

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI *ACTINOMYCETES* DARI RHIZOSFER BAKAU DI HUTAN BAKAU TOROSIAJE GORONTALO

¹Yuliana Retnowati, ²Langkah Sembiring, ³Sukarti Moeljopawiro, ⁴Tjut S. Djohan,
⁵Endang S. Soetarto,

¹FMIPA, Universitas Negeri Gorontalo, Jln. Jend. Sudirman No. 1, Kota Gorontalo.
^{2,3,4,5} Fak. Biologi, Universitas Gadjah Mada, Jln. Teknka Selatan, Yogyakarta.
Email : Yuliana_ri@yahoo.com

Abstrak

Actinomycetes penghasil antibiotik telah dieksplorasi dari berbagai sumber di lingkungan, terutama lingkungan ekstrim. Hutan bakau Torosiaje di Provinsi Gorontalo memiliki kondisi geomorfologi yang unik berupa ekosistem hutan bakau kars dengan dua tipe area yaitu tipe *fringe* dan *overwash mangrove* yang tersusun oleh jenis bakau yang bervariasi. Penelitian ini di desain untuk mendapatkan isolat *Actinomycetes* dari rhizosfer berbagai jenis bakau di hutan bakau Torosiaje Gorontalo dan menganalisis aktifitas antibakteri melawan bakteri patogen. Sampel tanah dikoleksi dari rizosfer tujuh jenis pohon bakau yaitu *Rhizophora mucronata* dan *Bruguiera gymnorhiza* pada tipe hutan *overwash*, *Rhizophora apiculata*, *Bruguiera gymnorhiza* pada zona *middle* tipe hutan *Fringe*, *Avicenia marina*, *Xylocarpus sp*, *Ceriops tagal* dan *Sonneratia alba* pada zona *upper* tipe hutan *fringe*. Pre-treatment sampel tanah berdasarkan metode panas basah pada suhu 60°C selama 15 menit. Isolasi selektif *Actinomycetes* menggunakan medium Starch Casein Agar yang disuplementasi dengan cyclohexamide dan nystatin. Seleksi isolat penghasil antibiotik berdasarkan metode agar blok menggunakan bakteri uji *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*. Aktifitas antibakteri ditandai dengan pembentukan zona hambat disekitar pertumbuhan actinomycetes. Diameter zona hambat dan diameter koloni *Actinomycetes* diukur untuk menentukan indeks zona hambat. Hasil penelitian diperoleh sebanyak 167 isolat *Actinomycetes* yang terdistribusi pada rizosfer 7 jenis bakau. 77 isolat *Actinomycetes* menunjukkan aktifitas antibakteri melawan bakteri patogen, terdiri dari 52 isolat melawan bakteri Gram-positif (*narrow spectrum*) dan 25 isolat melawan bakteri Gram-positif dan Gram-negatif (*broad spectrum*). Isolat *Actinomycetes* penghasil antibiotik memiliki karakter morfologi yang bervariasi yang didominasi oleh koloni berwarna putih dan pigmen terdifusi berwarna kekuningan sampai coklat dan dikelompokkan kedalam 15 grup.

Kata kunci : *Actinomycetes*, antibakteri, *overwash*, *fringe*, *colour grouping*

1. PENDAHULUAN

Actinomycetes merupakan kelompok bakteri Gram-positif penghasil senyawa bioaktif (Amrita et al., 2012). Sekitar 23,000 senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh mikroorganisme, lebih dari 10.000 diantaranya dihasilkan oleh *Actinomycetes* (Kanna et al.2011). Diantara *Actinomycetes*, sekitar 7600 senyawa dihasilkan oleh anggota genus *Streptomyces* (Berdy 2005; Chaudary et al. 2013). Sebagian besar senyawa bioaktif berpotensi sebagai antibiotik, sehingga *Streptomyces* merupakan organisme penghasil antibiotik utama yang dieksploitasi untuk kepentingan industri farmasi (Bredholdt et al., 2007).

Actinomycetes ditemukan melimpah di tanah terestrial sebagai sumber utama eksplorasi senyawa bioaktif. Namun dengan

munculnya permasalahan adanya rediscovery senyawa bioaktif dari actinomycetes terestrial, maka eksplorasi *Actinomycetes* mulai diarahkan ke lingkungan non-terestrial (Nolan dan Cross 1988; Mangamuri et al. 2014). Sekitar 26% dari senyawa bioaktif dihasilkan oleh rare-*Actinomycetes* yang diisolasi dari lingkungan non-terestrial (Berdy 2005). Salah satu lingkungan non terestrial sebagai sasaran eksplorasi *Actinomycetes* adalah ekosistem hutan bakau (Santhi et al.2010; Baskaran et al. 2011; Khanna et al. 2011; Naikpatil dan Rathod 2011; Ravikumar et al. 2011; Mangamuri et al. 2012; Mangamuri et al. 2014).

