pH 7,4; 1 mmol EDTA pH 8) lalu simpan suhu -20 °C.

3) DNA Sequencing terhadap Isolat Terpilih

Amplifikasi gen 16S rRNA dan *DNA Sequencing* (Magarvey et al,2004 ; Riyanti et al, 2009) : Lyophilized Forward Primer 27F (specific for Bacteria) (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and R 1 4 9 2 (5 ' - TACGG[A/T/C]TACCTTGTTACGACTT-3') digunakan untuk amplifikasi sampel DNA. Campuran PCR mengandung : Campuran PCR mengandung : 19 ul H₂O, 5 ul DNA genom actinomycetes sebagai template (50 ng/ul), 0,5 ul masing-masing

primer (15 pmol) dan 25 ul PCR kit Green Master Mix. Temperature PCR : panas awal selama 3 menit pada suhu 94°C, kemudian 30 siklus 1 menit suhu 94°C, 1 menit suhu 53°C, 5 menit suhu 72°C dan pemanasan tahap akhir suhu 72°C selama 5 menit. Hasil PCR dielektroforesis dengan gel agaros 2%. Pewarnaan bercak menggunakan etidium bromida.

D. Cara Analisis Data

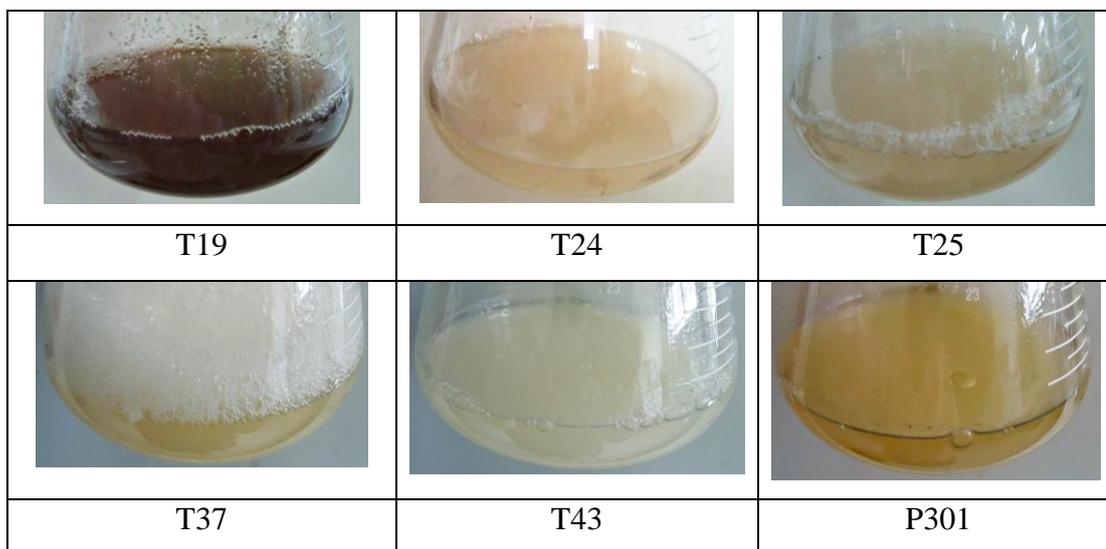
1. Adanya bercak antibiotic pada KLT bioautografi dianalisis berdasarkan munculnya zone steril pada kultur bakteri uji di media padat.
2. Keterbaruan senyawa antibiotic hasil pemurnian dianalisis berdasarkan spectra IR dibandingkan dengan spektra standar antibiotik.
3. Optimasi waktu produksi antibiotik dianalisis berdasarkan kurva waktu inkubasi vs aktivitas cairan kultur isolat P301.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan 5 isolat terpilih yang memiliki profil gen NRPS berbeda yaitu isolat T19, T24, T25, T37 dan T43 yang diisolasi dari rizosfer tanaman tin (*Ficus carica* L) serta 1 isolat P301 yang diisolasi dari rizosfer tanaman padi. Proses fermentasi terhadap semua isolat tersebut dilakukan pada suhu kamar dengan lama waktu fermentasi untuk 1 kali fermentasi adalah 24 hari. Sebanyak 10 mL starter dibiakkan selama 5 hari pada suhu kamar dengan agitasi dalam 100 mL media SNB (Starch Nitrate Broth). Setelah 5 hari, starter dipindahkan ke dalam 1 L media SNB dan inkubasi dilanjutkan 5 hari. Sebanyak 300 mL kultur, kemudian diinkubasi dalam 3 L media SNB dan diinkubasi selama 14 hari.

Gambaran cairan kultur fermentasi adalah seperti tercantum pada gambar 1.

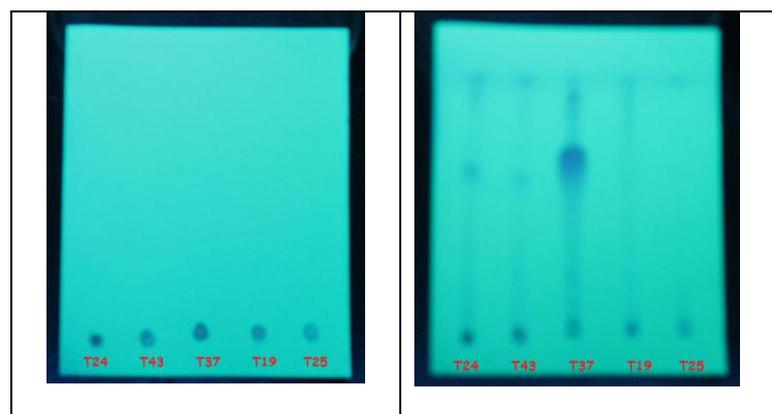


Gambar 1. Penampakan kultur pada akhir fermentasi

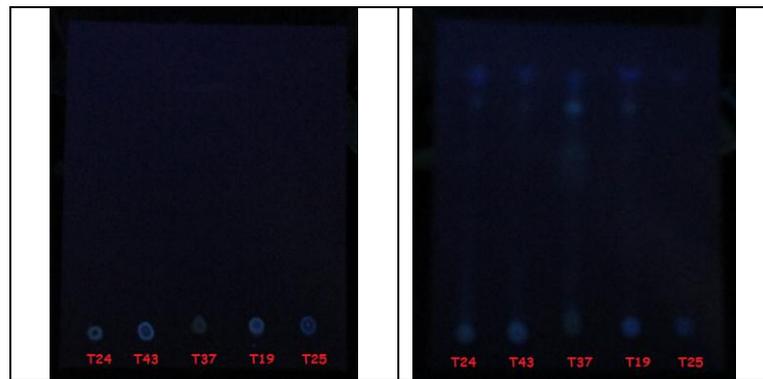
Warna masing-masing kultur setelah diinkubasi selama 14 hari nampak menunjukkan perbedaan. Hampir semua isolat menghasilkan metabolit sekunder

berupa pigmen yaitu coklat tua pada T19, coklat muda pada T24 dan T25, kekuningan pada T37 dan kuning pada P301. Adapun T43 tidak menghasilkan pigmen yang ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna kultur. Perbedaan warna kultur bisa menjadi petunjuk bahwa mikroba yang difermentasi berbeda-beda. Meski demikian, warna kultur yang sama belum tentu merupakan mikroba yang sama.

Kultur kemudian disaring dan diekstraksi dengan etil asetat. Penggunaan etil asetat telah banyak digunakan pada berbagai penelitian isolasi antibiotik. Hal ini disebabkan karena pada umumnya antibiotik bersifat semipolar dan mudah diisolasi dengan etil asetat (Riyanti *et al.*, 2009; Farida *et al.*, 2007, Rante *et al.*, 2010). Hasil penyarian kemudian diuapkan dengan rotaevaporator dan didapatkan ekstrak. Ekstrak selanjutnya dilakukan KLT-bioautografi. KLT dilakukan dengan fase diam silika gel F 254 dan fase gerak kloroform metanol (7:3). Hasil KLT disajikan pada gambar 2 dan 3.



Gambar 2. Hasil pengamatan kromatogram KLT pada sinar UV 254



Gambar 3. Hasil pengamatan kromatogram KLT pada sinar UV 366

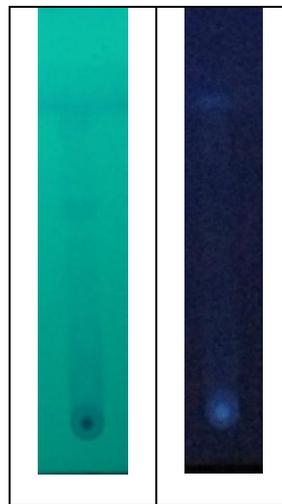
Hasil KLT dapat dihitung harga Rf tiap bercak dan dirangkum pada tabel 1.

Tabel 1. Harga Rf kromatogram hasil KLT

isolat	Rf (uv254)	Rf (uv366)
T24	0/8=0	0/8=0
	1,2/8=0,15	2,2/8=0,28
	4,5/8=0,56	3,4/8=0,43
	6,7/8=0,84	6,7/8=0,84
	7,3/8=0,91	7,3/8=0,91
T43	0/8=0	0/8=0
	1,5/8=0,19	1,5/8=0,19
	4,3/8=0,54	6,4/8=0,80
	7,3/8=0,91	7,3/8=0,91
T37	0/8=0	0/8=0
	1,7/8=0,21	1,7/8=0,21
	5,6/8=0,70	5,6/8=0,70
	6,6/8=0,83	6,5/8=0,82
	7,1/8=0,89	7,1/8=0,89
	7,4/8=0,93	
T19	0/8=0	0/8=0
	2/8=0,25	5/8=0,63
	6,1/8=0,76	6,5/8=0,82
	6,3/8=0,79	7,4/8=0,93
	7,3/8=0,91	
T25	0/8=0	0/8=0
	7,3/8=0,91	7,4/8=0,93

Berdasarkan hasil KLT dapat diamati bahwa bercak yang muncul pada semua isolat berbeda-beda. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya berdasarkan profil gen NRPS yang menunjukkan perbedaan diantara semua isolat yang diuji.

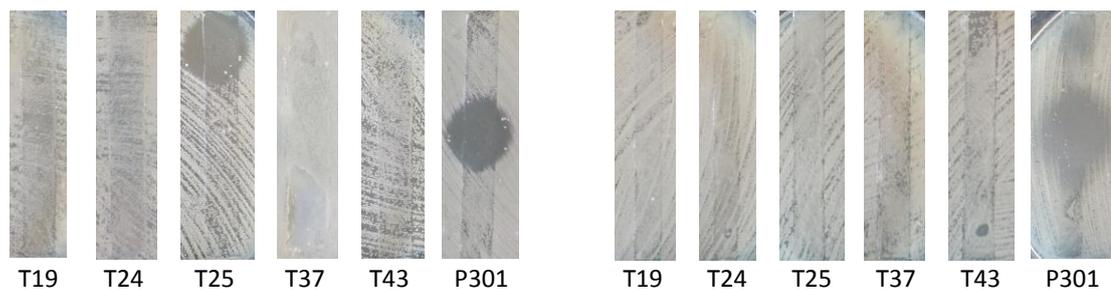
Selain itu, ada 1 isolat lain yang mewakili hasil isolasi dari rizosfer padi yaitu isolat P301. Hasil KLT ekstrak etil asetat dapat dilihat pada gambar 4. Harga Rf yang teramati pada UV 254 adalah 0; 0,56 dan 0,85, sedangkan pada UV 366 adalah 0 dan 0,85. Profil ini menunjukkan perbedaan dengan kelima isolat sebelumnya.



Gambar 4. Hasil Pengamatan KLT ekstrak etil asetat dari P301 pada Sinar UV 254 nm (kiri) dan 366 nm (kanan)

Hasil KLT kemudian dilanjutkan dengan bioautografi untuk mengetahui Rf bercak yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji. Bioautografi dilakukan dengan metode kontak. Bioautografi kontak dilakukan dengan meletakkan lempeng kromatogram hasil eluasi ekstrak yang akan diuji di atas media padat yang sudah diinokulasi dengan mikroba uji (Kusumaningtyas *et al.*, 2008). Kelebihan metode kontak adalah lebih mudah dilakukan dibandingkan dengan metode lain seperti bioautografi overlay (imersi) dan bioautografi langsung. Selain itu, hasil bioautografi kontak dapat terlihat jelas tanpa harus menggunakan pereaksi seperti MTT (garam

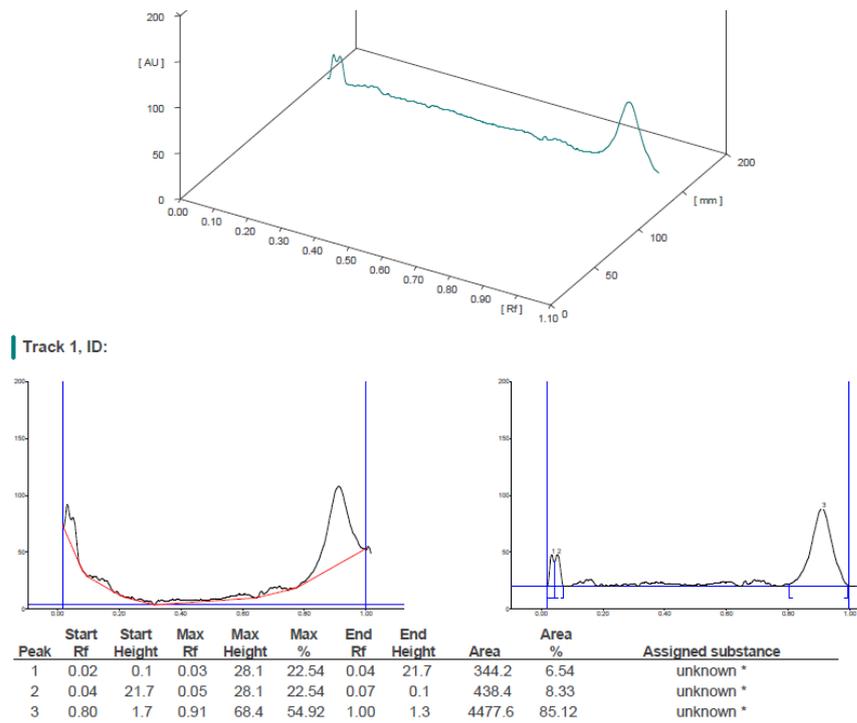
tetrazolium). Kekurangan metode ini adalah kesulitan mendapatkan kontak yang optimal antara agar dan kromatogram serta penyerapan oleh permukaan agar (Kusumaningtyas *et al.*, 2008).



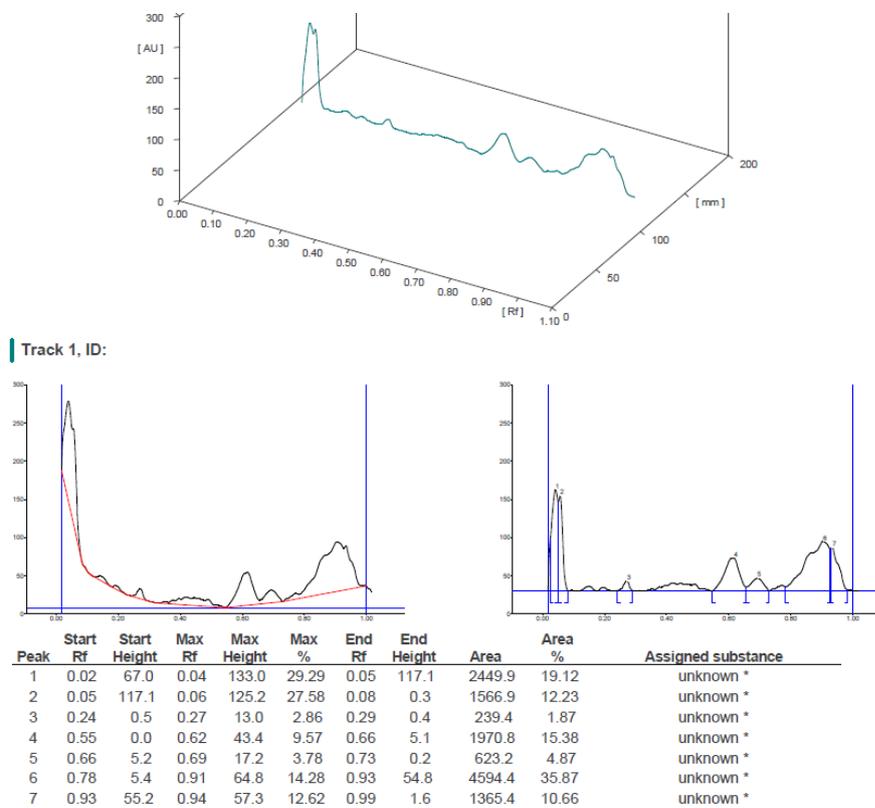
Gambar 4. Hasil uji bioautografi terhadap *S. aureus* (kiri) dan *E. coli* (kanan)

Hasil bioautografi menunjukkan bahwa kromatogram yang aktif terhadap *S. aureus* adalah kromatogram dari isolat T25 dan P301, sedangkan yang aktif terhadap *E. coli* adalah P301. Kromatogram isolat T25 memiliki bercak aktif pada Rf 0,93 terhadap *S. aureus*, tetapi tidak ada bercak aktif terhadap *E. coli*. Kromatogram isolat P301 memiliki bercak aktif pada Rf 0,54 terhadap *S. aureus* dan *E. coli*.

