

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR  
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI  
(PDUPT)**



**OPTIMASI PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER *Streptomyces* sp.  
ISOLAT TANAH LUMPUR LAPINDO, UJI BIOAUTOGRAFI  
DAN UJI AKTIVITAS ANTI TUBERKULOSIS PADA MENCIT**

**TAHUN KE - 2 DARI RENCANA 2 TAHUN**

**Dr.ROCHMAH KURNIJASANTI,DRH.,MSI**

**0019077004**

**ARIMBI, DRH.,MKes**

**0029085603**

**Dr. RAHMI SUGIHARTUTI, DRH., MKes**

**0021026702**

**DIBIYAI OLEH:**

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT**

**NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR  
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI  
(PDUPT)**



kcc  
kk  
LP. 15/19  
kur  
o

**OPTIMASI PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER *Streptomyces* sp.  
ISOLAT TANAH LUMPUR LAPINDO, UJI BIOAUTOGRAFI  
DAN UJI AKTIVITAS ANTI TUBERKULOSIS PADA MENCIT**

**TAHUN KE – 2 DARI RENCANA 2 TAHUN**

**Dr.ROCHMAH KURNIJASANTI,DRH.,MSI  
ARIMBI, DRH.,MKes  
Dr. RAHMI SUGIHARTUTI, DRH., MKes**

**0019077004  
0029085603  
0021026702**

**DIBIYAI OLEH:  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**



HALAMAN PENGESAHAN

Judul	: OPTIMASI PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER Streptomyces sp. ISOLAT TANAH LUMPUR LAPINDO, UJI BIOAUTOGRAFI DAN UJI AKTIVITAS ANTI TUBERKULOSIS PADA MENCIT
<b>Peneliti/Pelaksana</b>	
Nama Lengkap	: Dr ROCHMAH KURNIJASANTI, M.Si
Perguruan Tinggi	: Universitas Airlangga
NIDN	: 0019077004
Jabatan Fungsional	: Lektor
Program Studi	: Kedokteran Hewan
Nomor HP	: 081703320747
Alamat surel (e-mail)	: rochmah-kij@fkh.unair.ac.id
<b>Anggota (1)</b>	
Nama Lengkap	: ARIMBI M.Kes
NIDN	: 0029085603
Perguruan Tinggi	: Universitas Airlangga
<b>Anggota (2)</b>	
Nama Lengkap	: Dr. drh. RAHMI SUGHARTUTI S.K.H, M.Kes
NIDN	: 0021026702
Perguruan Tinggi	: Universitas Airlangga
<b>Institusi Mitra (jika ada)</b>	
Nama Institusi Mitra	: -
Alamat	: -
Penanggung Jawab	: -
Tahun Pelaksanaan	: Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan	: Rp 110,000,000
Biaya Keseluruhan	: Rp 218,840,000

Menyetujui,  
Dekan FKH Unair




(Prof. Dr. Puji Srianto, drh., MKes)  
NIP/NIK 195601051986011001

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018

Ketua



(Dr ROCHMAH KURNIJASANTI, M.Si)  
NIP/NIK 197007191996032002

Menyetujui,  
Ketua LPI




(Prof. H. Hery Purnobasuki, Drs., M.Si., PhD)  
NIP/NIK 196705071991021001



## RINGKASAN

Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian tahun pertama. Penelitian tahun pertama telah dilakukan optimasi produksi dari *Streptomyces* sp yang mempunyai aktivitas Anti Tuberkulosis dari tanah lumpur Lapindo. Pada penelitian yang telah dilakukan berhasil diperoleh metabolit sekunder delapan *Streptomyces* sp. isolat lumpur Lapindo hasil optimasi, yang menunjukkan adanya peningkatan produksi dan aktivitas anti tuberkulosis. Hasil penambahan trace elemen  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  dan  $\text{MnCl}_2$  menunjukkan adanya peningkatan produksi metabolit sekunder dari *Streptomyces* sp. Uji aktivitas anti TB dari metabolit sekunder dengan penambahan trace elemen menunjukkan adanya peningkatan aktivitas anti TB dari *Streptomyces* sp. Peningkatan produksi dan aktivitas anti TB dari metabolit sekunder hasil optimasi paling efektif ditunjukkan oleh *Streptomyces* D7.2. Pada penelitian tahun pertama terbukti secara *in vitro* ada peningkatan potensi metabolit sekunder *Streptomyces* sp baru dari habitat lumpur lapindo Sidoarjo sehingga penelitian tahun kedua dilakukan uji aktivitas anti TB secara *in vivo* pada hewan coba mencit. Penelitian ini dalam jangka panjang bertujuan untuk mendapatkan *Streptomyces* sp. yang mampu menghasilkan bioaktif yang poten sebagai anti tuberkulosis. Penelitian ini dilaksanakan selama 2 (dua) tahun. Pada tahun pertama telah didapat isolat yang poten secara *in vitro* sebagai anti TB.