Hutan bakau merupakan ekosistem pantai dibawah kondisi dengan kondisi lingkungan yang ekstrem dibawah kondisi salinitas tinggi, pasang surut yang ekstrim, tekanan angin yang kuat, suhu tinggi dan berlumpur, dan tanah yang

anaerobik (Mitsch dan Gosselink, 2000; Alongi, 2009). Untuk merespon kondisi tersebut, maka organisme penyusun ekosistem bakau mampu mengembangkan kemampuan beradaptasi secara morfologi, biologis, ekologis, dan fisiologis (Mitsch dan Gosselink, 2000; Alongi, 2009). *Actinomycetes* merupakan salah satu kelompok bakteri yang mampu hidup di ekosistem hutan bakau. Kelompok bakteri tersebut memiliki karakter fisiologi, biokimia dan struktur selular yang spesifik untuk beradaptasi terhadap cekaman lingkungan (tekanan, salinitas dan suhu), yang diekspresikan melalui produksi metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologi (Basilio et al. 2003; Carla et al. 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat *Actinomycetes* dari rizosfer berberapa jenis pohon bakau di hutan bakau Torosiaje Gorontalo dan menguji aktifitas antagonis isolat *Actinomycetes* terhadap mikrobia patogen. Hutan bakau Torosiaje di provinsi Gorontalo merupakan salah satu ekosistem bakau yang menarik untuk dikaji. Hal tersebut dipengaruhi oleh kondisi geografis berupa ekosistem kars dengan suplai air tawar dari ground water, dan tipe hutan berupa *overwash* dan *fringe* dalam satu kawasan. Selain bervariasi secara geografis, masing-masing tipe hutan bakau didominasi oleh jenis bakau yang berbeda. Kondisi tersebut memberikan asumsi adanya kondisi fisikokimia yang berbeda, yang diharapkan berpengaruh pada komposisi isolat *Actinomycetes* penyusun ekosistem.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian -- Pengambilan sampel tanah rizosfer di hutan bakau di Desa Torosiaje, Kabupaten Pohuwato, Provinsi Gorontalo dilaksanakan pada akhir tahun 2015 dan penelitian laboratoris dimulai bulan Maret 2016 bertempat di laboratorium Mikrobiologi Fak. Biologi UGM.

2.2. Alat dan Bahan – Alat penelitian meliputi modified soil core, salinometer, GPS, palstik tempat sampel, petri dish, water bath, autoclave, laminar air flow, spektrofotometer. Bahan penelitian meliputi sampel tanah rizosfer 7 jenis bakau, medium pertumbuhan : Starch Casein Agar, Yeast Extract Malt Extract agar (ISP2), Nutrient Bakteri uji : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*; Antifungi : Cyclohexamide, Nystatin.

2.3. Pengambilan sampel tanah rizosfer – sampel tanah diambil pada rizosfer 7 jenis bakau (*R.mucronata*, *B.gymnorhiza*, *R.apiculata*, *S.alba*, *A.marina*, *C.tagal* dan *Xylocarpus* sp) yang terdistribusi pada 3 lokasi yaitu *overwash*, zona *middle* dan zona *upper* pada tipe *fringe*. Sampel tanah diambil pada kedalaman 0-10 cm menggunakan *modified soil core*.

2.4. Isolasi selektif *Actinomycetes* – Sampel tanah rizosfer di pre-treatment dengan pemanasan basah pada water bath suhu 60°C selama 15 menit dalam campuran air laut dan aquades (1:1 v/v) steril (Mangamuri et al. 2012; Malek et al. 2014). Suspensi tanah diencerkan sampai taraf pengenceran 10⁻⁶ dan sebanyak 100 µl diinokulasikan pada medium Starch Casein Agar (SCA) secara surface plate. Medium disuplementasi dengan 25 µg/ml cycloheximide dan 25 µg/ml nystatin (Baskaran et al. 2011). Petri diinkubasi pada suhu 28 ± 2 °C selama 10-28 hari. *Colony Forming Unit* (CFU) ditentukan dan koloni dengan morfologi berbeda diisolasi ke medium ISP 2 untuk selanjutnya dipindahkan kedalam medium ISP2 miring sebagai isolat murni.

2.5. Uji aktifitas antibakteri – uji aktifitas antibakteri isolat *Actinomycetes* melawan bakteri patogen berdasarkan metode agar blok. Medium Nutrient Agar dibuat sumuran sebanyak 5 buah dengan diameter 5 mm. Isolat *Actinomycetes* umur 28 hari pada medium ISP2 dicuplik dengan diameter 5 mm dan dipindahkan kedalam sumuran. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C±2 selama 7 hari. Bakteri uji *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*

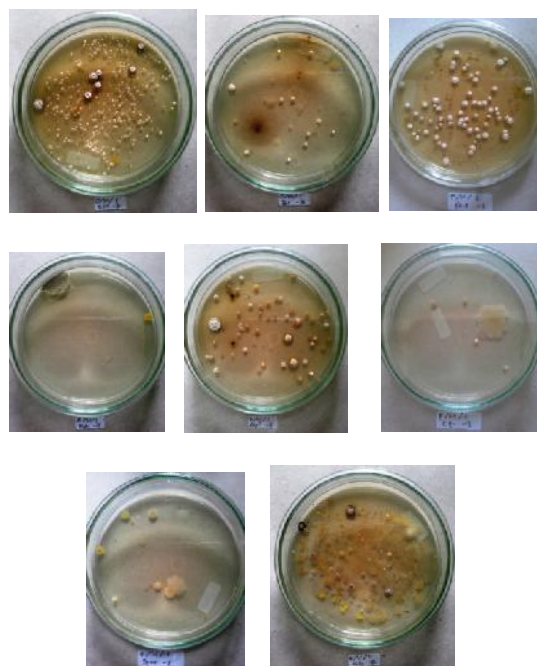
yang ditumbuhkan pada medium Nutrient Broth dan massa sel disamakan secara spektrofotometri pada OD 0,6. Sebanyak 300 μ l bakteri uji diinokulasikan di sekitar koloni *Actinomycetes* dengan metode *surface plate* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 2x24 jam. Diameter zona hambat di sekitar *Actinomycetes* dan diameter koloni *Actinomycetes* diukur untuk menentukan Indeks Zona Hambat.