Karakterisasi senyawa aktif menggunakan hasil scanning kromatogram dengan TLC Scanner Camag 4 (gambar 5, gambar 6 dan tabel 2) pada panjang gelombang 254 nm menunjukkan bahwa bercak dengan Rf 0,93 pada isolat T25 memiliki % area sebesar 78% dan memiliki 3 puncak dengan panjang gelombang 223, 234 dan 313 nm. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa pada Rf 0,93 memiliki tingkat kemurnian 78%.



Gambar 5. Spektra ekstrak etil asetat T25 pada panjang gelombang 254 nm



Gambar 6. Spektra ekstrak etil asetat T25 pada panjang gelombang 254 nm

Tabel 2. Hasil Scanning Kromatogram dengan TLC Scanner

isolat	Rf	% Area	No peak spektra	Panjang gelombang	AU	Peak Utama
P301	0.03	23 %	1	236	66	
			2	304	95	√
	0.04	15 %	1	304	95	√
			2	236	33	
			3	213	38	
	0.26	3 %	1	214	9	√
			2	246	18	√
	0.39	5 %	1	215	9	√
			2	246	21	√
	0.41	11 %	1	214	9	√
			2	248	22	√
	0.61	15 %	1	214	12	√
			2	254	29	√
	0.70	5 %	1	214	10	√
			2	250	23	√
0.87	17 %	1	214	2	√	
		2	245	18	√	
0.94	8 %	1	241	23	√	
T25	0.01	9 %	1	207	23	
			2	281	94	√
			3	397	40	
	0.03	13 %	1	214	22	√
			2	327	95	
	0.91	78 %	1	223	91	
2			234	95		
3			313	63	√	

Adapun hasil scanning pada P301 menunjukkan adanya 9 macam Rf. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak P301 mengandung sekurang-kurangnya 9 senyawa. Nilai Rf yang terdekat dengan Rf bercak aktif (0,54) menunjukkan angka Rf 0,61 dengan persentase area 15%. Senyawa pada bercak ini memiliki 2 puncak dengan panjang gelombang 214 dan 254 nm.

Oleh karena diantara kedua isolat hanya P301 yang memiliki aktivitas terhadap *S. aureus* maupun *E.coli*, maka isolat ini dipilih untuk langkah penelitian

berikutnya. Selanjutnya terhadap P301 dilakukan optimasi waktu produksi metabolit. Untuk optimasi waktu produksi metabolit, maka terlebih dahulu dilakukan preparasi kultur uji. Untuk preparasi kultur uji, proses pemindahan starter ke dalam erlenmeyer yang berisi media SNB dilakukan di ruang LAF (*Laminar Air Flow*). Hal ini dilakukan untuk meminimalkan terjadinya kontaminasi karena apabila kultur terkontaminasi oleh mikroorganisme lain dapat menyebabkan bakteri yang terdapat dalam kultur akan mati. Starter tersebut dimasukkan dalam media yang baru fungsinya untuk peremajaan media karena media yang baru mengandung nutrisi yang banyak sehingga diharapkan bakteri dapat berkembang biak dengan baik. Tujuan dari penyimpanan cairan kultur dalam freezer untuk mengantisipasi agar senyawa yang terkandung didalam kultur tidak terdegradasi karena sebelumnya belum diketahui apakah senyawa tersebut mudah terdegradasi atau tidak. Dalam melakukan preparasi kultur uji ini juga dilakukan di ruang LAF untuk meminimalkan terjadinya kontaminasi. Hasil kenampakan dari cairan kultur disajikan pada tabel 3.

Dari hasil tabel 3. terlihat bahwa pada hari ke kedua media SNB berwarna kuning pucat dan sudah mengalami kekeruhan serta terdapat butiran-butiran halus yang tersebar didasar media. Hal ini menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Perubahan warna tersebut terjadi hingga inkubasi hari ke duapuluh yaitu dari warna kuning pucat berubah menjadi warna coklat kehitaman. Perubahan warna terjadi karena Actinomycetes mengeluarkan pigmen warna yang mampu berdifusi maupun tidak pada media (Ambarwati dan Gama, 2009). Dari pernyataan tersebut dapat diketahui bahwa perubahan warna yang terjadi pada cairan kultur disebabkan karena isolat Actinomycetes No.P301 mengeluarkan pigmen warna. Perubahan tersebut juga diikuti dengan bertambahnya jumlah pelet dari hari ke hari, dan kemudian jumlah

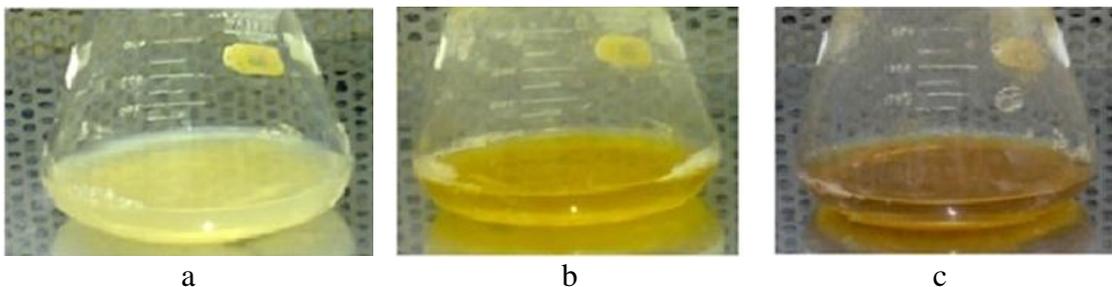
tersebut konstan setelah hari ke sepuluh. Hal ini disebabkan karena jumlah nutrisi yang terkandung dalam media semakin berkurang sehingga jumlah bakteri akan konstan. Kekurangan nutrisi, akumulasi produk sisa, dan perubahan pH yang bersifat toksik bagi sel dianggap menjadi penyebab berhentinya pertumbuhan sel bakteri (Radji, 2010).

Tabel 3. Hasil penampakan cairan kultur

Hari ke-	Warna
1	Kuning muda
2	Kuning muda
3	Kuning muda
4	Kuning
5	Kuning
6	Kuning +
7	Kuning +
8	Kuning ++
9	Kuning kecoklatan
10	Kuning kecoklatan
11	Kuning kecoklatan
12	Kuning kecoklatan
13	Kuning kecoklatan
14	Kuning kecoklatan
15	Kuning kecoklatan
16	Kuning kecoklatan
17	Kuning kecoklatan
18	Kuning kecoklatan
19	Kuning kecoklatan
20	Kuning kecoklatan

Dari pengamatan kenampakan kultur uji terlihat adanya perubahan warna media. Warna media pada mulanya kuning muda kemudian berubah menjadi kuning kecoklatan. Perubahan warna terjadi karena Actinomycetes mengeluarkan pigmen warna yang mampu berdifusi maupun tidak pada media (Ambarwati & Gama, 2009).

Dari hasil penelitian Ramadhan (2012) isolat P301 mempunyai pigmen terdifusi berwarna kuning pada media SNA (*Starch Nitrat Agar*). Dari pernyataan tersebut dapat diketahui bahwa pada penelitian terjadi perubahan warna media menjadi kuning adalah akibat dari pigmen terdifusi yang dikeluarkan oleh *Actinomycetes* isolat nomor P301. Perubahan juga terjadi pada jumlah sel bakteri yang dari hari ke hari semakin bertambah akibat adanya pertumbuhan sel dan kemudian tetap pada hari kedelapan hingga hari keduabelas. Kenampakan kultur uji yang berubah-ubah dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Kultur Uji Isolat No. P301 setelah inkubasi selama:

(a) 1 hari, (b) 7 hari, (c) 12 hari

Untuk menyiapkan kultur uji dapat diperoleh dari hasil preparasi kultur yang diambil selama 20 hari dikeluarkan dari freezer dan disimpan di kulkas sampai mencair. Hal ini dilakukan agar perubahan suhu pada kultur tidak berubah secara drastis. Selanjutnya cairan kultur disentrifuse, tujuan dilakukan sentrifuse ini adalah untuk memisahkan antara supernatan dengan endapan atau biomassa dari kultur yang diperoleh. Setelah terpisah antara supernatant dengan biomassa, supernatant dimasukkan dalam tabung eppendorf yang baru dan disimpan dalam freezer untuk mengantisipasi senyawa yang terkandung dalam kultur terdegradasi. Supernatan ini

disebut sampel cairan kultur yang akan digunakan untuk menguji aktivitas dari cairan kultur isolat Actinomycetes No.P301 terhadap mikroorganisme uji.

Untuk mengetahui apakah cairan kultur Actinomycetes isolat nomor P301 menunjukkan aktivitas menghasilkan antibiotik terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, dilakukan uji aktivitas antibiotik cairan kultur Actinomycetes isolat nomor P301 dengan metode sumuran. Sebanyak 25 μ L cairan kultur dimasukkan dalam media MH (Mueller Hinton) yang telah ditanami bakteri uji kemudian disimpan dalam kulkas selama 2 jam agar cairan kultur terdifusi kedalam media. Media kemudian di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil penelitian menunjukkan adanya zona bening pada media dengan diameter 12,0 mm. Hasil uji aktivitas cairan kultur ini dapat dilihat pada Gambar 8.



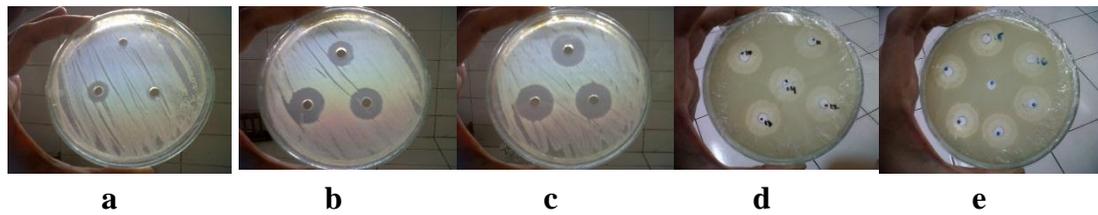
Gambar 8. Hasil Uji Aktivitas Cairan Kultur Isolat P301

Hasil penelitian Ramadhan (2012) terhadap potensi antibiotik Actinomycetes isolat P301 dengan metode agar blok menunjukkan penghambatan yang tinggi yaitu dengan zona hambatan 20,0 mm. Tujuan utama uji aktivitas cairan kultur pada penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah cairan kultur yang dihasilkan menunjukkan aktivitas antibiotik terhadap *Staphylococcus aureus*. Pada uji aktivitas antibiotik dengan menggunakan media padat dapat menunjukkan aktivitas antibiotik terhadap bakteri tertentu namun, dengan menggunakan media

cair belum tentu dapat menunjukkan aktivitas yang sama. Menurut Moncheva *et al.*, (2002) antibiotik yang dihasilkan pada media padat sama bagusnya dengan antibiotik yang dihasilkan pada media cair, namun hasil penelitian Sulistiyani (2006) menunjukkan bahwa produksi antibiotik dengan media padat lebih baik dari pada dengan media cair.

Tujuan dilakukannya optimasi waktu produksi metabolit sekunder adalah untuk mengetahui profil dari optimasi waktu produksi metabolit sekunder isolat No.P301 sebagai penghasil antibiotik. Optimasi waktu produksi metabolit sekunder ini dapat digunakan untuk menentukan kapan waktu yang tepat untuk memproduksi metabolit sekunder yang optimal sebagai penghasil antibiotik. Pada uji ini mikroorganisme yang digunakan adalah mikroorganisme yang pertumbuhannya dapat dihambat oleh cairan kultur isolat No.P301 berdasarkan uji aktivitasnya yaitu *Staphylococcus aureus*.

Optimasi waktu produksi metabolit sekunder ini dapat ditentukan dengan membuat grafik hubungan antara waktu inkubasi dengan diameter zona hambat. Diameter zona hambat dapat ditentukan dengan menanam bakteri *Staphylococcus aureus* pada masing-masing media MH, kemudian media tersebut dibuat sumuran sesuai dengan jumlah lamanya inkubasi yaitu selama 20 hari. Setiap sumuran diisi dengan cairan kultur dari hari pertama sampai hari ke duapuluh. Setelah diinkubasi setiap sumuran diukur diameter zona hambatnya. Gambar diameter zona hambat pada *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada gambar 9.

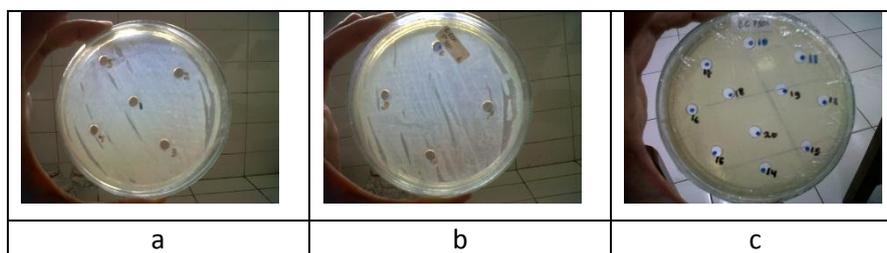


Gambar 9. Diameter zona hambat radikal terhadap *S. aureus* dari cairan kultur hari ke 1-3 (a), 4-6 (b), 7-9 (c), 10-14 (d) dan 15-20 (e).

Tabel 4. Diameter zona hambat radikal terhadap *S. aureus*

Hari	Diameter zona hambat (cm)	Hari	Diameter zona hambat (cm)
1		11	2.175
2		12	2.175
3	0.7	13	2.15
4	0.975	14	2.1
5	1.2	15	2.15
6	1.375	16	2.175
7	1.4	17	2.175
8	1.5	18	2.175
9	1.525	19	2.175
10	2.1	20	2.15

Adapun hasil uji terhadap *E. coli* (gambar 10) menunjukkan bahwa hingga hari ke 20 tidak menunjukkan zone hambatan.

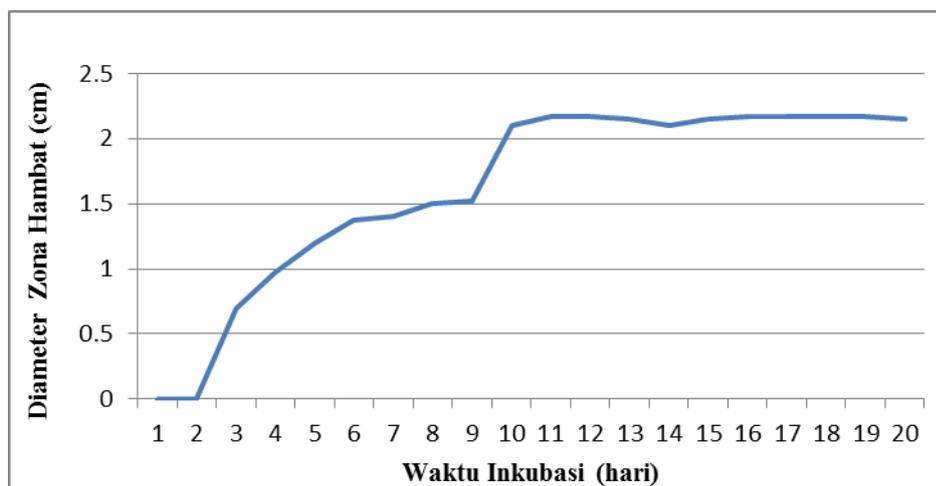


Gambar 10. Hasil uji aktivitas kultur harian P301 terhadap *E. coli* dari cairan kultur hari ke 1-5 (a), 6-9 (b), 10-20 (c)

Strategi Actinomycetes untuk dapat bersaing dengan mikroba tanah lainnya adalah dengan menghasilkan senyawa antibiotik. Senyawa antibiotik ini berfungsi untuk menghambat pertumbuhan mikroba kompetitor (Sulistiyani, 2006). Pada akhir

fase pertumbuhan dan selama fase stasioner, bakteri memproduksi metabolit sekunder, contohnya antibiotik (Darwis *and* Sukara, 1989). Produksi antibiotik dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu komponen media dan kondisi kultur, seperti agitasi, aerasi, pH, dan temperatur yang berbeda-beda untuk setiap organisme. Komponen media yang berpengaruh adalah struktur kimia media dan konsentrasinya. Sumber karbon dan nitrogen biasanya memberikan pengaruh dalam produksi antibiotik. Agitasi akan mempengaruhi aerasi dan pencampuran nutrient dalam media fermentasi, sehingga hasil metabolit dapat ditingkatkan melalui peningkatan agitasi (Augustine *et al.*, 2005).