Pada tahun kedua, penelitian dilakukan dengan tahapan sebagai berikut 1) Optimasi dosis M.TBC H37rv sebagai agen penyebab infeksi 2) Optimasi dosis *Streptomyces* 3) Uji aktivitas anti Tuberkulosis dari *Streptomyces* sp. hasil optimasi 4) Pemeriksaan histopatologi paru untuk mengamati kerusakan paru, kultur pada media Middlebrook agar dengan parameter jumlah M.TBC H37rv dari sampel paru, pemeriksaan jumlah makrofag secara kualitatif dari histopatologi paru.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah M.TBC H37rv dari sampel paru mengalami penurunan dibandingkan kontrol positif yang diinfeksi M.TBC H37rv pada perlakuan dengan pemberian *Streptomyces* D6, D7 dan D7.1. Hasil pemeriksaan histopatologi paru menggunakan score Dorman menunjukkan perlakuan dengan pemberian *Streptomyces* D6, D7 dan D7.1 menurunkan kerusakan paru yang dilihat dari gambaran peribronkiolitis, perivaskulitis, alveolitis, dan granuloma.

## KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah Subhanawata'ala, karena hanya dengan rahman dan rahim-Nya laporan kemajuan penelitian ini bisa diselesaikan.

Pada kesempatan ini saya menyampaikan ucapan terima kasih kepada Direktur Riset dan Pengabdian Masyarakat Kemenristekdikti yang telah memberikan pendanaan penelitian unggulan perguruan tinggi dan Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Moh Nasih, SE., MT Ak. yang telah memberikan ijin dan berkenan memberikan kepercayaan kepada saya untuk memperoleh pendanaan penelitian unggulan perguruan tinggi di Universitas Airlangga. Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada Prof. H. Hery Purnobasuki, M.Si., PhD selaku ketua lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas untuk mengikuti PDUPT di Universitas Airlangga, Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Dr. Puji Srianto, MKes., drh. yang telah memberikan ijin dan kesempatan pada saya melaksanakan penelitian ini dan kepada seluruh pihak yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

Akhirnya, program ini diharapkan dapat dimanfaatkan secara berkelanjutan sehingga hasil yang diperoleh semakin meluas dan memberikan manfaat bagi keilmuan dan masyarakat.

Surabaya, 15 November 2018

Ketua Peneliti

## DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN .....	2
PRAKATA.....	3
DAFTAR ISI.....	4
DAFTAR TABEL.....	5
DAFTAR GAMBAR.....	6
DAFTAR LAMPIRAN.....	7
BAB I. PENDAHULUAN .....	8
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	9
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	18
BAB IV. METODE PENELITIAN .....	19
BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI.....	26
BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA.....	30
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN.....	31
DAFTAR PUSTAKA.....	33
LAMPIRAN.....	34

**DAFTAR TABEL**

Tabel 5.1 Hasil Kultur Paru dari Berbagai Perlakuan pada Media Middlebrook.....25

**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 3.1 Skema Penyiapan <i>Streptomyces</i> sp.....	20
Gambar 3.2 Skema Penyiapan Inokulum Bakteri Uji.....	21
Gambar 5.1 Fermentasi <i>Streptomyces</i> Hasil Optimasi.....	25
Gambar 5.2 Hasil Kultur Paru pada Media Middlebrook.....	25
Gambar 5.3 Hasil Pewarnaan Z-N.....	26
Gambar 5.4 Hasil Histopatologi Paru.....	27



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Draft Artikel pada Jurnal Nasional Terakreditasi.....	29
Lampiran 2. Personalia Pelaksana dan kualifikasinya.....	34