2.6. Pengelompokan *Actinomycetes* penghasil antibiotik melalui *colour grouping* -- Isolat *Actinomycetes* penghasil antibiotik diinokulasikan pada medium ISP3 diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 – 28 hari. Karakter morfologi berupa warna miselium aerial dan pembentukan pigmen terdifusi pada medium dicatat sebagai dasar pengelompokan.

3. Hasil dan Pembahasan

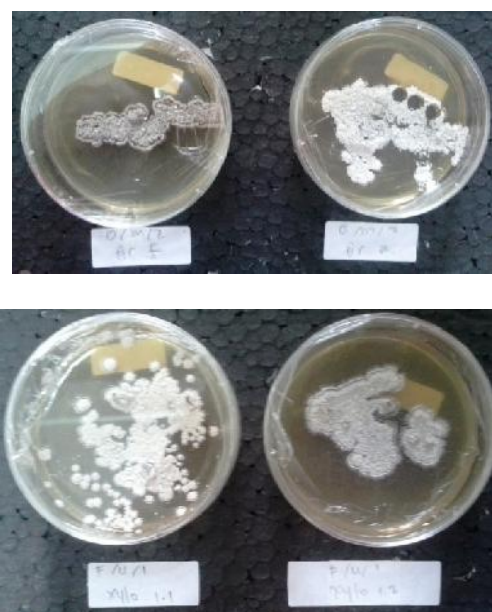
3.1. Isolasi dan purifikasi *Actinomycetes* dari rizosfer bakau – penelitian berhasil mengungkap keberadaan *Actinomycetes* di rizosfer 7 jenis pohon bakau yang terdistribusi pada dua tipe hutan berbeda di hutan bakau Torosiaje, Gorontalo. Medium SCA yang disuplementasi dengan cyclohexamide dan nystatin berhasil menumbuhkan *Actinomycetes* dengan bermacam karakter morfologi koloni (Gambar 1). Populasi *Actinomycetes* juga menunjukkan perbedaan pada setiap jenis bakau. Populasi *Actinomycetes* paling tinggi pada rizosfer *R.mucronata* dari tipe hutan overwash dan paling rendah pada rizosfer *R.apiculata* dari zona middle tipe hutan fringe. Sesuai dengan karakter hutan bakau tipe overwash yang mengalami pencucian secara periodik oleh pasang surut air laut, hal tersebut menyebabkan terjadi aliran nutrient yang kontinyu dari daratan dan lingkungan sekitarnya untuk selanjutnya terendapkan. Hal tersebut menyebabkan tingginya kandungan unsur-unsur yang mendukung pertumbuhan mikrobia tanah. Sedangkan kondisi geografis hutan bakau tipe *fringe* yang miring menyebabkan zona *middle* lebih banyak terespos oleh pasang surut air laut dibandingkan zona *upper*. Kondisi tersebut menyebabkan nutrient pada zona *middle* lebih banyak terangkut keluar zona. Zona *upper* cenderung tidak menerima

pasokan nutrient dari luar zona.



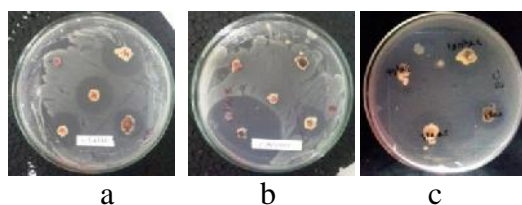
Gambar 1. Morfologi koloni *Actinomycetes* pada medium SCA yang disuplementasi dengan cyclohexamide dan nystatin.

Koloni yang menunjukkan morfologi berbeda selanjutnya dimurnikan sebagai isolat murni. Total sebanyak 167 isolat *Actinomycetes* yang berhasil diisolasi dari tanah rizosfer 7 jenis bakau (Gambar 2).



Gambar 2. Morfologi koloni isolat *Actinomycetes* yang diisolasi dari tanah rizosfer pohon bakau di hutan bakau Torosiaje Gorontalo.

3.2. Uji aktifitas antibakteri – 167 isolat *Actinomyces* yang berhasil diisolasi dari tanah izosfer pohon bakau, dilakukan uji aktifitas antibakteri melawan bakteri patogen berdasar metode agar blok. 3 jenis bakteri uji yang digunakan yaitu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*. Aktifitas antibakteri ditunjukkan dengan pembentukan zona hambat disekitar pertumbuhan *Actinomyces* (Gambar 3).



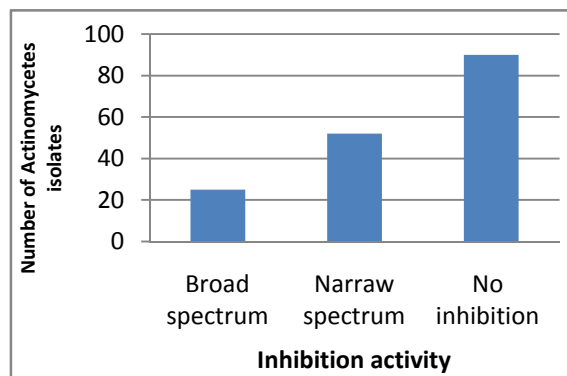
Gambar 3. Aktifitas antibakteri isolat *Actinomyces* terhadap bakteri patogen melalui pembentukan zona hambat disekitar pertumbuhan *Actinomyces*. a. Aktifitas antibakteri terhadap *B.subtilis*; b. Aktifitas antibakteri terhadap *S.aureus*; c. Aktifitas antibakteri terhadap *E.coli*

Diameter zona hambat yang terbentuk disekitar *Actinomyces* dan diameter koloni aktinomyces diukur untuk menentukan besaran indeks zona hambat. Hasil menunjukkan bahwa diantara 167 isolat *Actinomyces* terdapat 90 isolat tidak menunjukkan aktifitas penghambatan dan 77 memiliki aktifitas penghambatan yang terdiri dari 25 isolat menghambat kedua jenis bakteri gram positif dan gram negatif (broad spectrum) dan 52 isolat *Actinomyces* hanya mampu menghambat bakteri gram positif (narrow spectrum) (Gambar 4).