Hasil pengukuran diameter zona hambat radikal terhadap *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa pada hari ke-3 cairan kultur isolat No.P301 sudah menghasilkan metabolit sekunder sebagai antibiotik terhadap *Staphylococcus aureus* dengan diameter zona hambat sebesar 0,70 cm. Diameter tersebut dari hari ke hari semakin bertambah dan produksi antibiotik tertinggi mulai hari ke 11 dengan diameter zona hambat sebesar 2,175 cm. Produksi antibiotik tersebut kurang lebih akan konstan setelah diinkubasi selama 11 hari, sehingga waktu pemanenan antibiotik yang optimal terhadap *Staphylococcus aureus* yaitu setelah diinkubasi minimal selama 11 hari. Gambar profil optimasi waktu produksi metabolit sekunder terhadap *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada gambar 11.



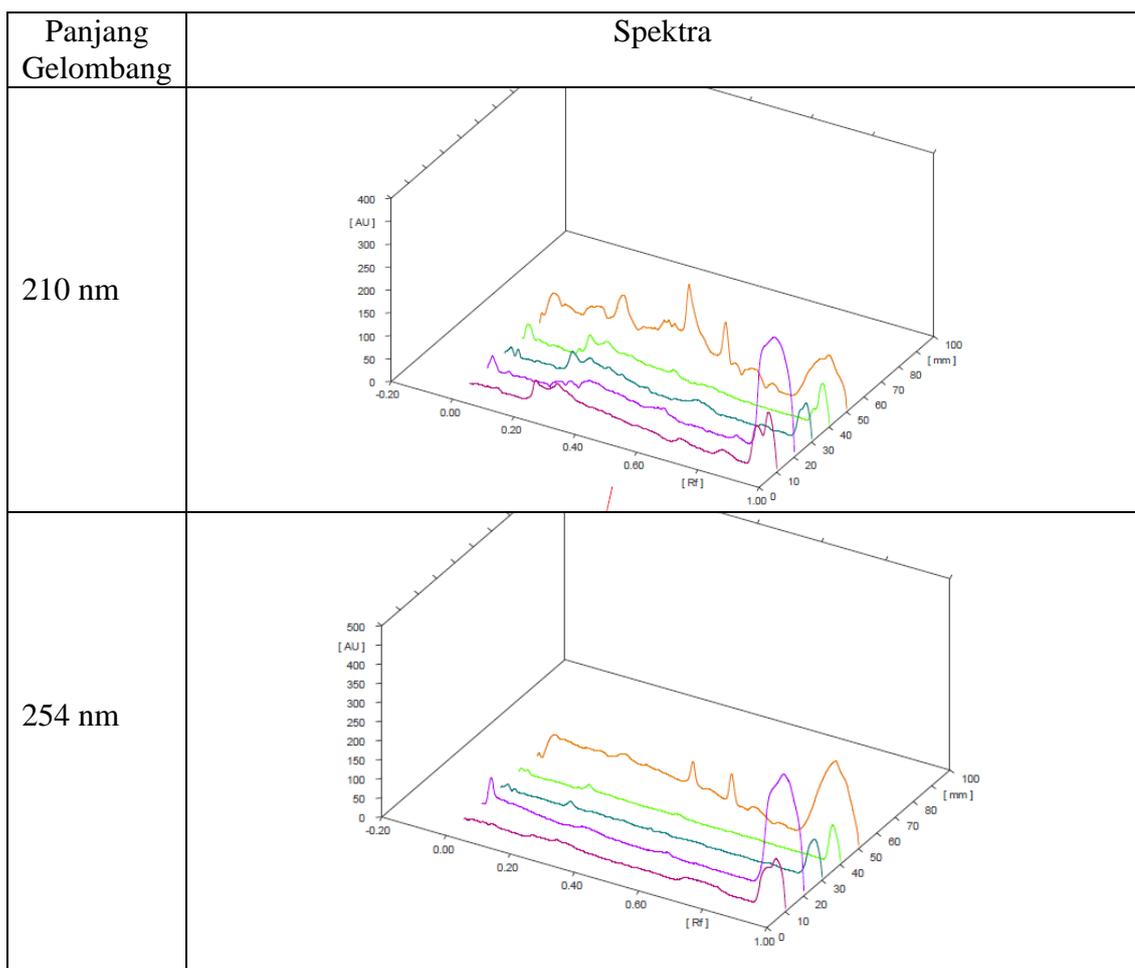
Gambar 11. Profil optimasi waktu produksi metabolit sekunder terhadap *Staphylococcus aureus*

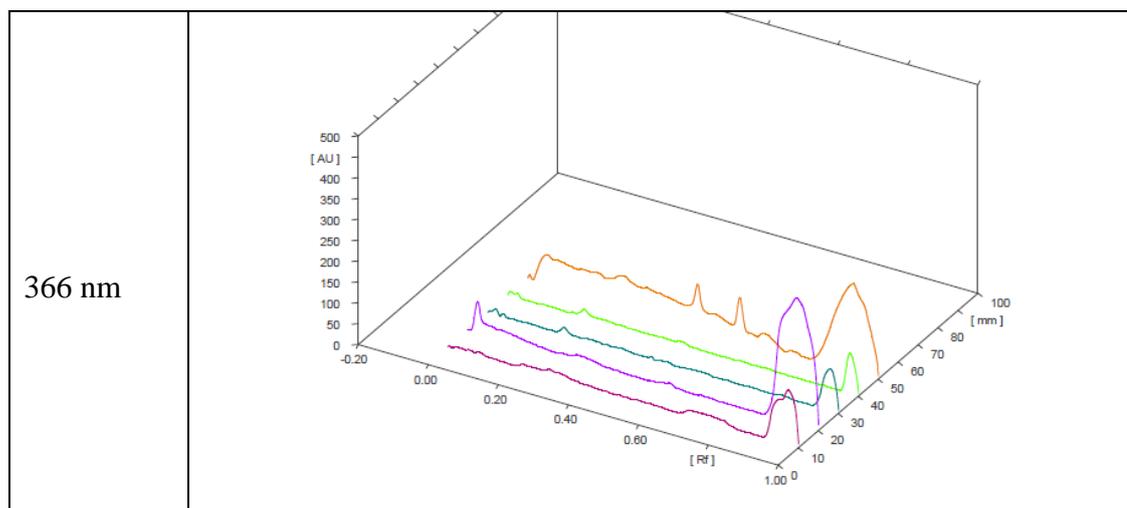
Penelitian yang dilakukan oleh Sulistiyani (2006) menunjukkan bahwa isolat Actinomycetes yang diisolasi dari tanah Pulau Timur Bagian Barat produksi antibiotik mencapai hasil tertinggi setelah diinkubasi selama 14 hari. Bila dibandingkan hasil tersebut di atas dari segi optimasi waktu, isolat Actinomycetes No.P301 membutuhkan waktu yang lebih cepat untuk memanen antibiotik dalam jumlah optimal dibandingkan dengan isolat Actinomycetes yang diisolasi dari tanah Pulau Timur Bagian Barat.

Hasil optimasi waktu produksi antibiotik digunakan menentukan lamanya inkubasi pada kultur produksi untuk isolat P301 yaitu selama 11 hari. Ekstrak etil asetat yang diperoleh dari cairan kultur isolat P301 dilakukan fraksinasi dengan metode triturasi. Triturasi adalah metode untuk mengambil senyawa yang bersifat sangat larut dalam pelarut yang digunakan. Pada penelitian ini digunakan 4 macam pelarut yaitu heksan, kloroform-metanol (95:5), kloroform-metanol (70:30) dan metanol. Pemilihan pelarut ini didasarkan pada pertimbangan bahwa Rf bercak aktif pada ekstrak etil asetat isolat P301 adalah 0,54 pada fase gerak kloroform-metanol

(70:30). Oleh karena itu, diduga senyawa aktifnya bersifat semi polar sehingga digunakan pelarut yang lebih non polar dan lebih polar dibanding kloroform-metanol (70:30). Fraksi hasil triturasi selanjutnya dianalisis KLT bioautografi.

Untuk membandingkan profil KLT tiap fraksi maka dilakukan TLC Scanning terlebih dahulu. Scanning dilakukan pada 3 panjang gelombang yaitu 210, 254 dan 366 nm. Diharapkan, salah satu diantaranya mendekati panjang gelombang maksimum senyawa aktif, sehingga bercak aktif dapat terlihat jelas. Gambaran spektra hasil scanning disajikan pada gambar 12.





Gambar 12. Hasil Analisis Kromatogram dengan TLC Scanner pada Panjang Gelombang 210 (A), 254 (B) dan 366 (C). Kromatogram yang discan adalah fraksi heksan (track 1), kloroform-metanol (95:5) (track 2), kloroform-metanol (70:30) (track 3), metanol (track 4) dan ekstrak (track 5)

Tabel 5. Data Spektra TLC Scanner Fraksi Hasil Fraksinasi

Fraksi	Panjang Gelombang	Data Spektra Kromatogram									
Heksan	210 nm	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %
		1	0.17	0.8	0.21	48.8	18.62	0.24	37.9	2584.5	16.19
		2	0.25	36.5	0.28	54.8	20.89	0.31	43.6	4054.1	25.40
		3	0.31	43.6	0.31	44.2	16.85	0.35	28.3	2642.1	16.55
		4	0.66	0.1	0.69	11.8	4.49	0.72	4.1	796.2	4.99
		5	0.79	0.0	0.83	14.2	5.41	0.87	0.5	1051.7	6.59
		6	0.90	0.0	0.94	88.4	33.74	0.95	70.6	4834.8	30.29
	254 nm	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %
		1	0.19	1.0	0.21	11.1	29.42	0.22	8.5	363.1	29.21
		2	0.66	0.1	0.69	13.9	37.06	0.69	13.5	405.5	32.62
		3	0.78	12.3	0.78	12.6	33.52	0.81	4.4	474.6	38.18
	366 nm	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %
		1	0.90	0.3	0.95	36.3	100.00	0.95	34.8	1807.1	100.00
CHCL ₃ -MeOH (95:5)	210 nm	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %
		1	0.00	10.2	0.01	30.0	20.54	0.04	0.0	960.2	13.25
		2	0.20	0.0	0.24	17.6	12.05	0.25	12.6	1013.4	13.99
		3	0.25	12.6	0.27	24.8	16.99	0.29	14.5	1383.2	19.09
		4	0.29	14.6	0.33	38.0	25.98	0.34	36.1	2171.1	29.96
		5	0.56	20.0	0.57	24.3	16.67	0.61	9.6	1244.9	17.18
		6	0.79	0.4	0.81	11.4	7.78	0.84	0.0	473.2	6.53

	254 nm	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Peak</th> <th>Start Rf</th> <th>Start Height</th> <th>Max Rf</th> <th>Max Height</th> <th>Max %</th> <th>End Rf</th> <th>End Height</th> <th>Area</th> <th>Area %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0.01</td> <td>0.2</td> <td>0.03</td> <td>73.4</td> <td>100.00</td> <td>0.06</td> <td>23.2</td> <td>2942.5</td> <td>100.00</td> </tr> </tbody> </table>	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	1	0.01	0.2	0.03	73.4	100.00	0.06	23.2	2942.5	100.00																																																																						
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %																																																																																			
1	0.01	0.2	0.03	73.4	100.00	0.06	23.2	2942.5	100.00																																																																																			
	366 nm	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Peak</th> <th>Start Rf</th> <th>Start Height</th> <th>Max Rf</th> <th>Max Height</th> <th>Max %</th> <th>End Rf</th> <th>End Height</th> <th>Area</th> <th>Area %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0.01</td> <td>0.3</td> <td>0.02</td> <td>34.8</td> <td>100.00</td> <td>0.04</td> <td>0.0</td> <td>897.4</td> <td>100.00</td> </tr> </tbody> </table>	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	1	0.01	0.3	0.02	34.8	100.00	0.04	0.0	897.4	100.00																																																																						
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %																																																																																			
1	0.01	0.3	0.02	34.8	100.00	0.04	0.0	897.4	100.00																																																																																			
CHCl ₃ - MeOH (70:30)	210 nm	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Peak</th> <th>Start Rf</th> <th>Start Height</th> <th>Max Rf</th> <th>Max Height</th> <th>Max %</th> <th>End Rf</th> <th>End Height</th> <th>Area</th> <th>Area %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0.00</td> <td>6.0</td> <td>0.02</td> <td>16.8</td> <td>7.59</td> <td>0.03</td> <td>0.4</td> <td>448.0</td> <td>3.73</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>0.03</td> <td>0.0</td> <td>0.04</td> <td>16.6</td> <td>7.47</td> <td>0.05</td> <td>0.1</td> <td>283.3</td> <td>2.36</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>0.19</td> <td>3.2</td> <td>0.22</td> <td>46.4</td> <td>20.93</td> <td>0.25</td> <td>28.1</td> <td>2730.9</td> <td>22.71</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>0.25</td> <td>28.1</td> <td>0.28</td> <td>43.3</td> <td>19.53</td> <td>0.29</td> <td>35.2</td> <td>2678.4</td> <td>22.27</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>0.32</td> <td>29.1</td> <td>0.34</td> <td>35.2</td> <td>15.88</td> <td>0.37</td> <td>23.5</td> <td>2262.1</td> <td>18.81</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>0.37</td> <td>23.5</td> <td>0.38</td> <td>28.0</td> <td>12.61</td> <td>0.42</td> <td>16.8</td> <td>1645.4</td> <td>13.68</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>0.59</td> <td>11.4</td> <td>0.63</td> <td>19.3</td> <td>8.70</td> <td>0.64</td> <td>15.5</td> <td>1190.0</td> <td>9.89</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>0.64</td> <td>15.5</td> <td>0.65</td> <td>16.2</td> <td>7.29</td> <td>0.69</td> <td>1.2</td> <td>789.0</td> <td>6.56</td> </tr> </tbody> </table>	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	1	0.00	6.0	0.02	16.8	7.59	0.03	0.4	448.0	3.73	2	0.03	0.0	0.04	16.6	7.47	0.05	0.1	283.3	2.36	3	0.19	3.2	0.22	46.4	20.93	0.25	28.1	2730.9	22.71	4	0.25	28.1	0.28	43.3	19.53	0.29	35.2	2678.4	22.27	5	0.32	29.1	0.34	35.2	15.88	0.37	23.5	2262.1	18.81	6	0.37	23.5	0.38	28.0	12.61	0.42	16.8	1645.4	13.68	7	0.59	11.4	0.63	19.3	8.70	0.64	15.5	1190.0	9.89	8	0.64	15.5	0.65	16.2	7.29	0.69	1.2	789.0	6.56
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %																																																																																			
1	0.00	6.0	0.02	16.8	7.59	0.03	0.4	448.0	3.73																																																																																			
2	0.03	0.0	0.04	16.6	7.47	0.05	0.1	283.3	2.36																																																																																			
3	0.19	3.2	0.22	46.4	20.93	0.25	28.1	2730.9	22.71																																																																																			
4	0.25	28.1	0.28	43.3	19.53	0.29	35.2	2678.4	22.27																																																																																			
5	0.32	29.1	0.34	35.2	15.88	0.37	23.5	2262.1	18.81																																																																																			
6	0.37	23.5	0.38	28.0	12.61	0.42	16.8	1645.4	13.68																																																																																			
7	0.59	11.4	0.63	19.3	8.70	0.64	15.5	1190.0	9.89																																																																																			
8	0.64	15.5	0.65	16.2	7.29	0.69	1.2	789.0	6.56																																																																																			
	254 nm	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Peak</th> <th>Start Rf</th> <th>Start Height</th> <th>Max Rf</th> <th>Max Height</th> <th>Max %</th> <th>End Rf</th> <th>End Height</th> <th>Area</th> <th>Area %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0.01</td> <td>4.4</td> <td>0.02</td> <td>14.0</td> <td>46.04</td> <td>0.03</td> <td>0.1</td> <td>339.5</td> <td>35.80</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>0.19</td> <td>0.1</td> <td>0.22</td> <td>16.4</td> <td>53.96</td> <td>0.24</td> <td>3.0</td> <td>608.9</td> <td>64.20</td> </tr> </tbody> </table>	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	1	0.01	4.4	0.02	14.0	46.04	0.03	0.1	339.5	35.80	2	0.19	0.1	0.22	16.4	53.96	0.24	3.0	608.9	64.20																																																												
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %																																																																																			
1	0.01	4.4	0.02	14.0	46.04	0.03	0.1	339.5	35.80																																																																																			
2	0.19	0.1	0.22	16.4	53.96	0.24	3.0	608.9	64.20																																																																																			
	366 nm	tidak terdeteksi																																																																																										
MeOH	210 nm	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Peak</th> <th>Start Rf</th> <th>Start Height</th> <th>Max Rf</th> <th>Max Height</th> <th>Max %</th> <th>End Rf</th> <th>End Height</th> <th>Area</th> <th>Area %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0.00</td> <td>0.1</td> <td>0.02</td> <td>33.8</td> <td>14.78</td> <td>0.04</td> <td>3.8</td> <td>1297.6</td> <td>10.16</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>0.17</td> <td>0.1</td> <td>0.19</td> <td>13.0</td> <td>5.71</td> <td>0.19</td> <td>8.7</td> <td>289.4</td> <td>2.27</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>0.19</td> <td>8.8</td> <td>0.22</td> <td>50.1</td> <td>21.92</td> <td>0.25</td> <td>34.0</td> <td>2812.2</td> <td>22.02</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>0.25</td> <td>34.1</td> <td>0.28</td> <td>45.5</td> <td>19.94</td> <td>0.32</td> <td>27.7</td> <td>4273.3</td> <td>33.45</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>0.34</td> <td>28.8</td> <td>0.35</td> <td>30.9</td> <td>13.51</td> <td>0.39</td> <td>22.2</td> <td>1832.9</td> <td>14.35</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>0.47</td> <td>17.8</td> <td>0.49</td> <td>25.3</td> <td>11.06</td> <td>0.52</td> <td>12.4</td> <td>1556.1</td> <td>12.18</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>0.93</td> <td>0.1</td> <td>0.95</td> <td>29.9</td> <td>13.09</td> <td>0.95</td> <td>29.4</td> <td>712.0</td> <td>5.57</td> </tr> </tbody> </table>	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	1	0.00	0.1	0.02	33.8	14.78	0.04	3.8	1297.6	10.16	2	0.17	0.1	0.19	13.0	5.71	0.19	8.7	289.4	2.27	3	0.19	8.8	0.22	50.1	21.92	0.25	34.0	2812.2	22.02	4	0.25	34.1	0.28	45.5	19.94	0.32	27.7	4273.3	33.45	5	0.34	28.8	0.35	30.9	13.51	0.39	22.2	1832.9	14.35	6	0.47	17.8	0.49	25.3	11.06	0.52	12.4	1556.1	12.18	7	0.93	0.1	0.95	29.9	13.09	0.95	29.4	712.0	5.57										
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %																																																																																			
1	0.00	0.1	0.02	33.8	14.78	0.04	3.8	1297.6	10.16																																																																																			
2	0.17	0.1	0.19	13.0	5.71	0.19	8.7	289.4	2.27																																																																																			
3	0.19	8.8	0.22	50.1	21.92	0.25	34.0	2812.2	22.02																																																																																			
4	0.25	34.1	0.28	45.5	19.94	0.32	27.7	4273.3	33.45																																																																																			
5	0.34	28.8	0.35	30.9	13.51	0.39	22.2	1832.9	14.35																																																																																			
6	0.47	17.8	0.49	25.3	11.06	0.52	12.4	1556.1	12.18																																																																																			
7	0.93	0.1	0.95	29.9	13.09	0.95	29.4	712.0	5.57																																																																																			
	254 nm	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Peak</th> <th>Start Rf</th> <th>Start Height</th> <th>Max Rf</th> <th>Max Height</th> <th>Max %</th> <th>End Rf</th> <th>End Height</th> <th>Area</th> <th>Area %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>0.02</td> <td>7.1</td> <td>0.02</td> <td>10.14</td> <td>35.59</td> <td>0.04</td> <td>0.0</td> <td>234.7</td> <td>21.09</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>0.19</td> <td>2.8</td> <td>0.22</td> <td>18.8</td> <td>64.41</td> <td>0.25</td> <td>6.2</td> <td>878.0</td> <td>78.91</td> </tr> </tbody> </table>	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	1	0.02	7.1	0.02	10.14	35.59	0.04	0.0	234.7	21.09	2	0.19	2.8	0.22	18.8	64.41	0.25	6.2	878.0	78.91																																																												
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %																																																																																			
1	0.02	7.1	0.02	10.14	35.59	0.04	0.0	234.7	21.09																																																																																			
2	0.19	2.8	0.22	18.8	64.41	0.25	6.2	878.0	78.91																																																																																			
	366 nm	tidak terdeteksi																																																																																										