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Kebutuhan untuk mengeksplorasi generasi antibiotik yang sensitif semakin meningkat seiring dengan perkembangan patogen yang resisten, perubahan pola penyakit dan toksisitas senyawa obat (Silbergeld *et al.*, 2008; Hakvag *et al.* 2008). Masalah Multi Drug Resistance (MDR) juga meningkat pesat baik disebabkan oleh antibiotics misuse atau antibiotic abuse (Larson, 2007; Marino, 2008; Hawkey 2008). Oleh karena itu, diperlukan suatu tindakan untuk mengantisipasi resistensi obat anti TB. Penggunaan obat anti TB baru merupakan salah satu alternatif. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu adanya jenis antibiotik baru yang lebih sensitif terhadap *M. tuberculosis*. Banyak penelitian telah dilakukan untuk mendapatkan bahan bioaktif sebagai anti tuberkulosis baik dari herbal maupun mikroba penghasil antibiotik, termasuk *Streptomyces* sp.

*Streptomyces* merupakan genus terbesar dari kelompok Eubacteria dan tersebar luas di lingkungan terutama habitat tanah (Dunbar *et al.*, 1999). Setengah dari 10.000 senyawa bioaktif dihasilkan *Streptomyces* (Anderson and Wellington, 2001). *Streptomyces* berperan penting dalam bidang bioteknologi karena kemampuannya dalam menghasilkan antibiotik alam untuk terapi klinik (Berdy, 2005; Bull and Stach, 2007; El – Sherbiny *et al.*, 2009, Akanji *et al.*, 2011 Sherbiny *et al.*, 2009, Sinha *et al.*, 2011). Selain itu, antibiotik yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. berspektrum luas, tidak hanya efektif untuk manusia tetapi juga bermanfaat untuk terapi hewan baik sebagai antibakteri, antifungi, anti kanker, anti parasit dan anti viral (Atta and Ahmad, 2009; Morakchi *et al.*, 2009). *Streptomyces* sp. juga mampu menghasilkan *immune suppressant* (Watve *et al.*, 2001) bahkan beberapa enzim yang dihasilkan *Streptomyces* sp. sangat penting untuk industri makanan dan industri lain. Mikroba mampu menghasilkan antibiotik melalui mekanisme mikroba antagonis atau produksi metabolit bioaktif (Thamashow, 2005). Salah satu metabolit sekunder adalah streptomisin dihasilkan oleh *Streptomyces griseus*. Streptomisin merupakan salah satu obat pilihan untuk penyakit tuberkulosis, yang kurang berkembang karena efek sampingnya.

Antibiotik baru dapat diperoleh melalui dua pendekatan yaitu penapisan galur alam dan melalui mutasi (Butsi *et al.*, 2006; Fiedler *et al.*, 2008). Sampai sekarang telah berhasil diisolasi lebih dari 500 spesies *Streptomyces* dan beberapa telah diperoleh profil genomnya dan digunakan acuan untuk studi anggota genom actinomycetes (Bentley *et al.*, 2002;

Euzeby, 2008; Xu *et al.*, 2010). Penemuan antibakteri melalui penapisan galur alam dapat dilakukan dengan beberapa metode antara metode konvensional dengan uji biokimia, analisis molekuler menggunakan gen 16S rRNA dan metode analisis berdasarkan profil metabolit (*metabolic profiling*) *fatty acid methyl ester*. *Metabolic profiling* dilakukan dengan cara membandingkan komposisi seluruh senyawa kimia atau sebagian komponen kimia yang ada dalam sel bakteri yang dapat membedakan karakter masing-masing jenis bakteri (Sasser, 2006). Analisis *fatty acid methyl ester* dilakukan untuk identifikasi bakteri sampai pada tingkat spesies. Menurut Moore *et al.* (1994), ada perbedaan profil asam lemak dari 33 bakteri batang Gram negatif anaerob. Di samping itu, kandungan asam lemak bakteri ternyata berhubungan dengan aktivitas anti mikroba.