Aktifitas antagonis isolat *Actinomyces* terhadap bakteri patogen menunjukkan kemampuan produksi

senyawa bioaktif yang disintesis oleh bersifat antibakteri. Sebagian besar senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh *Actinomyces* gen polyketide synthetase (PKS) yaitu Polyketide synthetase I (PKS-I), polyketide synthetase II (PKS-II), enediyne polyketide synthase (PKSE) and nonribosomal peptide synthetase (NRPS) pathways (Meklat et al., 2011).

Perbedaan aktifitas penghambatan isolat *Actinomyces* terhadap bakteri gram negatif dan gram positif dapat diasumsikan adanya perbedaan jenis senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh masing-masing isolat. Perbedaan struktur dan komposisi dinding sel bakteri gram positif dan gram negatif mempengaruhi sensitifitas bakteri terhadap kehadiran senyawa bioaktif. Kemampuan penghambatan isolat *Actinomyces* terhadap bakteri patogen yang ditunjukkan dengan besaran indeks zona hambat (Izh) berbeda pada setiap isolat. Berdasarkan besaran indeks zona hambat, maka terdapat 3 golongan aktifitas antagonis yaitu rendah/Low ($Izh < 0,4$), sedang/Medium ($Izh 0,4 - <0,6$) dan tinggi/High ($Izh \geq 0,6$) (Tabel 4).



Gambar 4. Jumlah isolat *Actinomyces* yang menunjukkan aktifitas antagonis terhadap bakteri gram positif dan gram negatif

Tabel 4. Aktifitas antibakteri isolat *Actinomyces* melawan bakteri gram positif dan gram negatif

No	Sumber	Isolat	Diameter zona hambat (mm)			Indeks zona hambat			Mode hambat	Ket.
			<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>		
1	Rhizosfer	ORm1-1	0	24	24	0	0,46	0,42	L	Narrow Spectrum
2	<i>R.mucronata</i>	ORm1-4	0	25	22	0	0,52	0,45	L	
3		ORm1-1b	0	25	22	0	0,44	0,32	L	
4		ORm1-a	0	24	15	0	0,5	0,27	L	

Tabel 4. Lanjutan

No	Sumber	Isolat	Diameter zona hambat (mm)			Indeks zona hambat			Mode hambat	Ket.		
			<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>				
	overwash											
5		ORm1-1a	0	25	25	0	0,6	0,6	M	Narrow Spectrum		
6		ORm2-j1	0	25	20	0	0,52	0,45	L			
7		ORm2-i	0	16	24	0	0,37	0,5	L			
8		ORm2-a	0	24	25	0	0,5	0,52	M			
9		ORm2-d	0	25	28	0	0,52	0,54	M			
10		ORm2-j	0	25	20	0	0,6	0,5	M			
11		ORm3-a	0	25	29	0	0,56	0,55	M			
12		ORm3-b	0	26	30	0	0,5	0,53	M			
13		ORm3-e	0	29	20	0	0,55	0,4	L			
14		ORm3-e1	0	25	20	0	5,2	0,45	L			
15		ORm3-f	0	24	21	0	0,54	0,47	M			
16		ORm3-k	0	24	25	0	0,5	0,56	M			
17		ORm3-h	0	17	20	0	0,65	0,6	H			
18		ORm4-d	0	25	24	0	0,52	0,5	M			
19		ORm4-a	0	26	22	0	0,54	0,5	M			
20		ORm4-b1	0	27	25	0	0,56	0,56	M			
21		ORm2-f	15	10	18	0,2	0,2	0,17	L		Broad Spectrum	
22		B.gymnoriza	OBr1-3	0	15	22	0	0,27	0,45		L	Narrow Spectrum
23			OBr2-k	0	25	32	0	0,68	0,56		H	
24			OBr2-a	0	21	25	0	0,62	0,64		H	
25	OBr3-a		0	25	19	0	0,6	0,47	M			
26		OBr4-e	20	42	32	0,65	0,88	0,78	H	Broad Spectrum		
Tipe Fringe / Zona middle												
27	B.gymnoriza	FMBR2-d1	0	25	21	0	0,52	0,48	M	Narrow Spectrum		
28		FMBR2-x1	0	25	20	0	0,52	0,45	L			
29		FMBR2-a	0	26	24	0	0,54	0,5	M			
30		FMBR2-j	0	26	22	0	0,54	0,54	M			
31		FMBR2-i	0	24	21	0	0,5	0,48	L			
32		FMBR2-b	0	24	21	0	0,5	0,48	L			
33		FMBR2-x2	0	21	20	0	0,5	0,45	L			
34		FMBR2-X4	0	22	21	0	0,5	0,48	L			
35		FMBR2-X3	0	23	12	0	0,48	0,17	L			
36		FMBR3-a	0	30	22	0	0,67	0,45	M			
37		FMBR3-a1	0	29	22	0	0,62	0,45	M			
38		FMBR3-f	0	17	12	0	0,59	0,5	M			
39		FMBR4-i	0	24	20	0	0,5	0,4	L			
40		FMBR4-a	0	24	23	0	0,5	0,43	L			
41		FMBR4-g	0	22	30	0	0,45	0,5	L			
42		FMBR4-h	0	26	22	0	0,5	0,45	L			
43		FMBR4-i1	0	24	11	0	0,54	0,18	L			
44		FMBR4-i2	0	25	22	0	0,52	0,5	M			
45		FMBR4-k	0	24	12	0	0,5	0,17	L			
46		R.apiculata	FMRa3-a	0	20	25	0	0,65	0,64		H	Narrow Spectrum
47	FMRa3-b		0	21	24	0	0,67	0,54	H			
48	FMRa1-1		9	8	17	0,33	0,25	0,59	L	Broad Spectrum		
49	FMRa3-f		17	12	16	0,65	0,5	0,56	M			
50	FMRa3-c		25	24	22	0,6	0,5	0,55	M			
51	FMRa1-a		17	21	20	0,59	0,48	0,65	M			
Fringe / Zona upper												
52	Xylocarpus	FUXy3-c	0	22	21	0	0,68	0,71	H	Narrow Spectrum		
53		FUXy1-1.1	24	18	23	0,71	0,61	0,65	H	Broad Spectrum		
54		FUXy2-a	19	18	25	0,63	0,611	0,68	H			
55		FUXy2-b	23	21	23	0,69	0,67	0,69	H			
56		FUXy2-d	48	49	52	0,85	0,89	0,88	H			
57		FUXy3-b	19	19	24	0,63	0,53	0,63	M			
58		FUXy3-e	19	17	27	0,63	0,65	0,74	H			