Ekstrak	210 nm	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %
		1	0.04	20.0	0.05	74.1	6.65	0.07	50.8	5603.0	8.53
		2	0.07	51.1	0.08	57.2	5.13	0.12	46.4	3791.3	5.77
		3	0.14	44.8	0.17	68.7	6.17	0.17	68.1	3680,5	5.60
		4	0.19	73.2	0.20	74.3	6.66	0.22	52.7	2806.5	4.27
		5	0.22	52.8	0.27	112.9	10.13	0.32	46.9	12117.4	18.45
		6	0.32	47.0	0.34	58.1	5.21	0.35	56.0	2407.0	3.67
		7	0.38	58.9	0.40	84.6	7.59	0.41	81.2	3185.1	4.85
		8	0.41	81.4	0.42	86.2	7.73	0.43	76.0	2463.7	3.75
		9	0.43	76.0	0.44	83.6	7.50	0.45	72.6	2965.5	4.52
		10	0.46	72.4	0.49	176.5	15.83	0.57	41.0	16118.7	24.55
		11	0.57	40.9	0.60	118.5	10.63	0.62	29.6	5348.8	8.15
		12	0.62	29.7	0.64	35.9	3.22	0.66	13.8	1533.4	2.34
		13	0.66	13.8	0.69	34.8	3.12	0.70	34.1	1825.1	2.78
		14	0.70	34.2	0.70	34.5	3.09	0.73	0.0	1188.5	1.81
		15	0.74	0.1	0.76	15.0	1.35	0.78	0.9	630.4	0.96
	254 nm	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %
		1	0.01	0.1	0.05	69.2	16.76	0.07	61.4	4369.3	15.32
		2	0.24	56.1	0.28	70.6	17.08	0.31	54.3	7763.7	27.22
		3	0.45	42.6	0.48	101.9	24.66	0.51	38.5	6141.8	21.53
		4	0.51	38.6	0.53	42.8	10.35	0.58	28.5	3855.1	13.51
		5	0.58	28.5	0.60	98.8	23.91	0.63	20.7	4002.8	14.03
		6	0.65	17.1	0.68	29.9	7.24	0.73	0.1	2394.0	8.39
	366 nm	Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %
		1	0.01	0.2	0.05	14.3	10.60	0.08	2.6	897.1	16.58
		2	0.46	1.6	0.48	64.7	47.86	0.51	4.4	1971.4	36.44
		3	0.57	4.8	0.61	56.2	41.53	0.65	2.3	2542.0	46.98

Adapun hasil uji bioautografi dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 13. Hasil Uji KLT-Bioautografi. Fraksi yang Diuji dari kiri ke kanan adalah ekstrak, fraksi metanol, fraksi kloroform-metanol (70:30), kloroform-metanol

(95:5) dan heksan. Hanya ekstrak, fraksi kloroform-metanol (70:30) dan fraksi kloroform-metanol (95:5) yang memiliki bercak aktif

Berdasarkan tabel 5 dan hasil uji bioautografi tiap fraksi terhadap *S. aureus*, fraksi heksan tidak menghasilkan bercak aktif. Hal ini juga ditunjukkan pada data hasil scanning yaitu tidak munculnya Rf 0,54 baik pada deteksi dengan UV 210, 254 maupun 366 sebagai Rf bercak aktif pada uji bioautografi sebelumnya. Bercak yang memiliki % area terbesar terdapat pada Rf sekitar 0,9. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi heksan banyak mengandung senyawa-senyawa non polar.

Pada fraksi kloroform-metanol (95:5) terdeteksi bercak dengan Rf maksimum 0,57 (rentang Rf 0,56-0,61) pada sinar UV panjang gelombang 210 nm tetapi tidak muncul pada 254 dan 366 nm. Bercak tersebut diduga sebagai bercak aktif pada uji bioautografi. Bercak tersebut hanya terdeteksi pada UV 210. Hal ini sesuai dengan scanning panjang gelombang maksimum semua bercak (Tabel 2) yang menunjukkan bahwa bercak aktif isolat P301 memiliki 2 puncak dengan panjang gelombang 214 dan 254 nm. Oleh karena itu, diduga bercak aktif memiliki panjang gelombang maksimum 214 nm. Demikian halnya pada fraksi kloroform-metanol (70:30) terdeteksi bercak dengan Rf 0,63 (rentang Rf 0,59-0,64) yang diduga sebagai bercak aktif. Bercak ini juga tidak terdeteksi pada UV 254 dan UV 366 nm. Berdasarkan hal tersebut maka diduga senyawa aktif pada ekstrak, fraksi kloroform-metanol (95:5) dan fraksi kloroform-metanol (70:30) adalah senyawa yang sama. Namun demikian, bercak aktif tersebut terkandung dalam fraksi tersebut dengan konsentrasi yang relatif rendah yaitu 17,18% (dalam fraksi kloroform-metanol (95:5)) dan 9,89%

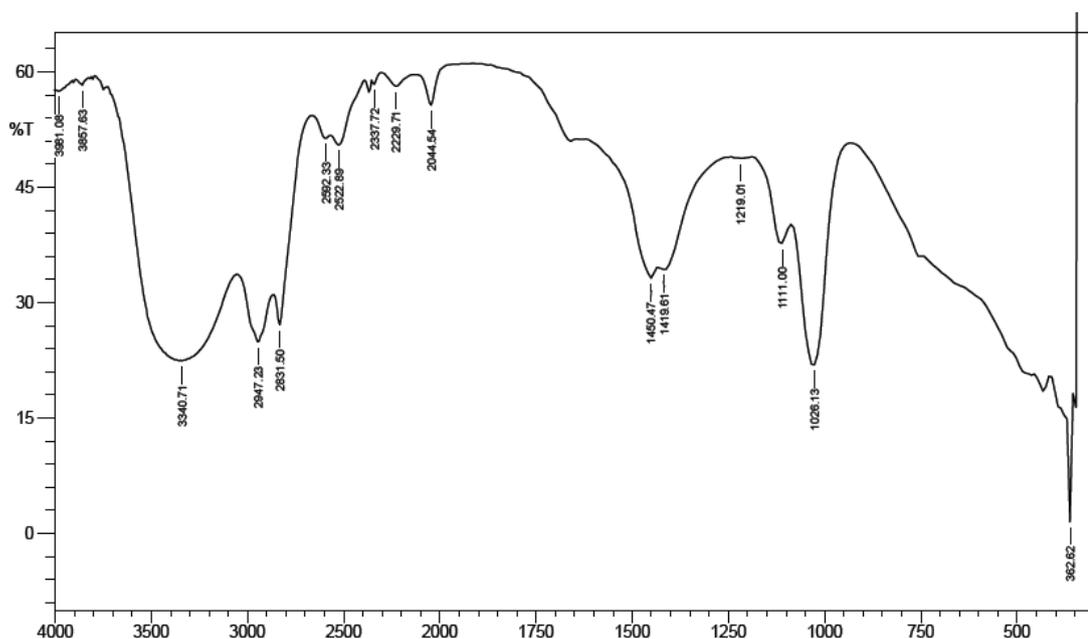
(dalam fraksi kloroform-metanol (70:30)) sehingga masih memerlukan proses pemurnian lagi untuk mendapatkan senyawa aktifnya.

Pada fraksi metanol, hasil scanning menunjukkan ada bercak dengan Rf 0,49 (rentan Rf 0,47-0,52) dengan % area sebesar 12,18%, namun fraksi ini tidak menghambat *S. aureus*, sehingga kemungkinan bercak ini berbeda dengan bercak aktif pada fraksi kloroform-metanol (95:5) dan fraksi kloroform-metanol (70:30).

Pada hasil scanning ekstrak dengan UV 210 nm, terdeteksi setidaknya 15 bercak. Bila dibandingkan dengan fraksi hasil triturasi, pada 210 nm terdeteksi 6-8 bercak, sehingga dapat dinyatakan bahwa proses triturasi sudah memisahkan atau menghilangkan 7-9 bercak pada ekstrak. Dengan demikian memudahkan proses pemurnian berikutnya. Pengamatan pada UV 210 menunjukkan adanya bercak pada Rf 0,49 (rentang Rf 0,46-0,57) dengan % area sebesar 24,55% (peak tajam) dan Rf 0,60 (rentang 0,57-0,62) dengan persentase area 8,15% (peak tajam). Bercak ini juga muncul pada UV 254 yang memiliki Rf 0,48 (rentang 0,45-0,51) dengan persentase area 21,53% (peak tajam), Rf 0,53 (rentang Rf 0,51-0,58) dengan persentase area 13,51% (peak sangat landai), dan Rf 0,60 (rentang 0,58-0,63) dengan persentase area 14,03% (peak tajam). Adapun pada UV 366 muncul Rf 0,48 (rentang 0,46-0,51) dengan persentase area 36,44% (peak tajam) dan Rf 0,61 (rentang 0,57-0,65) dengan persentase area 46,98% (peak tajam). Berdasarkan data ini, maka kemungkinan senyawa aktif muncul pada UV 210 dengan Rf 0,49 (rentang Rf 0,46-0,57) sebagai peak tajam yang memiliki % area lebih besar dibandingkan kemunculannya pada UV 254 sebagai peak landai pada Rf 0,53 (rentang Rf 0,51-0,58). Diduga peak Rf 0,49 (rentang Rf 0,46-0,57) pada UV 210 tersebut terdiri dari 2 bercak dengan Rf 0,48 (rentang 0,46-0,51) yang muncul sebagai peak tajam pada UV 366 serta Rf 0,53

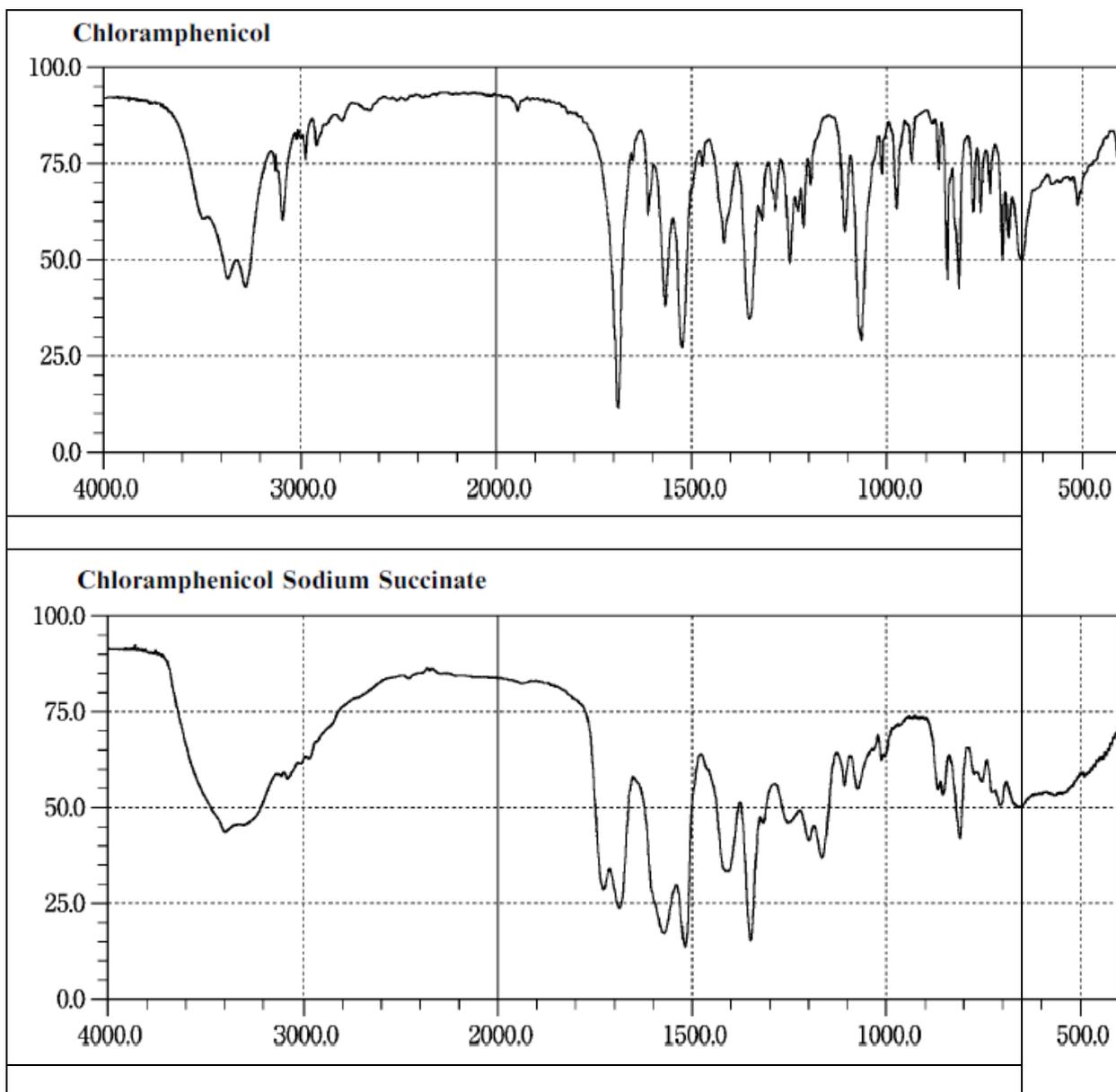
(rentang Rf 0,51-0,58) yang muncul sebagai peak sangat landai pada UV 254 dan tidak muncul di UV 366. Hal ini menguatkan dugaan bahwa Rf aktif adalah 0,53 yang muncul tajam pada UV 210 nm, sangat landai pada 254 nm dan tidak muncul pada 366 nm.