Hasil penelitian sebelumnya (Kurnijasanti, 2013) menunjukkan bahwa profil *fatty acid methyl ester* *Streptomyces* sp. menghasilkan puncak dominan yaitu metal asam siklopropan oktanoat dan metal asam heptadekanoat yang merupakan fraksi asam lemak yang berhubungan dengan aktivitas anti tuberkulosis. Hasil penelitian sebelumnya berhasil diisolasi empat isolat *Streptomyces* sp. dari tanah Lumpur lapindo yang mempunyai aktivitas anti tuberkulosis melalui pendekatan profil *fatty acid methyl ester*. Disamping berdasarkan profil FAME, penemuan antibakteri terhadap bakteri M.TBC *H37rv* dapat dilakukan melalui analisis molekuler menggunakan gen 16S rRNA. Data urutan rRNA *Streptomyces* tersebut sangat penting untuk pembedaan analisis, biosintesis metabolit sekunder dalam menghasilkan antibiotik baru, dan aspek biologi yang lain (Paradkar, *et al.*, 2003). Karakterisasi *Streptomyces* sp isolat tanah lumpur lapindo berdasarkan gen 16S rRNA penting dilakukan untuk mendapatkan *Streptomyces* sp isolat baru yang lebih poten sebagai anti tuberkulosis berdasarkan sekuen gen 16S rRNA.

Tanah lumpur lapindo merupakan tanah hasil semburan dari dalam bumi yang berupa materi lumpur aktif dari tanah yang mengendap dalam cairan dan gas yang berupa gas metana, carbon dioksida dan nitrogen. Nitrogen merupakan unsur hara yang sangat banyak terdapat di dalam tanah. Banyaknya kandungan nitrogen merupakan indicator bahwa dalam tanah dapat ditemukan *Streptomyces* sp. (Kyuma, 2000). Purnomo (2012) berhasil mengisolasi *Streptomyces* sp dari tanah Lumpur lapindo. Retnowati (2008) *Streptomyces* sp yang diisolasi dari tanah dengan cemaran tinggi merupakan spesies yang survive dan akan menghasilkan antibiotik yang poten. Tanah lumpur lapindo merupakan tanah dengan cemaran logam berat yang tinggi, sehingga diharapkan *Streptomyces* sp yang diperoleh adalah spesies yang survive dan poten sebagai anti tuberkulosis. Berdasarkan peran penting *Streptomyces* sp yang nantinya dapat dikembangkan sebagai alternatif bahan baku obat anti TB maka

penelitian ini dilakukan untuk meningkatkan potensi dari metabolit sekunder *Streptomyces* sp baru dari habitat tanah lumpur Lapindo Sidoarjo yang poten sebagai anti TB dengan membuat kondisi optimal untuk produksi metabolit sekundernya. Kondisi optimal untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder dapat dilakukan dengan penambahan bahan NaCl, FeSO<sub>4</sub> dan CaCO<sub>3</sub> (El-Bendary *et al*, 2010). Disamping itu uji melalui bioautografi perlu dilakukan untuk mengetahui jenis antibiotik yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp baru dari habitat tanah lumpur Lapindo Sidoarjo. Selanjutnya uji aktivitas anti TB dilakukan pada hewan coba untuk melihat aktivitasnya secara in-vivo.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### *Streptomyces*

*Streptomyces* merupakan bakteri tanah yang hidup pada relung ekologi unik yaitu hutan tropis, hutan gambut, dataran tinggi, daerah vulkano, kompos, tanah perkebunan, tanah pertanian, dan daerah kawasan *mangrove* (Madigan *et al.*, 2002; Korn and Jurgen, 2002).

Keberadaan *Streptomyces* di dalam tanah sangat melimpah, terutama pada tanah yang bersifat alkali dan netral dibandingkan pada jenis tanah yang asam. Beberapa jenis *Streptomyces* juga dapat ditemukan pada perairan (Madigan *et al.*, 2002).

*Streptomyces* digolongkan dalam *Actinomycetes*, organisme tanah dengan sifat-sifat umum yang dimiliki oleh bakteri dan jamur yaitu *thread bacteria* (bakteri berhifa). *Streptomyces* digolongkan sebagai jenis bakteri berfilamen, dengan diameter hifa 0,5 - 1,0  $\mu\text{m}$ , bersifat Gram positif, berbentuk batang, bersifat aerob, dan mempunyai dinding sel *diaminopimelic* (DAP). Tidak seperti pada koloni bakteri yang dapat tumbuh dengan cepat, koloni *Streptomyces* muncul perlahan dan melekat erat pada Agar, menunjukkan suatu gumpalan atau butiran yang jelas pada kultur cair dan koloni tidak tembus cahaya (Korn and Jurgen, 2002). Tipe-tipe konidia merupakan salah satu karakteristik yang dapat digunakan dalam penggolongan jenis-jenis *Streptomyces* (Madigan *et al.*, 2002).