Tabel 4. Lanjutan

No	Sumber	Isolat	Diameter zona hambat (mm)			Indeks zona hambat			Mode hambat	Ket.
			<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>		
59	Xylocarpus	FUXy3-f	25	21	23	0,72	0,67	0,74	H	Broad Spectrum
60		FUXy3-a	27	23	22	0,56	0,61	0,55	M	
61	C. tagal	FUCt4-c1.2	23	25	21	0,69	0,72	0,52	H	Broad Spectrum
62		FUCT4-c	15	19	18	0,53	0,47	0,61	M	
63	A.marina	FUAm2-k	0	34	19	0	0,68	0,47	M	Narrow Spectrum
64		FUAm4-b	0	16	20	0	0,69	0,6	H	
65		FUAm2-j	24	21	23	0,67	0,62	0,74	H	Broad Spectrum
66		FUAm2-h1	42	46	41	0,86	0,87	0,88	H	
67		FUAm2-a	10	20	10	0,3	0,5	0,3	L	
68		FUAm3-c	24	27	26	0,58	0,63	0,65	H	
69		FUAm3-a	16	21	25	0,62	0,67	0,6	H	
70		FUAm3-b	14	20	26	0,57	0,7	0,65	H	
71		FUAm4-a1	25	21	28	0,66	0,62	0,5	M	
72		FUAm4-a2	29	25	29	0,66	0,6	0,49	M	
73		FUAm4-h	29	22	27	0,66	0,68	0,56	H	
74	S.alba	FUSa2-d	0	9	8	0	0,44	0,12	L	Narrow Spectrum
75		FUSa2-e	0	21	22	0	0,67	0,68	H	
76		FUSa3-a	0	18	20	0	0,56	0,65	H	
77		FUSa3-b	0	22	23	0	0,64	0,61	H	

Isolat *Actinomycetes* penghasil antibiotik menunjukkan karakter morfologi yang beragam. Berdasar karakter morfologi warna miselium aerial dan pigmen terdifusi, maka terdapat isolat *Actinomycetes*

penghasil antibiotik dikelompokkan menjadi 15 kelompok yang didominasi oleh isolat warna putih dengan warna pigmen terdifusi bervariasi dari kekuningan dan coklat (Tabel 5).

Tabel 5. Pengelompokkan isolat *Actinomycetes* penghasil antibiotik berdasar karakter morfologi warna miselium aerial dan pigmen terdifusi.

Grup	Kode Isolat	Warna miselium aerial dan bentuk koloni	Pigmen terdifusi
1 (22 isolat)	FUXy3-e1; FUXy3-a; ORm3-e; FUXy2-a; FUXy3-g; FUAm4-a1; FMRA3-b; OBg2-a; OBg2-k; OBg2-g; FUXy2-b; FUXy3-e; ORm3-a; FUSa2-e; FMBg4-a; FUAm2-k; ORm1-1b; FUSa3-a; FMBg2-d1; FMBg4-k; FUAm2- a; ORm1- a	Putih, bulat cembung	Kekuningan
2 (11 isolat)	FMRA3-c; FUAm3-c; FUAm2-j; FMBg2-j; FMBg2-b; FMBg2-1; ORm2-j; FMBg4-i2; FUXy3-c; ORm2-j1; ORm3-c	Putih, bulat dalam 2 lingkaran atau titil di tengah koloni	kekuningan
3 (6 isolat)	FUCT4-c1; FMBg2-x4; FMBg4-h; ORm3-h, OBg3-a; FMRA3-f,	Putih kusam, bulat cembung	Kecoklatan
4 (2 isolat)	FMBg4-g, FUAm3- b	Putih kecoklatan	Coklat
5 (2 isolat)	FMBg3-a; FUXy3-f	Putih, tengah koloni mengkilat di awal pertumbuhan, lama kelamaan hilang	Putih kecoklatan
6 (4 isolat)	FUAm4-h; FMBg2-a; ORm1-1; FMRA3-a	Putih, bulat	putih
7 (7 isolat)	FUCT4-c1.2; ORm3-e1; FUAm3-i; ORm4-b1; ORm2-d; FUSa3-b; FUAm3-a	Putih	Coklat
8 (1 isolat)	FUAm2-m	Putih, bulat berkembang dari warna awal krem	Kekuningan
9 (6 isolat)	FMBg3-a1; ORm3-k; ORm2-g; ORm2-a; FUAmi-a2, FUCT4-c2,	Putih, cembung	Kecoklatan
10 (1 isolat)	FUXy2-d	Putih dari warna awal transparan	Putih
11 (1 isolat)	FUAm2-h1	Kuning	Kekuningan