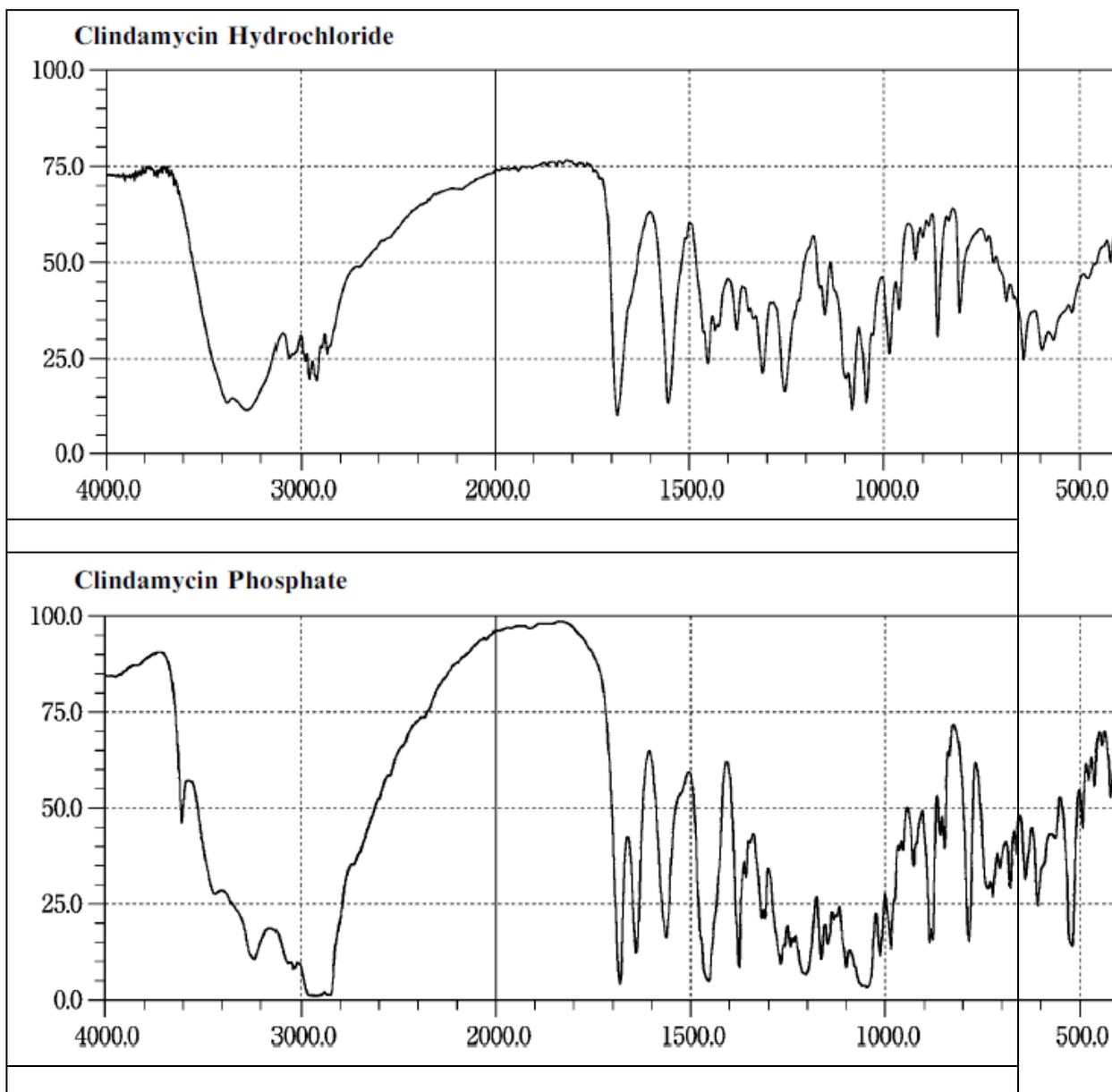
Adapun hasil analisis spektroskopi infra merah (FTIR) tersaji pada gambar 14. Analisis FTIR (*Fourier-transform infrared spectrophotometers*) dilakukan terhadap salah satu fraksi aktif yaitu fraksi kloroform-metanol (70:30). Pemilihan ini didasarkan pada pengamatan gambar 12 yang menunjukkan bahwa fraksi kloroform-metanol (95:5) menghasilkan peak pengotor yang sangat besar pada kisaran Rf di atas 0,9 dibandingkan fraksi kloroform-metanol (70:30).

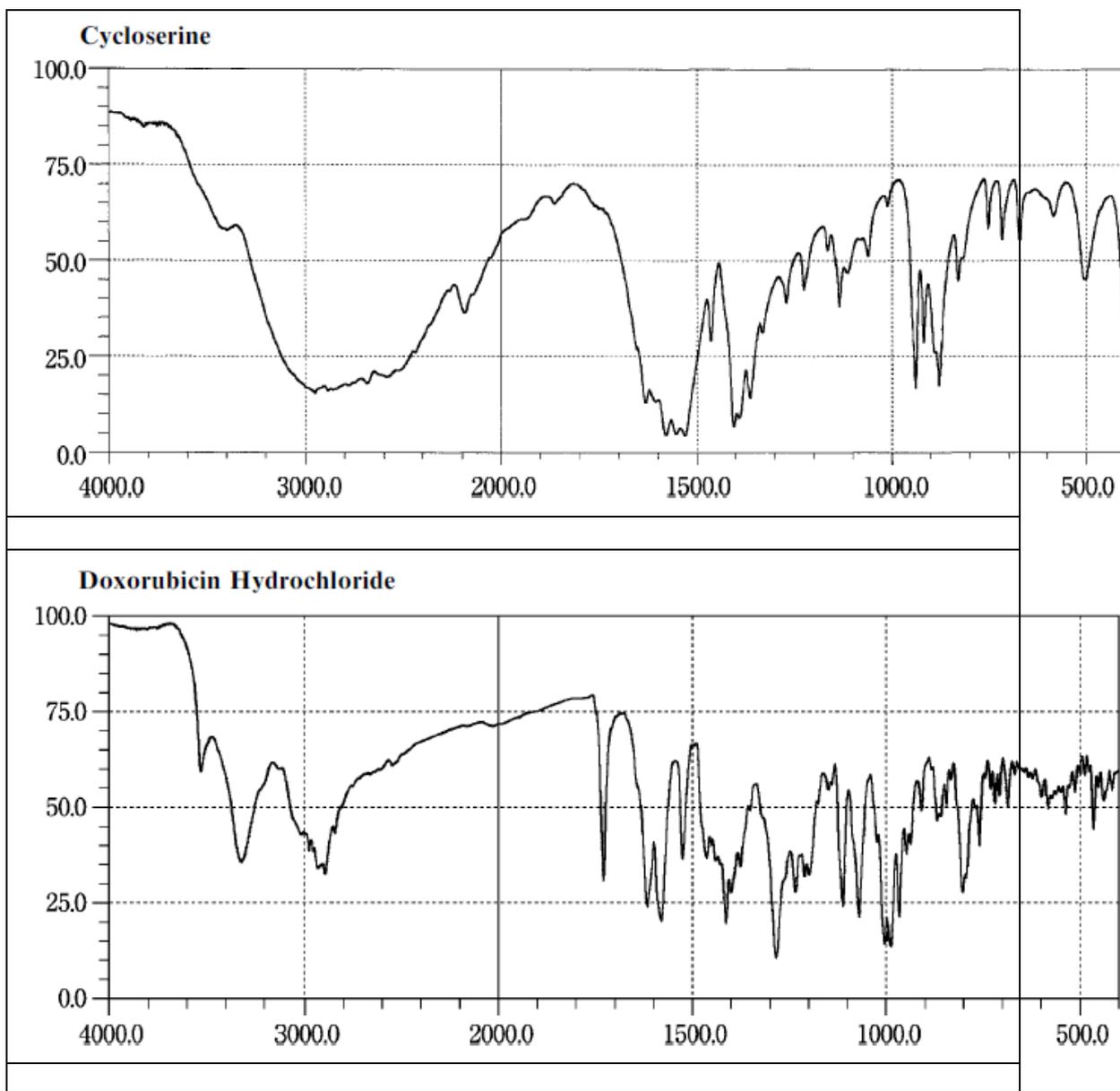


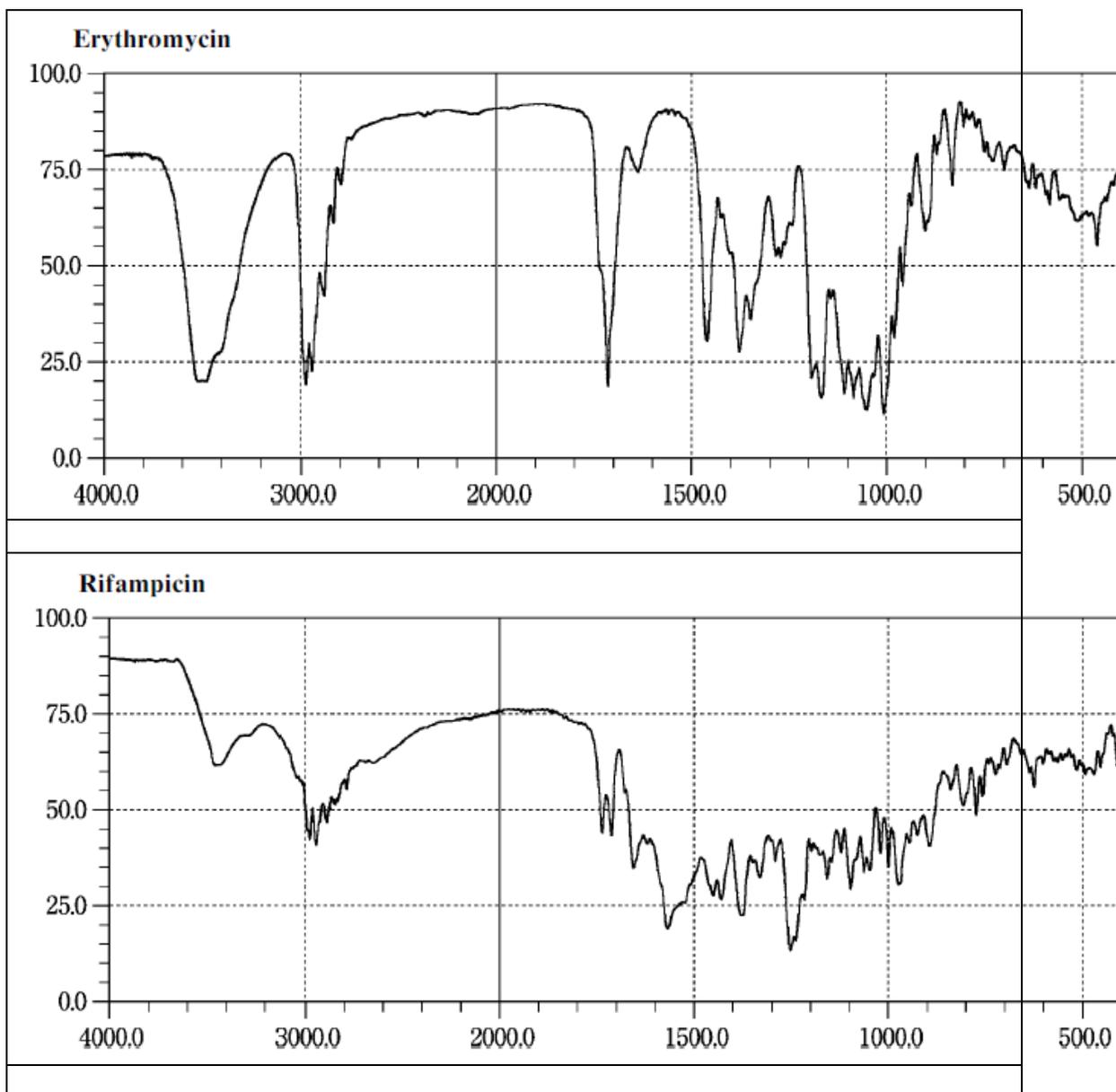
Gambar 14. Spektra IR fraksi kloroform-metanol (70:30) ekstrak etil asetat isolat P301

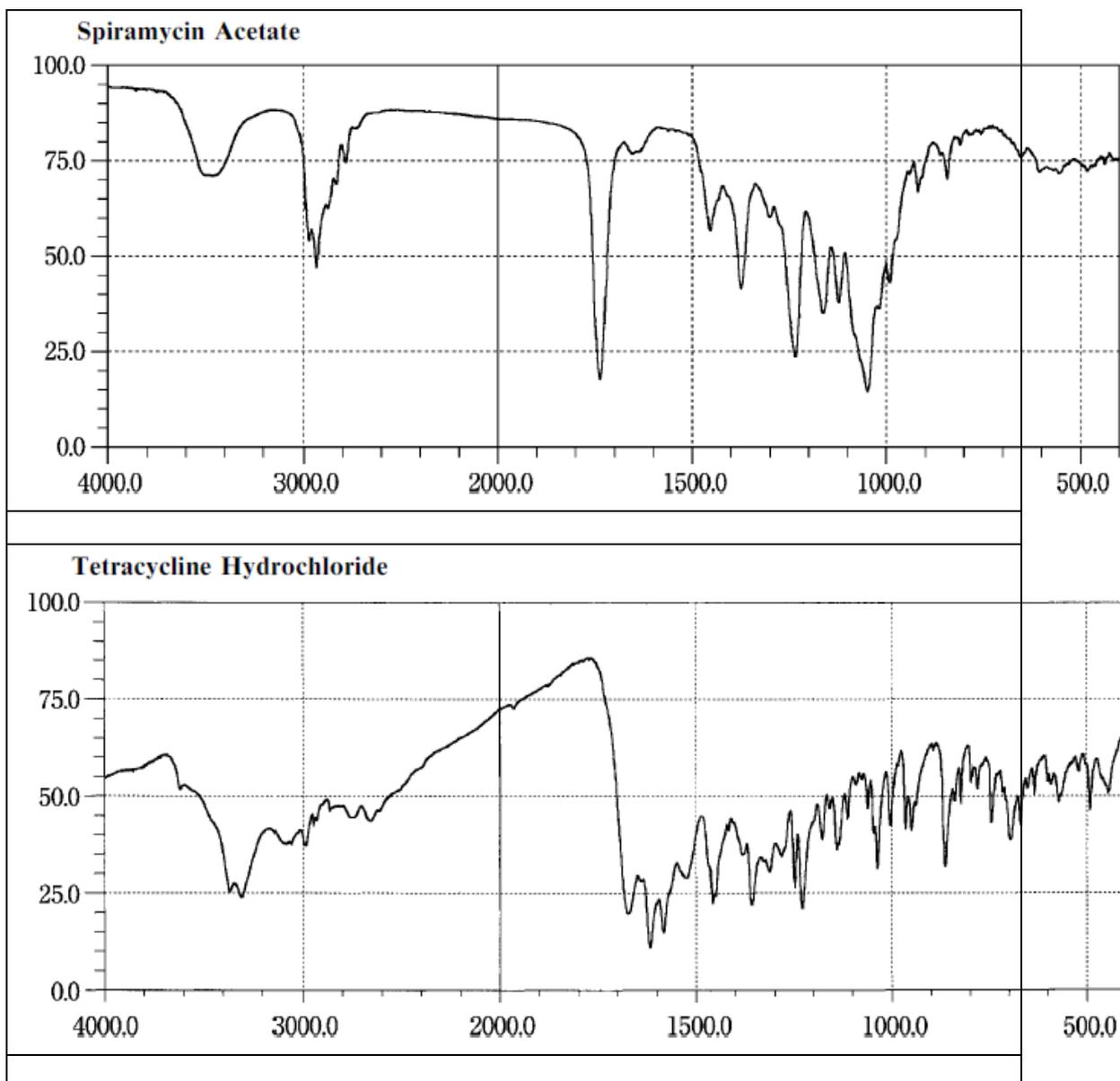
Adapun spektra standar FTIR beberapa antibiotik menurut Farmakope Jepang Edisi 16 tercantum pada gambar 15.