*Streptomyces* tumbuh optimum pada suhu 25<sup>0</sup>-35<sup>0</sup>C dengan pH 6,5-8,0, membentuk miselium yang mirip fungi dan membentuk spora yang disebut konidia. Tipe pembentukan spora *Streptomyces* dapat digunakan dalam penggolongan spesies (Madigan *et al.*, 2002; Korn and Jugen, 2002).

*Streptomyces* mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit serta mendegradasi kasein, adenin, L-tirosin dan gelatin. *Streptomyces* merupakan kemo organotrof, menggunakan reaksi redoks pada senyawa organik untuk mendapatkan energi. *Streptomyces* menghasilkan suatu aroma khas tanah sebagai hasil metabolisme, yaitu geosmin dengan struktur kimia trans-1,10-dimetil-trans-9-decalol (Madigan *et al.*, 2002).

Menurut Flardh (2003), mekanisme pertumbuhan sel apikal *Streptomyces* melalui pemanjangan dinding sel pada ujung hifa. Sekali sel apikal melakukan percabangan dengan membentuk hifa baru, maka sel sub-apikal tidak dapat tumbuh, namun akan berkembang membentuk cabang-cabang samping dengan perpanjangan ujung baru. Pertumbuhan apikal, sporulasi awal septa, perubahan bentuk yang progresif antena hifa ke dalam suatu rantai spora

berpigmen dan visualisasi cincin Z pada tahap awal sporulasi hifa udara pada *Streptomyces*.

### **Tinjauan *Streptomyces* sebagai Penghasil Antibiotik**

Keberadaan *Streptomyces* sebagai penghasil antibiotik terbesar sangat menarik perhatian. Jenis antibiotik yang dihasilkan oleh *Streptomyces* antara lain aminoglikosida (streptomisin, neomisin, kanamisin, dan lain-lain), makrolida (eritromisin, oleandomisin, spiramisin, tetrasenomisin, aktinohordin, daunorubisin, tilosin, dan lain-lain), tetrasiklin, antrasiklin, aromatik (kloramfenikol), heterosiklik (polioksin), alisiklik (sikloheksimid), polipeptida (viomisin, aktinomisin) dan beberapa jenis lainnya ((Hoopwood, 1999).

### **Antibiotik**

Beberapa pengertian antibiotik adalah sebagai berikut : (1) antibiotik merupakan semua senyawa kimia yang dihasilkan oleh organisme hidup atau yang diperoleh melalui sintesis yang memiliki indeks kemoterapi tinggi, yang manifestasi aktivitasnya terjadi pada dosis sangat rendah secara spesifik melalui inhibisi proses vital tertentu pada mikroba (Turpin dan Velu dalam Joke, 1991); (2) antibiotik merupakan produk dari metabolisme sekunder yang dapat menghambat pertumbuhan organisme lain, walaupun digunakan dalam konsentrasi rendah (Crueger and Crueger, 1984); (3) antibiotik merupakan senyawa kimia yang dihasilkan oleh organisme lain dan dapat menghambat atau bahkan menghancurkan mikroba lain meskipun dalam konsentrasi rendah (Betina, 1983); (4) antibiotik merupakan senyawa yang setelah mengalami absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi selektif ataupun efektif, sanggup menghambat multiplikasi mikroba atau mematakannya di berbagai daerah huni di dalam organisme dan karena hanya sedikit toksik atau tidak toksik pada dosis yang sesuai, tetap selaras dengan aktivitas sel normal pada manusia dan hewan, bekerja secara selektif toksik terhadap proses sintesis metabolik bakteri (Joke, 1991). Dengan demikian pengertian antibiotik secara umum adalah senyawa kimia yang diproduksi dari hasil metabolisme sel hidup, dalam kadar yang sangat rendah dapat menghambat pertumbuhan mikroba dan memiliki sasaran molekuler yang spesifik.

### **Metabolit sekunder**

Metabolit sekunder merupakan metabolit yang disintesis oleh beberapa mikroorganisme tertentu, tetapi tidak langsung diperlukan untuk pertumbuhan sel. Meskipun tidak dibutuhkan untuk pertumbuhan, namun metabolit-metabolit tersebut dapat juga bersifat sebagai nutrisi darurat untuk bertahan hidup. Produk-produk ini biasanya dihasilkan pada fase

stasioner. Keterlambatan pembentukan produk metabolit sekunder disebabkan oleh kepadatan populasi yang tinggi, sehingga nutrisi terbatas (Wibowo, 1990).