Tabel 5. Lanjutan

Grup	Kode Isolat	Warna miselium aerial dan bentuk koloni	Pigmen terdifusi
12 (1 isolat)	ORm3-f	Putih	Putih
13 (2 isolat)	FMBg2-x1; OBg4-e	Putih	Kuning
14 (3 isolat)	FMBg4-i; ORm2-d; FMBg4-a	Putih	Kekuningan
15 (4 isolat)	OBg2-h; ORm1-4; FUXy3-b; ORm3-b	Putih kusam, bulat, tengah koloni bentuk titik atau berpendar coklat	kecoklatan

Pembahasan – *Actinomyces* merupakan salah satu organisme penyusun ekosistem hutan bakau yang berperan penting dalam siklus biogeokimia unsur (Alongi, 2009; Ravikumar et al., 2011). Organisme tersebut terdistribusi di tanah rizosfer maupun non rizosfer (Jing Xiao 2009; Ravikumar et al. 2011), dan sebagian bersifat endofit pada akar, batang dan daun bakau (Ravikumar et al. 2011; Gayathri dan Muralikrishnan 2013; Govindasamy dan Franco 2013). Dalam penelitian ini, sampel tanah berasal dari rizosfer 7 jenis bakau yang terdistribusi pada dua tipe hutan bakau di hutan bakau Torosiaje Gorontalo, yaitu *overwash* dan *fringe*. Rizosfer bakau merupakan mikrohabitat untuk pertumbuhan *Actinomyces*. Sebagaimana penelitian Ravikumar et al. (2011) mendapatkan populasi *Actinomyces* lebih besar pada daerah rizosfer bakau dibandingkan non-rizosfer. Akar bakau memiliki aktivitas untuk sintesis, akumulasi dan sekresi berbagai senyawa yang disebut sebagai eksudat akat (Atlas dan Barta 1998; Badri dan Vivanco 2009). Eksudat akar mengandung berbagai senyawa antara lain asam amino, asam organik, gula, fenol, tanin, alkaloid dan berbagai senyawa metabolit sekunder (Atlas dan Barta 1998; Walker et al. 2003). Aktivitas eksudasi berbagai senyawa pada akar tumbuhan dapat mengatur komunitas mikrobia tanah dengan cara memediasi interaksi akar - mikrobia tanah, mengubah sifat fisik kimia tanah dan menghambat pertumbuhan kompetitor tanaman (Badri dan Vivanco 2009). Aktivitas bakteri didalam tanah hutan bakau tertinggi ditemukan pada daerah dengan kehadiran tanaman (Holguin et al. 2001).

Teknik isolasi selektif dengan menerapkan pre-treatment panas basah pada suhu 60°C selama 15 menit dan penggunaan medium Starch Casein Agar yang disuplementasi dengan cyclohexamide dan nystatin. Teknik isolasi selektif dalam isolasi *Actinomyces* khususnya dari lingkungan ekstrem sangat penting untuk mereduksi kemungkinan munculnya mikrobia lain. Teknik pre-treatment dengan panas basah paling efektif untuk mendapatkan *Actinomyces* dibandingkan metode lain (Naikpatil and Rathod, 2011). Panas basah memberikan efek mematikan untuk sel vegetatif mikrobia tidak tahan panas yang terdapat pada sampel tanah. Kombinasi medium isolasi SCA dan antifungi merupakan metode yang efisien untuk isolasi *Actinomyces* dari ekosistem bakau. Beberapa penelitian yang memvariasikan medium isolasi merekomendasikan penggunaan SCA sebagai medium terbaik untuk isolasi actinomyces dari habitat hutan bakau (Balagurunathan et al. 2010). Antifungi didalam medium agar dimaksudkan untuk mencegah pertumbuhan fungi.

Actinomyces dikenal sebagai organisme penghasil senyawa bioaktif dengan berbagai aktifitas diantaranya antibakteri (Sharma et al. 2011; Hunadanamra et al. 2013; Phongsopitanum et al. 2014; Das et al. 2014), antifungi (Sharma et al. 2011; Suthindiran dan Kannabiran 2010; Phongsopitanum et al. 2014; Das et al. 2014), anti virus (Waksman 1984) dan anti kanker (Kui Hong et al. 2009; Suthindiran dan Kannabiran 2010; Ravikumar et al. 2012; Becerril-espinoza et al. 2012; Anupa et al.