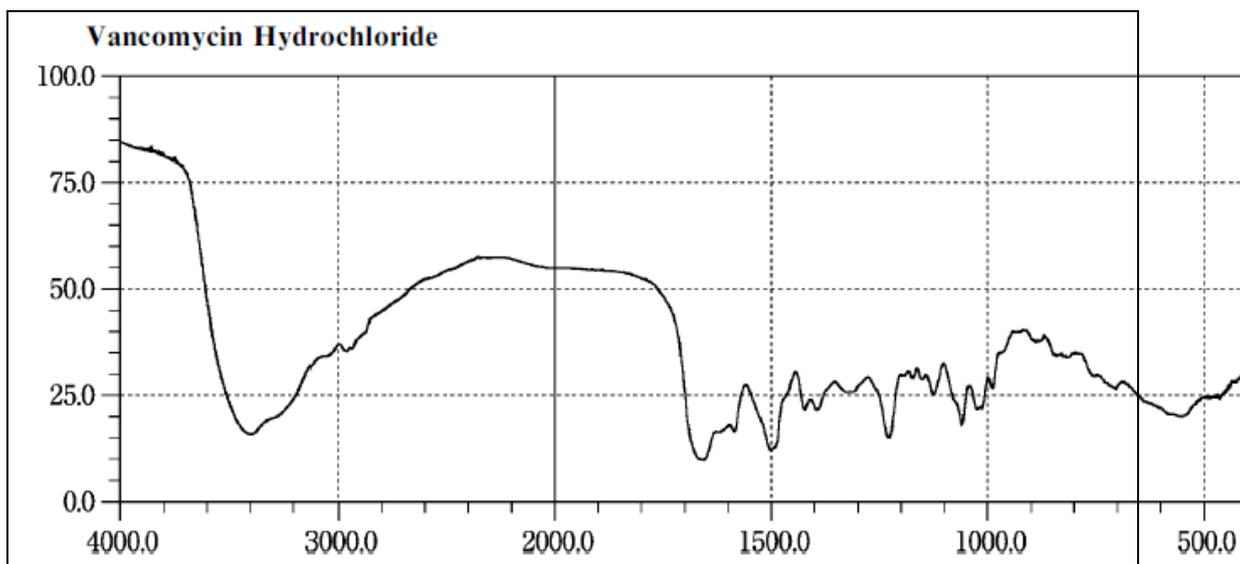










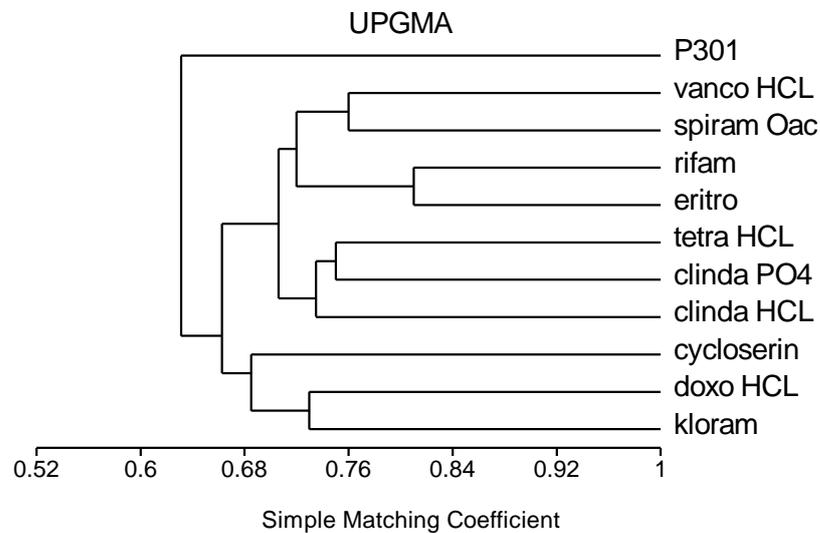


Gambar 16. Spektra Standar FTIR Beberapa Antibiotik Alami (Japan Pharmacopoea 16)

Adapun data spektra isolat P301 tercantum pada tabel 6.

	Peak	Intensity	Corr. Intensity	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Area
1	362.62	1.46	119.75	408.91	339.47	54.64	42.29
2	1026.13	21.9	21.83	1080.14	933.55	67.05	16.58
3	1111	37.63	4.52	1188.15	1087.85	37.06	1.58
4	1219.01	48.71	0.15	1242.16	1195.87	14.43	0.04
5	1419.61	34.28	0.79	1427.32	1249.87	64.91	0.36
6	1450.47	33.12	2.8	1620.21	1435.04	67.61	1.04
7	2044.54	55.63	4.54	2121.7	1944.25	40.69	1.72
8	2229.71	58.06	1.64	2299.15	2129.41	38.92	0.86
9	2337.72	58.35	0.82	2353.16	2306.86	10.58	0.11
10	2522.89	50.43	3.11	2569.18	2391.73	47.41	1.77
11	2592.33	51.29	0.8	2661.77	2576.9	23.76	0.27
12	2831.5	27.08	7.66	2862.36	2669.48	75.01	4.05
13	2947.23	24.83	7.26	3047.53	2870.08	97.06	9.66
14	3340.71	22.39	21.59	3726.47	3055.24	349.82	110.59
15	3857.63	58.21	0.77	3888.49	3834.49	12.52	0.13
16	3981.08	57.43	0.46	4004.22	3919.35	20.15	0.19

Data bilangan gelombang peak yang muncul dari isolat P301 kemudian dilakukan cluster analisis dengan data bilangan gelombang peak yang muncul pada antibiotik standar. Cluster analisis dengan perangkat statistik MVSP 3.21 menggunakan data bilangan gelombang setiap peak yang muncul dengan jumlah 100 variabel menggunakan metode Single Matching Coefficient. Hasil analisis kluster tercantum pada gambar 17.



Gambar 17. Analisis Kluster isolat P301 dan beberapa antibiotik standar

Antibiotik yang digunakan sebagai pembanding adalah 10 antibiotik alami dalam bentuk garam seperti vankomisin HCl, spiramisin asetat, tetrasiklin HCl, Klindamisin HCl, Klindamisin fosfat, doksorubisin HCl, rifamisin, eritromisin, sikloserin dan kloramfenikol. Berdasarkan gambar 17, dapat dijelaskan bahwa isolat P301 memiliki nilai koefisien yang paling rendah dan terpisah dari kelompok antibiotik standar. Oleh karena itu antibiotik pada isolat P301 berpotensi merupakan antibiotik baru.

Namun demikian, hal ini masih perlu dibuktikan lagi dengan elucidasi struktur pada periode penelitian berikutnya.

BAB VI

KESIMPULAN

1. Isolat yang menghasilkan antibiotik adalah T25 yang menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan P301 yang memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E.coli*
2. Isolat P301 berpotensi menghasilkan antibiotoik baru berdasarkan analisis kluster dengan metode Simple Match Coefficient
3. Hasil sequencing dengan primer 1492R terhadap gen 16S rRNA menunjukkan bahwa P301 memiliki kemiripan terdekat terhadap uncultured soil bacterium clone CS15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence sebesar 95%.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelmohsen UR, Pimentel-Elardo SM, Hanora A, Radwan M, Abou-El-Ela SH, Ahmed S, Hentschel U, 2010, Isolation, phylogenetic analysis and anti-infective activity screening of marine sponge-associated Actinomycetes, *Mar Drugs*, 8(3):399–412
- Ambarwati, Gama,A., 2009, Isolasi Actinomycetes Dari Tanah Sawah Sebagai Penghasil Antibiotik, *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, Vol. 10, No. 2, 2009: 101 – 111
- Ansari MZ, Yadav G, Gokhale RS, Mohanty D, 2004, NRPS-PKS: a knowledge-based resource for analysis of NRPS/PKS megasynthases, *Nucl Acids Res*, 32:W405–W413
- Ayuso A, Clark D, Gonzalez I, Salazar O, Anderson A, Genilloud O, 2005, A novel Actinomycetes strain de-replication approach based on the diversity of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic pathways, *App Microbiol Biotechnol*, 67:795-806
- Ayudo-Sacido, A., and Genilloud, O. 2005. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS - I systems in actinomycetes : detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb. Ecol.* 49, 10- 24.
- Baltz RH, 2008, Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes, *Curr Opin Pharmacol*, 8:557-563
- Banik JJ, Brady SF, 2008, Cloning and characterization of new glycopeptides gene clusters found in an environmental DNA megalibrary, *Proc Natl Acad Sci* 105:17273–17277
- Berdy,J., 2005, Bioactive microbial metabolites. A personal view. *J Antibiot* 58(1) :1–26
- Brady SF, Simmons L, Kim JH, Schmidt EW, 2009, Metagenomic approaches to natural products from free-living and symbiotic organisms, *Nat Prod Rep* 26:1488–1503
- Busti E, Monciardini P, Cavaletti L, Bamonte R, Lazzarini A, Sosio M, Donadio S, 2006, Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes, *Microbiology*. 152: 675–683.
- Cane,D.E, Walsh,C.T., Khosla,C., 1998, Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations, *Science*, 282:63–68
- Cane,D.E. , Walsh,C.T. , 1999, The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases, *Chem Biol*, 6:R319–

R325

Challis GL, 2008, Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways, *Microbiology*, 154:1555-1569

Clardy J, Fischbach MA, Walsh CT, 2006, New antibiotics from bacterial natural products, *Nat. Biotechnol.*, 24:1541-1550

Corre C, Challis GL, 2009, New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Nat Prod Rep* 26:977–986

Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ(ed.), 2005, *Anticancer agents from natural products*, Taylor & Francis, Boca Raton, FL

Craig JW, Chang FY, Brady SF, 2009, Natural products from environmental DNA hosted in *Ralstonia metallidurans*, *ACS Chem Biol* 4:23–28

Cremen PA, Zeng L, 2002, High-throughput analysis of natural product compound libraries by parallel LC–MS evaporative lightscattering detection, *Anal Chem* 74:5492–5500

Demain AL, Fang A, 2000, The natural function of secondary metabolites, *Biochem Eng Biotechnol* 69: 1–39

Elleuch L, Shaaban M, Smaoui S, Mellouli L, Karray-Rebai I, Fguira LF, Shaaban KA, Laatsch H, 2010, Bioactive Secondary Metabolites from a New Terrestrial *Streptomyces* sp. TN262, *Appl Biochem Biotechnol*, 162(2): 579–593

Enright MC, 2003, The evolution of a resistant pathogen-the case of MRSA. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:474-79.

Farida, Y., Widada, J., Meiyanto, E., 2007, Combination Methods for Screening Marine Actinomycetes Producing Potential Compounds as Anticancer, *Indonesian Journal of Biotechnology*, Vol. 12. No. 2, pp. 988-997

Field LD, Sternhell S, Kalman JR, 2008, *Organic Structures from Spectra*, Fourth Edition, John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England

Genilloud, O., Gonzalez, I., Salazar, O., Jesus Martin, J., Tormo, JR., Vicente, F., Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products, 2010, *J Ind Microbiol Biotechnol*, DOI 10.1007/s10295-010-0882-7

Guo, Y., Zheng, W., Rong, X., Huang, Y., 2008, A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 149–159

Greenberg, EP., 2003, Bacterial communication and group behavior. *J. Clin. Invest.* 112: 1288-90

- Hornung A, Bertazzo M, Dziarnowski A, Schneider K, Welzel K, Wohlert SE, Holzenkampfer M, Nicholson GJ, Bechthold A, Sussmuth RD, Vente A, Pelzer S, 2007, A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources, *Chembiochem* 8:757-766
- Hozzein WN, Ibrahim MA, Rabie AW, 2008, A new preferential medium for enumeration and isolation of desert actinomycetes, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:1547–1552
- Lang G, Mayhudin NA, Maya I, Mitova MI, Sun L, Sun L, van der Sar S, Blunt JW, Cole AJL, Ellis G, Laatsch H, Munro MHG, 2008, Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts, *J Nat Prod* 71:1595–1599
- Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, and Marinelli F, 2000, Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics, *Antonie van Leeuwenhoek* 78:399-405
- Mann J, 2001, Natural products as immunosuppressive agents, *Nat Prod Rep*, 18:417-430
- Marahiel MA, 1997, Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics, *Chem Biol* 4:561–567
- Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD, 1997, Modular peptide synthetases involved in non-ribosomal peptide synthesis, *Chem Rev*, 97:2615–2673
- Margavey, N.A., Keller, J.M., Bernan, V., Dworkin, M. Sherman, D.H., 2004, Isolation and Characterization of Novel Marine-Derived Actinomycete Taxa Rich in Bioactive Metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 70,7520 – 7529.
- Metsä-Ketelä, M., V. Salo, L. Halo, A. Hautala, J. Hakala, P. Mantsala, and K. Ylihönko, 1999, An efficient approach for screening minimal PKS genes from Streptomyces, *FEMS Microbiol Lett*, 180:1–6
- Nedialkova, D., & Naidenova, M., 2005, Screening the Antimicrobial Activity of Actinomycetes Strains Isolated from Antarctica, *Journal of Culture Collections* Volume 4, 2004-2005, pp. 29-35
- Nett M, Ikeda H, Moore BS, 2009, Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes, *Nat Prod Rep* 26:1362–1384
- Newman DJ, Cragg GM, 2007, Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, *J Nat Prod*, 70:461-477
- Nolan RD, Cross T, 1988, Isolation and screening of actinomycetes, p. 1–32 In Goodfellow M., Williams S. T., Mordarski M., editors. (ed.), *Actinomycetes in biotechnology*, Academic Press, Inc., San Diego, CA
- Okami Y, Hotta K, 1988, Search and Discovery of New Antibiotic, p. 33–58 In Goodfellow M., Williams S. T., Mordarski M., editors. (ed.), *Actinomycetes in*

biotechnology, Academic Press, Inc., San Diego, CA

Ogunmwonyi,IH., Mazomba,N., Mabinya,L., Ngwenya,E., Green,E., Akinpelu,DA., Olaniran,AO., Bernard,K., and Okoh,AI., 2010, Studies on the culturable marine actinomycetes isolated from the Nahoon beach in the Eastern Cape Province of South Africa, *Afr. J. Microbiol. Res.* pp.2223-2230

Oldfield C, Wood NT, Gilbert SC, Murray FD, Faure FR, 1998, Desulphurisation of benzothiophene and dibenzothiophene by actinomycete organisms belonging to the genus *Rhodococcus*, and related taxa. *Antonie van Leeuwenhoek* 74:119-132

Oskay M, Tamer AU, Azeri C, 2004, antibacterial activity of some Actinomycetes isolated from farming soil of Turkey, *Afr J Biotechnol*, 3 (9): 441-446.

Parungao,MM., Maceda, EBG., Villano,MAF.,2007, Screening of Antibiotic-Producing Actinomycetes from Marine, Brackish and Terrestrial Sediments of Samal Island, Philippines, *Journal of Research in Science, Computing, and Engineering* 4:3, pp. 29-38

Pratiwi,ST., 2008, *Mikrobiologi Farmasi*, Erlangga, Jakarta.

Riyanti, Widada,J., and Radjasa.OK., 2009, Isolation and Screening of Antimicrobial Producing-Actinomycetes Symbionts in Nudibranch, *Indonesian Journal of Biotechnology*, Vol. 14, No. 1, pp. 1132-1138

Rollins, D. M., & Joseph, S. W., 2000, *Actinomycetes Summary*, University of Maryland, Diakses : 10 April 2010. <http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/PathogenDescriptions/Actinomycetes.html>

Scherlach K, Hertweck C,2009, Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms *Org Biomol Chem* 7:1753–1760

Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC, 1986, *Penyidikan Spektrometri Senyawa Organik*, penterjemah Hartono AJ, Purba AV, Edisi IV, Erlangga, Jakarta

Smanski MJ, Peterson RM, Rajski SR, Shen B, 2009, Engineered *Streptomyces platensis* strains that overproduce antibiotics platensimycin and platencin. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1299–1304

Singh SB, Genilloud O, Peláez F, 2010, NP structural diversity II—secondary metabolite sources, evolution and selected molecular structures: terrestrial microorganisms—bacteria. In: Mander L, Liu H-W (eds) *Comprehensive natural products II. Chemistry and biology*. Elsevier, UK.