Menurut Sudibyo (1991), ada enam karakteristik metabolit sekunder, yaitu (1) setiap metabolit sekunder adalah spesifik untuk satu atau beberapa spesies, (2) metabolit sekunder diduga tidak diperlukan untuk pertumbuhan sel, (3) produksi metabolit sekunder sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan, (4) beberapa metabolit sekunder diproduksi dengan kemiripan struktur antara satu dengan yang lain, misalnya galur *Streptomyces* memproduksi 32 macam anthrasiklin, (5) banyak metabolit sekunder yang diproduksi sebagai suatu kelompok dengan struktur hampir sama, dan komposisinya dipengaruhi oleh medium serta kondisi pertumbuhan, dan (6) biosintesis metabolit sekunder dikontrol oleh mekanisme yang berbeda dengan kontrol dalam metabolit primer.

### **Tuberkulosis**

Kuman golongan *Mycobacterium* berbentuk batang yang agak sulit diwarnai, tetapi sekali berhasil diwarnai sulit untuk dihapus dengan zat asam. Oleh karena itu disebut juga kuman batang tahan asam (BTA). Kini dikenal empat puluh satu spesies yang diakui oleh ICSB (International Committee on Systematic Bacteriology). Sebagian besar adalah saprofit, sebagian kecil pathogen untuk manusia diantaranya *Mycobacterium tuberculosis*. Kuman ini disebut juga basil dari Koch. Kuman ini amat penting karena menyebabkan penyakit tuberkulosis. Tuberkulosis juga disebabkan oleh *M. bovis* pada sapi.

Pada jaringan tubuh kuman tuberkulosis berbentuk batang halus, tidak berspora. Daya tahan kuman lebih besar dibandingkan kuman lain karena sifat hidrofobik permukaan sel. Sebagian besar antigen kuman terdapat pada dinding sel yang dapat menimbulkan hipersensitivitas tipe lambat. *Mycobacterium* mengandung banyak lemak seperti lemak kompleks, asam lemak dan lilin. Dalam sel, lemak tergabung pada protein dan polisakrida. Komponen lemak ini dianggap yang bertanggung jawab terhadap reaksi sel jaringan terhadap kuman tuberkulosis. Daya tahan bakteri Tuberkulosis lebih besar apabila dibandingkan dengan bakteri lainnya karena sifat hidrofobik permukaan sel. Hijau malakhit dapat membunuh bakteri lain, tetapi tidak membunuh *M.tuberculosis*, demikian juga asam dan alkali. Dengan fenol 5 % diperlukan waktu 24 jam untuk membunuh *M.tuberculosis*. Pada sputum kering yang melekat pada debu dapat tahan hidup 8-10 hari. Pengaruh pemanasan daya tahannya sama dengan bakteri lainnya, jadi dengan pasteurisasi bakteri Tuberkulosis ini sudah dapat dibunuh (Syahrurachman dkk., 1993).

## Lumpur Lapindo Sidoarjo

Semburan Lumpur panas dari rekahan bumi disekitar pengeboran gas PT.Lapindo Brantas di Kelurahan Siring Kecamatan Porong Sidoarjoa Timur di mulai tanggal 27 Mei 2006. Beberapa kandungan kimia yang ada dalam lumpur yang menyembur dari sumur pengeboran gas PT Lapindo Brantas. Ternyata kandungan lumpur yang menyembur di kawasan Porong, Sidoarjo, itu sudah di atas ambang batas. Logam berat Hg (raksa) misalnya, ditemukan hasil 2,5 ppm. Lumpur lapindo mengandung beberapa logam berat yaitu besi (Fe), Mangan (Mn), Aluminium (Al), Natrium (Na), Merkuri (Hg), Kadmium (Kd). Kromium (Cr), Timbal (Pb), Arsen ( Ar), Kalium (K), Kalsium (Ca) magnesium (Mg). Nitrit termasuk zat kimia beracun yang sifatnya lebih aktif atau berbahaya dibandingkan senyawa sejenis yaitu nitrat. Penelitian Purnomo (2012) berhasil mengisolasi beberapa spesies bakteri pereduksi hidrokarbon termasuk *Streptomyces*.