2013; Dong-Bo Xu et al. 2014). Dalam penelitian ini diperoleh 77 isolat *Actinomyces* yang menunjukkan aktifitas anti bakteri melawan bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Produksi antibiotik oleh *Actinomyces* dikode secara genetis oleh gen polyketide synthetase (PKS) yaitu Polyketide synthetase I (PKS-I), polyketide synthetase II (PKS-II), enediyne polyketide synthase (PKSE) dan nonribosomal peptide synthetase (NRPS) pathways (Meklat et al., 2011). Dalam penelitian ini, terdapat dua kelompok besar aktifitas antagonis, yaitu *broad spectrum* dan *narrow spectrum*. Hal tersebut dapat diasumsikan terdapat perbedaan karakter senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh isolat pada kedua kelompok tersebut. Antibiotik memiliki sisi target spesifik dalam mekanisme

kerjanya, antara lain melalui penghambatan sintesis dinding sel, penghambatan fungsi membran sel, penghambatan sintesis protein, dan penghambatan asam nukleat (Brock et al.,).

Antibiotik yang sudah ditemukan sebagian besar dihasilkan oleh anggota genus *Streptomyces*. Sekitar 74% antibiotik dihasilkan oleh anggota genus *Streptomyces* dan 26% dihasilkan oleh rare *Actinomyces*. Hasil pengelompokan isolat *Actinomyces* berdasar karakter morfologi miselium aerial dan pembentukan pigmen terdifusi, isolat *Actinomyces* yang ditemukan di rizosfer pohon bakau di hutan bakau Torosiaje didominasi oleh miselium aerial berwarna putih dengan pigmen terdifusi kekuningan sampai coklat.

4. SIMPULAN, SARAN DAN REKOMENDASI

4.1. Simpulan – penelitian ini berhasil mendapatkan 167 isolat *Actinomyces* dari rizosfer 7 jenis pohon bakau pada tipe overwash dan fringe di hutan bakau Torosiaje Gorontalo. Isolat *Actinomyces* diuji kemampuan antagonis melawan 3 jenis bakteri patogen dan terdapat 77 isolat yang menunjukkan aktifitas antibakteri, meliputi 25 isolat broad spectrum dan 52 isolat narrow spectrum. Isolat *Actinomyces* dengan aktifitas penghambatan tinggi banyak ditemukan di rizosfer *Avicennia marina* dan *Xylocarpus* sp. Isolat *Actinomyces* penghasil antibiotik didominasi oleh isolat dengan koloni warna putih dan pigmen terdifusi kecoklatan dan digolongkan kedalam 15 grup.

4.2. Saran – perlu dikaji lebih lanjut interaksi antara *Actinomyces* penghasil antibiotik dengan jenis pohon bakau.

4.2. Rekomendasi – Hutan bakau Torosiaje, Gorontalo dapat dijadikan sebagai salah satu sumber pencarian isolat *Actinomyces* penghasil antibiotik, khususnya pada rizosfer bakau jenis *A.marina* dan *Xylocarpus* pada zona upper tipe Fringe.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Alongi, D.M. 2009. *The energetics of mangrove forests*. Springer, New Delhi. India
- Amrita, K., J. Nitin, and C. S. Devi. 2012. Novel bioactive compounds from mangrove derived *Actinomyces*. *International research journal of pharmacy*. 3(2): 25-29
- Anupa, M. P., V. S. Sangeetha, P. K. Praseetha, J. J. Emelda, E. E. Jabaslin, and V. S. Sugunan. 2013. Anticancer enzymes from *Actinomyces* enhance of tumor induced mice. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 3(2):41-50.
- Atlas, R.,M, and R. Bartha. 1998. *Microbial Ecology. Fundamentals and applications*. 4th edition. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California.
- Badri, D. V, and J. M. Vivanco. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment*. 32: 666–681.
- Balagurunathan, R., M. M. Selvan, and K. Karthiresan. 2010. Bioprospecting of mangrove rhizosphere *Actinomyces* from pitchavaram with special reference to antibacterial activity. *Journal of*