Song,J., Lee,S., Kang,J., Baek,H., and Suh,J., 2004, Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S–23S rDNA internally transcribed spacer sequences, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 203–209

Sulistiyani,N., Muhlis,M., Kustanti,ND., Erinto,E., Aquina,H., Zainab, 2009, Studi Resistensi *Staphylococcus aureus* Yang Diisolasi Dari Limbah Cair Beberapa Rumah Sakit Terhadap Antibiotika, *Prosiding Seminar Nasional Kesehatan Lingkungan Untuk Mewujudkan Sehat Jasmani Rohani Bagi Anak Bangsa*, 6 Januari 2009, Fakultas Kesehatan Masyarakat UAD,Yogyakarta.

Sulistiyani N., 2012, Pendekatan Analisis Gen PKS I, NRPS dan LC-MS untuk mendapatkan Antibiotik Baru dari Actinomycetes, *Laporan Penelitian Fundamental*, Fak Farmasi Univ Ahmad Dahlan, Yogyakarta

Sulistiyani N., 2013, Keragaman Isolat Actinomycetes Berdasarkan Analisis RFLP Terhadap Gen NRPS, *Farmaqiana, Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, Vol. 3 No. 1, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan (in published)

Suwandi, U. 1989. Mikroorganisme Penghasil Antibiotika. *Cermin Dunia Kedokteran* No. 58 : 37-40

Todar,K., 2009, *Online Textbook of Microbiology*, Madison, Wisconsin

Tohyama S, Eguchi T, Dhakal RP, Akashi T, Otsuka M, Kakinuma K, 2004, Genome-inspired search for new antibiotics Isolation and structure determination of new 28-membered polyketide macrolactones, halstoctacosanolides A and B, from *Streptomyces halstedii* HC34, *Tetrahedron* 60:3999-4005

Tormo JR, Garcia JB, DeAntonio M, Feliz J, Mira A, Díez MT, Hernandez P, Pelaez F, 2003, A method for the selection of production media for actinomycete strains based on their metabolite HPLC profiles, *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:582–588

Walksman SA, Henrici AT, 1943, The Nomenclature & Classification of The Actinomycetes, *J Bacteriol*, 46:337-341

LAMPIRAN**a. Personalia Peneliti**

No	Nama/NIDN	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Uraian Tugas
1	Dra. Nanik Sulistyani, M.Si., Apt/ 0510126701	Fak Farmasi Universitas Ahmad Dahlan	Biologi Farmasi	Fermentasi, Bioautografi, Pembuatan media,
2	Iin Narwanti, M.Sc/ 0511088301	Fak Farmasi Universitas Ahmad Dahlan	Kimia Farmasi	Elusidasi Struktur, Kromatografi

b. Naskah Publikasi (Proses Publikasi (Tahap Review) di Jurnal JIFI (Terakreditasi) Universitas Pancasila Jakarta

Aktivitas Cairan Kultur Bakteri Penghasil Antibiotik (Isolat P301) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan Optimasi Waktu Produksi Metabolit Sekunder

Culture Broth Activity of Antibiotic Producer Bacteria (Isolate P301) against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and Time Optimization of Secondary Metabolite Production

NANIK SULISTYANI¹, IIN NARWANTI

**Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan
Kampus III: Jl. Prof. Dr. Soepomo Janturan Umbulharjo Yogyakarta 55164**

Abstrak: Isolat P301 adalah bakteri penghasil antibiotik yang diisolasi dari rizosfer tanaman padi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari cairan kultur isolat P301 terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan mengetahui profil optimasi waktu produksi metabolit sekunder dari isolat P301 sebagai penghasil antibiotik. Aktivitas antibakteri ditetapkan dengan metode sumuran dengan mengukur zona hambat di sekitar sumuran. Penentuan profil optimasi waktu produksi metabolit sekunder yaitu dengan membuat grafik hubungan antara diameter zona hambat dengan waktu inkubasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa cairan kultur isolat P301 mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Berdasarkan uji aktivitas terhadap *S. aureus*, waktu produksi antibiotik yang optimal adalah setelah diinkubasi minimal selama 11 hari.

Kata kunci : Isolat P301, metabolit sekunder, optimasi waktu, *Staphylococcus aureus*

Abstract: Isolate P301 is an antibiotic producer bacteria isolated from rice plant ryzospher. This study was intended to identify the antibacterial activity of its culture broth againts *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and to identify the time optimization profile of secondary metabolite production from isolate P301 as producer antibiotics. Antibacterial activity was carried out using cupplate method by measuring the inhibitory zone around the wells. Optimization profile of production time of secondary metabolite was determined by plotting of the inhibition zone diameter versus incubation time. The result showed that isolate P301 culture broth inhibited the growth of *S. aureus*. According to the activity assay againts *S. aureus*, the optimum time for antibiotic production is after doing incubation for at least 11 days.

Keywords: Isolate P301, secondary metabolite, time optimization, *Staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

¹Penulis korespondensi, Tlp. (0274) 563515 ext. 3107
e-mail: naniksulistyani@gmail.com

Multiresistensi bakteri terhadap antibiotik menimbulkan masalah yang serius pada pengobatan penyakit infeksi. Mikroba multiresisten menjadi sulit diobati dengan antibiotik yang ada, sehingga menyebabkan penyakit menjadi semakin parah dan bahkan menyebabkan kematian pasien. Oleh karena itu pencarian antibiotik baru merupakan hal yang harus dilakukan untuk mengatasi hal tersebut^(1,2,3).

Mikroorganisme penghasil antibiotik tersebar dalam berbagai golongan, meliputi bakteri, actinomycetes dan fungi. Pada 22.500 senyawa biologis aktif yang diperoleh dari mikroba, 45% diantaranya dihasilkan actinomycetes, 38% oleh fungi, dan 17% oleh bakteri uniseluler⁽⁴⁾. Salah satu habitat dari mikroba tersebut adalah tanah. Populasi mikroba tanah banyak ditemukan di daerah rizosfer, yaitu lapisan tanah yang mengikuti sistem perakaran tanaman⁽⁵⁾. Tanah rizosfer banyak mengandung bakteri, jamur, dan actinomycetes dibanding tanah non rizosfer. Banyak mikroba rizosfer yang menjadi sumber penghasil antibiotik⁽⁶⁾. Salah satu bakteri penghasil antibiotik telah diisolasi dari rizosfer oleh Ramadhan⁽⁷⁾. Ramadhan berhasil mengisolasi 4 isolat bakteri dari rizosfer tanaman padi di Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta yang berpotensi menghasilkan antibiotik. Salah satu diantaranya adalah isolat P301. Isolat P301 telah diskining aktivitasnya dengan metode *agar block* dan menunjukkan mampu menghambat *S. aureus*.

Isolat P301 tersebut belum diuji lebih lanjut tentang kemampuannya mengasihkan antibiotik dalam media cair. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas cairan kultur isolat P301 terhadap *S. aureus* maupun waktu fermentasi optimal untuk produksi metabolit sekunder (antibiotik). Lama fermentasi yang optimal didasarkan pada aktivitas penghambatan supernatan cairan kultur terhadap bakteri uji. Waktu produksi metabolit sekunder (lama fermentasi) yang optimal dapat diperoleh dengan melakukan optimasi waktu produksi metabolit sekunder. Optimasi waktu produksi metabolit sekunder dapat ditentukan dengan membuat grafik hubungan antara waktu inkubasi dengan diameter zona hambat⁽⁸⁾.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat P301 hasil isolasi dari tanah sawah yang ditanami padi di Kampung Bembem, Kelurahan Trimulyo, Kecamatan Jetis, Kabupaten Bantul, DIY yang telah dilakukan oleh Ramadhan⁽⁷⁾. Bahan untuk mikroorganisme uji adalah media BHI, media Mueller Hinton, media TSA. Mikroorganisme uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus*

Alat. Alat-alat yang digunakan untuk membuat kultur terdiri dari timbangan analitik, alat-alat gelas, cork borer, magnet stirer, termoline, autoklave, lampu spritus, magnet stirer, termoline, blue tip, mikropipet, toples, tabung eppendorf, autoclave, pinset, lampu spritus. Alat-alat yang digunakan untuk uji aktivitas bakteri terdiri dari sentrifugasi SORVALL Biofuge *primo* R, alat-alat gelas, cork borer, mikropipet, yellow tip, lampu spritus, kulkas, inkubator. Semua alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini sebelumnya telah disterilkan terlebih dahulu.

METODE. Sterilisasi. Alat-alat yang disterilkan diantaranya erlenmeyer 250 mL yang berisi media SNB sebanyak 50 mL dan magnet stirer, erlenmeyer 500 mL yang berisi media SNB sebanyak 100 mL dan magnet stirer, pinset, tabung eppendorf, alat-alat gelas seperti corong dan gelas ukur. Kedua erlenmeyer ditutup dengan kertas payung dengan rapat, pinset dibungkus dengan kertas payung, tabung eppendorf dimasukkan dalam toples kaca yang di atasnya ditutup dengan aluminium foil, untuk alat-alat gelas dibungkus menggunakan kertas payung. Sterilisasi yang menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 20 menit diantaranya erlenmeyer yang sudah berisi media SNB, pinset, tabung eppendorf. Sedangkan untuk sterilisasi yang menggunakan oven pada suhu 171°C selama 2 jam yaitu alat-alat gelas.

Pembuatan Kultur Starter. Pembuatan starter dilakukan dengan cara memasukkan 1 plug isolat P301 ke dalam erlenmeyer yang berisi media SNB sebanyak 50 mL yang sudah disterilkan. Kultur starter diinkubasi pada suhu kamar selama 5 hari dengan pengadukan menggunakan Termoline.

Preparasi Kultur Uji. Preparasi kultur uji dilakukan dengan cara memasukkan 10 mL starter ke dalam erlenmeyer yang berisi 100 mL media SNB yang sudah disterilkan. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 20 hari dengan pengadukan menggunakan termoline. Selama inkubasi, setiap hari diambil 1 mL kultur dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan diberi label, lalu disimpan dalam *freezer*. Selanjutnya, semua kultur dalam eppendorf tersebut dikeluarkan dari freezer dan didiamkan di kulkas sampai mencair. Kultur uji yang sudah mencair, kemudian disentrifuse menggunakan SORVALL Biofuge *primo* R dengan kecepatan 5000 G selama 40 menit untuk diambil supernatnya. Supernatan ini disebut sampel cairan kultur.

Pembuatan Stok Bakteri *S. aureus*. Diambil 1 ose bakteri *S. aureus* dari stok biakan murni lalu dalam 1 mL BHI, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Selanjutnya diambil 1 ose dari kultur cair tersebut dan digoreskan pada media agar TSA. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah bakteri tumbuh disimpan pada suhu 4°C sebagai stok bakteri.

Pembuatan Suspensi Bakteri *S. aureus*. Satu ose dari stok bakteri disuspensikan ke dalam media cair BHI 1 mL, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Suspensi bakteri diambil 100 µL dimasukkan ke dalam tabung berisi 1 mL BHI lalu diinkubasi selama 3-5 jam pada suhu 37°C.

Pengujian Aktivitas Cairan Kultur Isolat P301 terhadap *S. aureus*. Petri yang berisi media Agar Mueller Hinton diolesi secara merata dengan suspensi bakteri *S. aureus*. Setelah itu dibuat sumuran pada media Mueller Hinton dengan menggunakan alat pembolong (*cork borer*) berdiameter 0,6 cm. Sebanyak 50 µL kultur starter dimasukkan ke dalam sumuran dan diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam untuk diamati diameter zone hambatnya.

Optimasi Waktu Produksi Metabolit Sekunder Isolat P301. Optimasi dilakukan dengan metode sama dengan uji aktivitas cairan kultur. Pada optimasi ini, cairan kultur harian yang diambil selama 20 hari diuji aktivitasnya terhadap *S. aureus*. Setelah itu setiap sumuran diisi dengan cairan kultur kurang lebih sebanyak 50 µL sesuai dengan urutan harinya. Setelah semua sumuran diisi media disimpan di kulkas selama 2 jam, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam untuk diamati zona hambatnya. Profil optimasi waktu produksi metabolit sekunder dibuat berdasarkan hubungan antara waktu inkubasi dengan diameter zona hambat.

Analisis Data. Analisis data dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat di sekitar sumuran yang diisi cairan kultur isolat P301 terhadap pertumbuhan *S. aureus*. Optimasi waktu produksi metabolit sekunder dianalisis dengan membuat grafik hubungan antara waktu inkubasi dengan diameter zona hambat yang dihasilkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Menurut identifikasi awal oleh Ramadhan⁽⁷⁾, isolat P301 termasuk kelompok Actinomycetes. Identifikasi awal dilakukan dengan pengecatan Gram dan pengamatan morfologi koloni pada media SNA yang diberi antifungi. Actinomycetes adalah bakteri Gram positif, yang telah menghasilkan lebih dari 70% dari semua antibiotik yang dikenal saat ini. Antibiotik ini secara alami dibentuk oleh evolusi untuk membuatnya efektif dalam membunuh mikroorganisme sebagai alat kompetitif⁽⁹⁾. Actinomycetes kelihatan dari luar seperti jamur dan membentuk berkas-berkas mirip hifa. Struktur Actinomycetes berupa filamen lembut yang sering disebut hifa atau miselia, sebagaimana yang terdapat pada fungi, memiliki konidia pada hifa yang menegak⁽¹⁰⁾. merupakan bakteri yang banyak ditemukan

tumbuh pada tanah yang berhumus, memiliki miselium, menghasilkan spora, dan tumbuh sangat lambat jika dibandingkan dengan bakteri pada umumnya. Strategi Actinomycetes untuk dapat bersaing dengan mikroba tanah lainnya adalah dengan menghasilkan enzim-enzim ekstraseluler dan senyawa antibiotik. Enzim ekstraseluler berguna mendegradasi senyawa kompleks menjadi senyawa sederhana yang berguna untuk pertumbuhan, sedangkan senyawa antibiotik berfungsi untuk menghambat pertumbuhan mikroba kompetitor⁽¹¹⁾. Actinomycetes terutama genus *Streptomyces* merupakan mikroba tanah yang mampu mensintesis metabolit sekunder. Metabolit yang dihasilkan berbeda-beda secara biologi seperti antibiotik, herbisida, pestisida, antiparasit, dan enzim seperti selulase xylanase yang sering digunakan dalam bioremediasi sampah⁽¹⁾.

Penelitian mengenai uji aktivitas cairan kultur isolat P301 terhadap *S. aureus* dan optimasi waktu produksi metabolit sekunder merupakan penelitian lanjutan dari penelitian yang dilakukan oleh Ramadhan⁽⁷⁾. Penelitian lanjutan ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan menghasilkan antibiotik dari isolat P301 terhadap *S. aureus* bila dikultur pada media cair SNB (*starch nitrate broth*). Selain itu, penelitian tentang optimasi waktu produksi metabolit sekunder isolat P301 sebagai penghasil antibiotik adalah untuk menentukan lama waktu fermentasi yang terbaik untuk memproduksi metabolit sekunder (antibiotik).

A. Preparasi Cairan Kultur Isolat P301

Untuk mendapatkan cairan kultur, maka dilakukan terlebih dahulu pengkulturan isolat P301. Dalam melakukan proses kultur mikroba harus digunakan media pertumbuhan yang sesuai dengan mikroba yang dikultur. Media pertumbuhan yang baik merupakan media yang mampu menyediakan sumber karbon dan mineral-mineral lain yang dibutuhkan untuk pertumbuhan maupun aktivitasnya⁽¹²⁾. Pada penelitian ini, media yang digunakan untuk mengkultur isolat P301 adalah SNB (*starch nitrate broth*). Media SNB mempunyai kandungan sumber karbon dan mineral. Sumber karbon media SNB berasal dari *soluble starch* yang mengandung sejumlah C yang beragam dari pati dan gliserol⁽¹³⁾. Sumber nitrogen anorganik (NO_3^-) berasal dari KNO_3 , mineral-mineral yang berasal dari magnesium, natrium, besi, kalium yang merupakan komposisi dari media SNB.

Kultur isolat P301 ini diinkubasi pada suhu kamar karena suhu optimum untuk pertumbuhan Actinomycetes adalah pada suhu sekitar $25\text{-}35^\circ\text{C}$ ⁽¹¹⁾. Selain itu, selama inkubasi, dilakukan pengadukan untuk menghomogenkan cairan kultur sehingga terjadi pemerataan nutrisi maupun bakteri yang dikultur dalam media fermentasi, sehingga hasil metabolit dapat ditingkatkan melalui peningkatan agitasi⁽¹⁴⁾. Proses inkubasi dilakukan di tempat yang tidak terkena cahaya matahari langsung, hal ini untuk menghindari kerusakan senyawa-senyawa yang mudah teroksidasi yang mungkin ada dalam kultur.