### Penelitian yang Sudah Dilaksanakan

Penelitian yang telah dilakukan adalah Pengembangan Metode Penapisan Anti Tuberkulosis Berdasarkan Profil Ester Metil Asam Lemak (*Fatty Acid Metyl Esther*) *Streptomyces* sp. Hasil penelitian menunjukkan bahwa profil *Fatty Acid Metyl Esther* *Streptomyces* sp. menghasilkan puncak dominan di dua posisi tergantung spesies yaitu metil asam pentadekanoat dan metil asam heptadekanoat. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa ada hubungan antara profil *Fatty Acid Metyl Esther* *Streptomyces* sp. dengan aktivitasnya sebagai anti tuberkulosis. Pada penelitian tahun pertama berhasil diisolasi delapan *Streptomyces* sp. isolat lumpur Lapindo yang menunjukkan karakter yang berbeda berdasarkan morfologi dan profil FAME. Berdasarkan profil FAME diperoleh 4 isolat yang mempunyai profil FAME yang mempunyai aktivitas anti Tuberkulosis. Pada uji aktivitas anti tuberkulosis menggunakan *M.tbc H37rv* pada media LJ diperoleh 3 isolat yang mempunyai aktivitas anti tuberkulosis. Berdasarkan identifikasi gen 16S rRNA menunjukkan *Streptomyces* sp. isolat lumpur Lapindo mempunyai karakter yang berbeda.

### Uji Bioautografi

Metode atau uji bioautografi merupakan gabungan dari teknik Kromatografi lapis tipis dengan metode uji aktivitas antibakteri seperti difusi dan dilusi. Pada penelitian ini digunakan metode bioautografi kontak karena metode ini mempunyai keunggulan antara lain dapat digunakan untuk mengetahui jumlah senyawa antibakteri yang terkandung dalam ekstrak kasar yang dianalisis (Sudirman, 2005). Metode ini relatif mudah dikerjakan dan membutuhkan biaya relatif murah. Keuntungan lain selain pemisahan dan identifikasi, juga dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas biologis secara langsung dari matriks kompleks, terutama terkait



dengan kemampuan suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan mikroba (Rahalison et al., 1994).

#### Peta Penelitian

Tahun	
2012	Berhasil diisolasi <i>Streptomyces</i> sp isolat tanah kompos dengan aktivitas anti TB
2013	Diperoleh Profil <i>Fatty Acid Methyl Ester (FAME)</i> <i>Streptomyces</i> sp dengan marker asam heptadekanoat sebagai marker anti TB dari <i>Streptomyces</i>
2014	Berhasil diisolasi <i>Streptomyces</i> sp dari tanah lumpur lapindo
2015	Isolasi <i>Streptomyces</i> sp yang mempunyai aktivitas anti TB dengan pendekatan profil <i>Fatty Acid Methyl Ester (FAME)</i>
2016	Karakterisasi gen 6S rRNA <i>Streptomyces</i> sp untuk memperoleh sekeun yng penghasil anti TB.
2017	Optimasi pertumbuhan untuk meningkatkan produksi metabolit <i>Streptomyces</i> sp yang poten sebagai anti TB, Kromatografi, bioautografi dan isolasi bioaktif
2018	Uji aktivitas anti TB secara in vivo

**BAB III****TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN****Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mendapatkan kondisi optimal untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder *Streptomyces* sp isolat tanah lumpur lapindo Sidoarjo dengan optimasi pH, suhu dan penambahan trace elemen  $MnCl_2$ ,  $FeSO_4$  dan  $ZnSO_4$ .
2. Mendapatkan potensi metabolit sekunder hasil optimasi sebagai anti TB secara in vivo pada mencit setelah hasil uji aktivitas anti TB secara in vitro menunjukkan peningkatan aktivitasnya