- Pharmacy Research*. 3(5):909-911.
- Basilio A., I. Gonzales, M. F. Vicente, J. Gorrochategui, A. Cabello, A. Gonzales, and O. Genilloud. 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil *Actinomycetes* isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal Applied Microbiology*. 95(4):814-823.
- Baskaran, R., R. Vijayakumar, and P. M. Mohan. 2011. Enrichment method for the isolation of bioactive *Actinomycetes* from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian Journal of Microbiology*. 7(1): 26-32
- Becerril-Espinosa, A., G. Guerra-Rivas, N. Ayala-Sanchez, and I. E. Soria-Mercado. 2012. Antitumor activity of Actinobacteria isolated in marine sediment from Todos Santos Bay, Baja California, Mexico. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 47(2) : 317-325.
- Berdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *Journal Antibiotics*. 58(1): 1–26
- Bredholdt H, Galatenko OA and Engelhardt K (2007) Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity and biological activity. *Environ Microbiol* 43:2756–2764
- Chaudhary, H. S., B. Soni, A. R. Shrivastava, and S. Shrivastava. 2013. Diversity and Versatility of *Actinomycetes* and its Role in Antibiotic Production. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 3 (1): S83-S94
- Das, A., S. Bhattacharya, A. Y. H. Mohammed, and S. S.Rajan. 2014. In vitro antimicrobial activity and characterization of mangrove isolates of *Streptomyces* effective against bacteria and fungi of nosocomial origin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 57(3):349-356
- Dong-Bo Xu, Wan-Wan Ye, Yig Han, Zi-Xin Deng, and Kui Hong. 2014. Natural products from Mangrove *Actinomycetes*. *Marine Drugs*. 12:2590-2613.
- Gayatri, P, and V. Muralikrishnan. 2013. Isolation and characterization of endophytic *Actinomycetes* from mangrove plant for antimicrobial activity. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2(11):78-89.
- Govindasamy, V., and C. M. M. Franco, 2013. Endophytic actinobacteria: diversity and ecology. *Advances in endophytic research*. Pp. 27-59
- Holguin, G., P. Vasquez, and Y. Bashan. 2001. The Role of Sediment Microorganisms in The Productivity, Conservatioan and Rehabilitation of Mangrove Ecosystems : an Overview. *Biology Fertility Soils*. 33: 265 – 278.
- Hunadanamra, S., A. Akaracharanya, and S. Tanasupawat. 2013. Characterization and antimicrobial activity of *Streptomyces* strain from Thai Mangrove soils. *International Journal of Bioassays*. 2(5):775-779
- Jing Xiao, Yin Wang, Yingxue luo, Shu-Jie Xie, Ji-Sheng Ruan, and Jun Xu. 2009. *Streptomyces avicenniae* sp. nov., a novel *Actinomycetes* isolated from the rhizospher of the mangrove plant *Avicennia mariana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59:2624-2628
- Khanna, M., R. Solanski, and R. Lal. 2011. Selective isolation of rare *Actinomycetes* producing novel antimicrobial compound. *International journal of Advanced Biotechnology and Research*. 2(3):357-375.
- Kui Hong, An-Hui Gao, Qing-Yi Xie, Hao Gao, Ling Zhuang, Hai-peng Lin, Hai-Ping Yu, Jia Li, Xin-Sheng Yao, Michael Goodfellow, and Ji-Sheng Ruan. 2009. *Actinomycetes* for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*. 7: 24 – 44.
- Malek, N. A., A. J. K. Chowdhury, Z. Zainuddin, and Z. A. Z. Abidin. 2014. Selective Isolation of *Actinomycetes* from Mangrove Forest of Pahang, Malaysia. *International Conference on Agriculture, Biology and Environmental Sciences (ICABES'14)* Dec. 8-9, 2014 Bali (Indonesia)
- Mangamuri, U. K., V. Muvva, S. Poda, S. Kamma. 2012. Isolation, Identification and Molecular Characterization of Rare *Actinomycetes* from Mangrove Ecosystem of Nizampatnam. *Malaysian Journal of Microbiology*. 8(2): 83-91
- Mangamuri. U. K., M. Vijayalakshmil, and S. Poda. 2014. Exploration of Actinobacteria from Mangrove Ecosystems of Nizampatnam and

- Coringa for Antimicrobial Compounds and Industrial Enzymes. *British Biotechnology Journal*. **4**(2):
- Meklat, A., N. Sabaou., A. Zitouni., F. Mathiey and A. Lebrihi. 2011. Isolation, Taxonomy, and Antagonistic Properties of Halophilic *Actinomycetes* in Saharan Soils of Algeria. *Applied And Environmental Microbiology*. Vol. 77, No. 18: 6710–6714
- Mitsch, W. J., and J. G. Gosselink. 2000. *Wetlands*. 3th.Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Naikpatil, S. V., and J. L. Rathod. 2011. Selective isolation and antimicrobial activity of rare *Actinomycetes* from mangrove sediment of Karwar. *Journal of Ecobiotechnology*. **3**(10): 48-53
- Nolan, R.,D., and T. Cross. 1988. *Isolation and screening of Actinomycetes*, p. 1-32. In M. Goodfellow, S.T Williams, and M. Mordarski (ed). *Actinomycetes* in biotechnolgy. Academic Press, Inc.,San Diego, Calif.
- Phongsopitanum, W., K. Suwanborirux, and S. Tanasupawat. 2014. Identification and antimicrobial activity of *Streptomyces* strains from Thai mangrove sediment. *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. **38**(1):49-56
- Ravikumar, S., S. J. Ibaneson, M. Uthiraselvam, S. R. Priya, A. Ramu, and M. B. Banerjee. 2011. Diversity of endophytic *Actinomycetes* from Karangkadu mangrove ecosystem and its antibacterial potential againts bacterial pathogens. *Journal of Pharmacy Research*. **4**(1): 294-296
- Ravikumar, S., M. Fredimoses, and M. Gnanadesigan. 2012. Anticancer property of sediment *Actinomycetes* againts MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*. **2**(2) : 92-96.
- Santhi, S., A. A. Jise, and J. Solomon. 2010. Isolation and characterization of antagonistic *Actinomycetes* from mangrove sediment. *International Journal of Current Research*. **3**:20-23
- Sharma, D., T. Kaur, B. S. Chadha, and R. K. Manhas. 2011. Antimicrobial Activity of *Actinomycetes* Against Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and Various Other Pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. **10**(6): 801-808.
- Suthindhiran, K., and K. Kannabiran. 2010. Diversity and exploration of bioactive marine *Actinomycetes* in the Bay of Bengal of the Puducherry coast of India. *Indian Journal Microbiology*. **50**(1):76–82
- Waksman, S. A. 1950. *The Actinomycetes*. Their Nature, Occurrence, Activities, and Importance. Waltham, Mass., USA. Published by the Chronica Botanica Company.
- Walker, T. S., H. P. Bais, E. Grotewold, and J. M. Vivanco. 2003. Root Exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiol*. Vol 132:44-51