Selama proses kultur terjadi perubahan warna kultur, yaitu dari tidak berwarna (pada hari ke 0) hingga kuning kecoklatan mulai hari ke 9. Secara keseluruhan hasil pengamatan harian warna kultur isolat P301 dirangkum pada tabel 1. Dari hasil Tabel 1. terlihat bahwa pada hari ke kedua media SNB berwarna kuning pucat dan sudah mengalami kekeruhan serta terdapat butiran-butiran halus yang tersebar didasar media. Hal ini menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Perubahan warna tersebut terjadi hingga inkubasi hari ke duapuluh yaitu dari warna kuning pucat berubah menjadi warna coklat kehitaman. Bila mikroba ditanam pada media padat dan menghasilkan pigmen, bila pigmen dapat berdifusi pada media padat, maka akan menyebabkan media menjadi berubah warna sesuai warna pigmen yang dihasilkan⁽¹⁵⁾. Oleh karena itu, perubahan warna yang terjadi pada cairan kultur isolat P301 juga disebabkan karena isolat P301 mengeluarkan pigmen warna kuning hingga kecoklatan. Hal ini juga sesuai dengan hasil penelitian Ramadhan⁽⁷⁾ yang menunjukkan bahwa isolat P301 mempunyai pigmen terdifusi berwarna kuning pada media SNA (*Starch Nitrat Agar*). Perubahan warna cairan kultur isolat P301 tersebut juga diikuti

dengan bertambahnya jumlah pelet atau tingkat kekeruhan dari hari ke hari. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah sel bakteri yang dari hari ke hari semakin bertambah akibat adanya pertumbuhan sel, dan kemudian jumlah tersebut konstan setelah hari ke 10. Gambaran perubahan kenampakan kultur uji dapat dilihat pada Gambar 1.

Selama inkubasi, setiap hari dilakukan pengambilan kultur hingga hari ke 20. Selanjutnya cairan kultur disentrifuse, tujuan dilakukan sentrifuse ini adalah untuk memisahkan antara supernatan dengan endapan atau biomassa dari kultur yang diperoleh. Supernatan ini disebut sampel cairan kultur yang akan digunakan untuk menguji aktivitas dari cairan kultur isolat P301 terhadap *S. aureus*.

B. Uji Aktivitas Cairan Kultur Isolat P301 terhadap *S. aureus*

Uji aktivitas cairan kultur isolat P301 terhadap *S. aureus* ditujukan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa antibiotik dalam cairan kultur tersebut yang dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Uji dilakukan dengan metode sumuran yang merupakan salah satu metode difusi. Sebanyak 50 μ L cairan kultur dimasukkan dalam media Agar Mueller Hinton yang telah ditanami bakteri *S. aureus* kemudian disimpan dalam kulkas selama 2 jam agar cairan kultur terdifusi kedalam media. Media kemudian di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil penelitian menunjukkan adanya zona hambat (jernih) pada media dengan diameter 12,0 mm. Hasil uji aktivitas cairan kultur ini dapat dilihat pada Gambar 2. Zone hambat terbentuk karena senyawa antibiotik dalam cairan kultur berdifusi ke dalam agar dan menyebabkan tidak tumbuh atau terhambatnya pertumbuhan *S. aureus*.

Hasil penelitian Ramadhan⁽⁷⁾ terhadap potensi antibiotik isolat P301 dengan metode *agar block* menunjukkan penghambatan yang tinggi yaitu dengan zona hambatan 20,0 mm. Tujuan utama uji aktivitas cairan kultur pada penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah cairan kultur yang dihasilkan menunjukkan aktivitas antibiotik terhadap *S. aureus*. Hal ini dilakukan karena kemampuan produksi antibiotik pada media padat tidak selalu sama dengan bila dikultur pada media cair. Hasil penelitian Moncheva *et al.*⁽¹⁶⁾ dan Sulistiyani⁽¹¹⁾ (juga menunjukkan bahwa hasil uji positif (aktif) pada metode *agar block* tidak selalu menghasilkan aktivitas juga pada cairan kulturnya. Oleh karena itu, bila hasil uji aktivitas dengan metode *agar block* menunjukkan mampu menghambat bakteri tertentu, hasilnya belum tentu sama dengan hasil uji dengan metode sumuran.

C. Optimasi Waktu Produksi Metabolit Sekunder

Profil optimasi waktu produksi metabolit sekunder dapat digunakan untuk menentukan jangka waktu (durasi) yang tepat (optimal) dalam melakukan fermentasi untuk memproduksi antibiotik⁽¹⁷⁾. Pada penelitian ini, profil optimasi waktu produksi metabolit sekunder ini ditentukan dengan membuat grafik hubungan antara waktu inkubasi dengan diameter zona hambat pertumbuhan *S. aureus* dari tiap cairan kultur yang diambil tiap hari. Gambaran hasil optimasi disajikan pada Gambar 3 dan Gambar 4. Pada Gambar 3 nampak jelas bahwa zone hambat yang berupa jernih melingkar di sekeliling sumuran mulai nampak pada hari ke 3. Dengan bertambahnya hari inkubasi, zone tersebut semakin melebar hingga hari ke 11 dan kemudian konstan. Pertambahan lebar zone hambat menunjukkan bahwa jumlah antibiotik semakin banyak sehingga konsentrasi antibiotik dalam cairan kultur menjadi semakin besar.

Hasil pengukuran diameter zona hambat radikal terhadap *S. aureus* menunjukkan bahwa pada hari ke-3 cairan kultur isolat P301 sudah menghasilkan metabolit sekunder berupa antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan diameter zona hambat sebesar 0,70 cm. Ukuran diameter tersebut dari hari ke hari semakin bertambah dan produksi antibiotik tertinggi mulai hari ke 11 dengan diameter zona hambat sebesar 2,175 cm. Produksi antibiotik tersebut nampak konstan setelah diinkubasi selama 11 hari, sehingga

waktu pemanenan antibiotik yang optimal terhadap *S. aureus* yaitu setelah diinkubasi selama 11 hari. Oleh karena itu durasi fermentasi yang baik untuk memproduksi antibiotik dari isolat P301 adalah 11 hari.

Durasi fermentasi menjadi salah satu hal yang harus ditetapkan untuk mendapatkan produk metabolit sekunder maupun produk lain yang diinginkan secara optimal. Antibiotik yang merupakan metabolit sekunder banyak dihasilkan pada akhir fase eksponensial dan fase stasioner⁽¹⁸⁾. Optimasi-optimasi yang lain masih diperlukan, karena produksi antibiotik dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu komponen media dan kondisi kultur, seperti agitasi, aerasi, pH, dan temperatur yang berbeda-beda untuk setiap organisme. Komponen media yang berpengaruh adalah struktur kimia media dan konsentrasinya. Sumber karbon dan nitrogen biasanya memberikan pengaruh dalam produksi antibiotik. Agitasi akan mempengaruhi aerasi dan pencampuran nutrient dalam media fermentasi, sehingga hasil metabolit dapat ditingkatkan melalui peningkatan agitasi⁽¹⁴⁾. Oleh karena itu penelitian ini masih perlu dilanjutkan dengan optimasi berbagai kondisi tersebut, sehingga data diperoleh kondisi fermentasi yang paling optimal.

Setiap isolat mikroba penghasil antibiotik memerlukan kondisi yang berbeda-beda dalam memproduksi antibiotik. Sebagai contoh, penelitian yang dilakukan oleh Sulistiyani⁽¹¹⁾ menunjukkan bahwa isolat Actinomycetes yang diisolasi dari tanah Pulau Timur Bagian Barat produksi antibiotik mencapai hasil tertinggi setelah diinkubasi selama 14 hari. Bila dibandingkan hasil tersebut di atas dari segi optimasi waktu, isolat P301 membutuhkan durasi fermentasi yang lebih cepat dibandingkan dengan isolat Actinomycetes yang diisolasi dari tanah Pulau Timur Bagian Barat tersebut.

KESIMPULAN

1. Cairan kultur Isolat P301 mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.
2. Pemanenan antibiotik yang optimal dapat dilakukan setelah diinkubasi minimal selama 11 hari berdasarkan uji aktivitas terhadap *Staphylococcus aureus*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Oskay M, Terner U, Azeri C. Antibacterial Activity Of Some Actinomycetes Isolate From Farming Soils Of Turkey. African Journal of Biotechnology. 2004. 3(9): 441-446.
2. Parunago MM, Maceda EBG, Villano MAF. Screening of Antibiotic-Producing Actinomycetes from Marine, Brackish and Terrestrial Sediments of Samal Island, Phillipines. Journal of Research in Science Computing and Engineering. 2007. 4(3): 29-38.
3. Sulistiyani TR. Isolasi dan Karakterisasi Antibiotik dari Isolat Actinomycetes Tanah Pulau Timor Bagian Barat (NTT). Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. 2006.
4. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. A personal view. J Antibiot. 2005. 58(1): 1-26.
5. Dakora FD, Donald AP. Root Exsudates as Mediators of Mineral Acquisition in Low-nutrient Environments. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. Plant and Soil. 2002. 245:35-47.
6. Rao NSS. Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman. Jakarta : Universitas Indonesia Press. 1994
7. Ramadhan H. Isolasi Actinomycetes Penghasil Antibiotik Terhadap Escherichia Coli Dan Staphylococcus Aureus Dari Tanah Sawah. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan. 2012.
8. Rante H, Murti YB, Alam G. Purifikasi Dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri Dari Actinomycetes Asosiasi Spons Terhadap Bakteri Patogen Resisten. Majalah Farmasi Indonesia. 2010. 21(3): 158-165.

9. Ogunmwonyi IH, Mazomba N, Mabinya L, Ngwenya E, Green E, Akinpelu DA, Olaniran AO, Bernard K, Okoh AI. Studies on the culturable marine actinomycetes isolated from the Nahoon beach in the Eastern Cape Province of South Africa. *Afr J Microbiol Res.* 2010. 2223-2230
10. Rollins DM, Joseph SW. *Actinomycetes Summary*. University of Marland. 2000. diambil dari <http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424>. diakses 11 September 2012.
11. Sulistyani TR. *Isolasi dan Karakterisasi Antibiotik dari Isolat Actinomycetes Tanah Pulau Timor Bagian Barat (NTT)*. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. 2006.
12. Todar K. *Nutrition and Growth of Bacteria in Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Wisconsin: University Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. 2007.
13. Ali A. *Skrining dan Karakterisasi Parsial Senyawa Antifungi dari Actinomycetes Asal Limbah Padat Sagu Terdekomposisi*. Berk. Penel. Hayati. 2009.14:219-225.
14. Augustine SK, Bhavsar SP, Kapadis BP. Production Of Growth Dependent Metabolite Active Against Dermatophytes By *Streptomyces rochei* Ak 39. *Indian Journal of Medicine*. 2005. 121:164-170.
15. Ambarwati dan Gama T, Azizah. *Isolasi Actinomycetes dari Tanah Sawah Sebagai Penghasil Antibiotik*. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*, 2009.10(2):101-111.
16. Moncheva P, Tishkov S, Dimitrova N, Chipeva V, Nikolova SA, Bogatzevska N. Characteristics of Soil Actinomycetes From Antarctic. *Journal of Culture Collections*. 2002. 3(1):3-4.
17. Nanjwade BK, Chandrashekhara S, Goudanavar PS, Shamarez AM, Manvi FV. Production of Antibiotics from Soil-Isolated Actinomycetes and Evaluation of their Antimicrobial Activities *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* August. 2010. 9(4): 373-377
18. Darwis AA dan Sukara E. *Teknik Mikrobial*. Bogor: PAU IPB. 1989.

Daftar Tabel

Tabel 1. Hasil penampakan cairan kultur

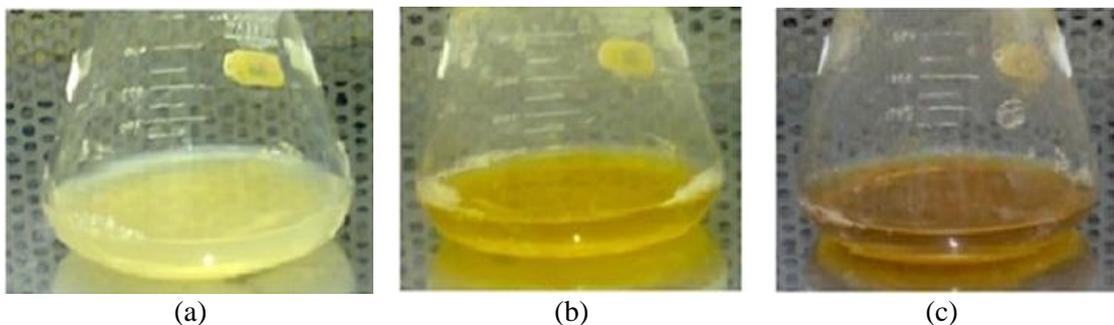
Hari ke-	Warna
1	Kuning muda
2	Kuning muda
3	Kuning muda
4	Kuning
5	Kuning
6	Kuning +
7	Kuning +
8	Kuning ++
9	Kuning kecoklatan
10	Kuning kecoklatan

11	Kuning kecoklatan
12	Kuning kecoklatan
13	Kuning kecoklatan
14	Kuning kecoklatan
15	Kuning kecoklatan
16	Kuning kecoklatan
17	Kuning kecoklatan
18	Kuning kecoklatan
19	Kuning kecoklatan
20	Kuning kecoklatan

Tabel 2. Diameter zona hambat radikal terhadap *S. aureus*

Hari	Diameter zona hambat (cm)	Hari	Diameter zona hambat (cm)
1		11	2.175
2		12	2.175
3	0.7	13	2.15
4	0.975	14	2.1
5	1.2	15	2.15
6	1.375	16	2.175
7	1.4	17	2.175
8	1.5	18	2.175
9	1.525	19	2.175
10	2.1	20	2.15

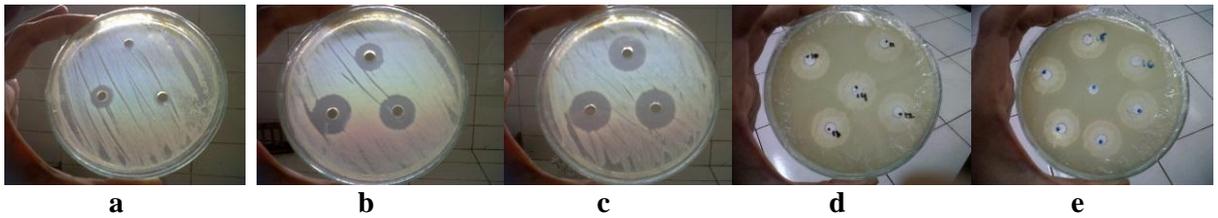
Daftar Gambar



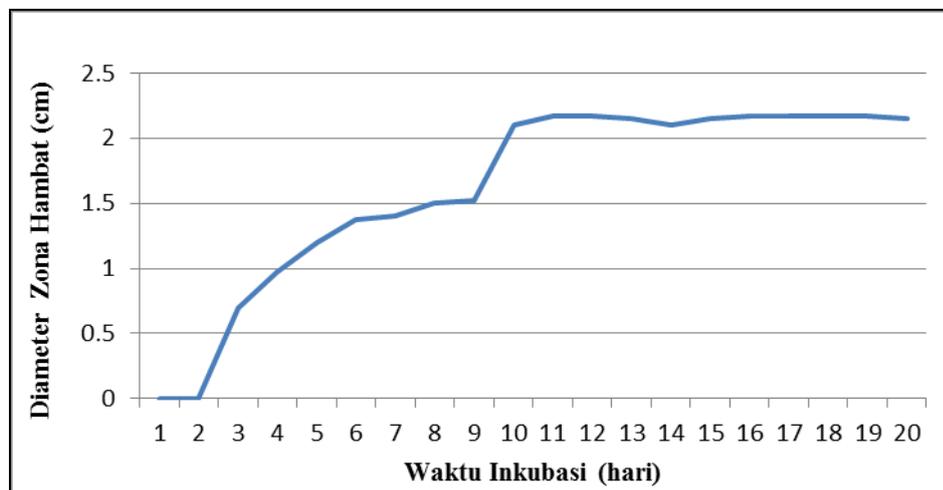
Gambar 1. Kultur Uji Isolat P301 setelah inkubasi selama: (a) 1 hari, (b) 7 hari, (c) 12 hari



Gambar 2. Hasil Uji Aktivitas Cairan Kultur Isolat P301



Gambar 3. Diameter zona hambat radikal terhadap *S. aureus* dari cairan kultur hari ke 1-3 (a), 4-6 (b), 7-9 (c), 10-14 (d) dan 15-20 (e).



Gambar 4. Profil optimasi waktu produksi metabolit sekunder dari isolat P301