**Manfaat Penelitian**

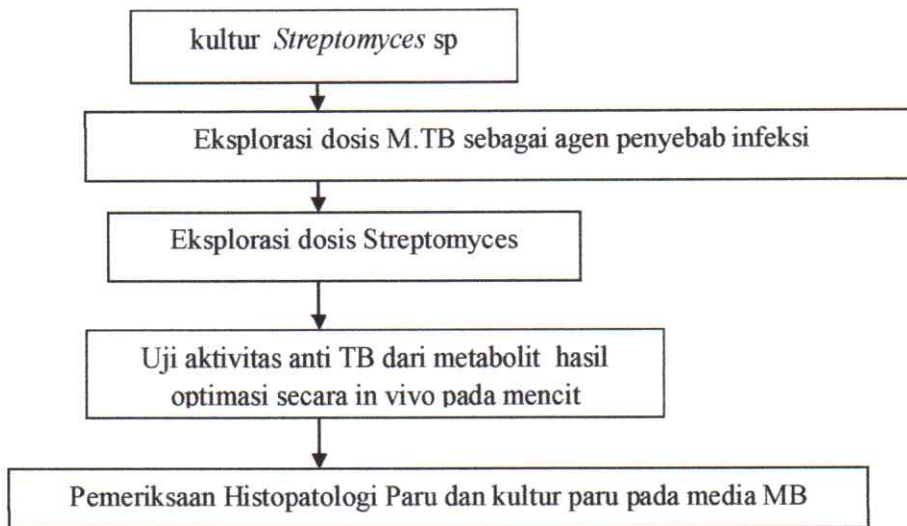
Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk pengembangan *Streptomyces* sp yang nantinya dapat digunakan sebagai anti TB yang lebih poten melalui peningkatan potensi dari metabolit sekunder *Streptomyces* sp baru dari habitat tanah lumpur Lapindo Sidoarjo dengan membuat kondisi optimal untuk produksi metabolit sekundernya. Kondisi optimal untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder dapat dilakukan dengan optimasi suhu dan pH serta penambahan bahan trace elemen  $FeSO_4$ ,  $ZnSO_4$  dan  $MnCl_2$ . Manfaat yang lain mendapatkan potensi *Streptomyces* sp baru dari habitat tanah lumpur Lapindo Sidoarjo sebagai anti tuberkulosis pada mencit.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### Diagram Alir Penelitian

Penelitian ini akan dibagi menjadi beberapa tahap yang digambarkan seperti diagram alir sebagai berikut :



#### Sampel dan Teknik Pengambilan Sampel

Sampel penelitian adalah *Streptomyces* sp isolat tanah Lumpur lapindo.

#### Hewan Coba

Sebanyak 50 ekor mencit Balb/c jenis kelamin jantan, umur 2-3 bulan dengan berat badan 25-30 g.

#### Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media ISP-4(BD Difco), media *Lowenstein Jensen*, media *Middle Brook 7H9 broth*, media *Middle Brook 7H10 Agar*, gliserol, OADC, ADC, standar 1,0 McFarland, minyak emersi, *carbol fuchsin*, *metylen blue aquadest* steril, *ethanol absolut*, Bahan-bahan untuk Mineral Salt Medium adalah Glukosa (Sigma), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sigma) , NaNO<sub>3</sub> (Sigma), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Sigma), CaCl<sub>2</sub> (Sigma), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Sigma), MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (Sigma), ZnCl<sub>2</sub> (Sigma), CuCl<sub>2</sub> (Sigma), CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Sigma), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Sigma), Ketamin, antibodi Goat anti mouse biotin labeled, SA-HRP (Streptavidin-Horse Peroxidase), DAB (3,3 diamino benzidine tetrahydrochloride), isolat M.tbc H37rv.

### **Alat Penelitian**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, ose, cawan petri, inkubator CO<sub>2</sub>, inkubator, mikropipet, *glass beads*, vortex, *autoclave*, *clean bench*, pinset steril, bunsen, lampu UV, *obyek glass*, mikroskop Olympus U-SRE-2, timbangan analitik, erlenmeyer, tabung dan tip Eppendorf, Syringe 2.5 ml 100, Syringe 1 ml, *Gloves disposable*, *Milipore membrane* 20, *parafilm*, *sentrifuge*, *ultra sentrifuge*, aluminium foil, *autoclave* (Tomy-Autoclave SS325), *homogenizer*, spektrofotometer (Hitachi U 2000), *Shaker* (Gerhardt Laboshake), fermentor, evaporator, lampu UV. Kandang Hewan Coba, Tempat pakan dan minum, alat bedah.

### **Isolat Bakteri**

Bakteri yang digunakan sebagai bakteri uji dalam penelitian ini adalah isolat murni bakteri *M.tuberculosis* H37rv.

### **Prosedur Penelitian**

#### **Kultur Isolat *Streptomyces* sp**

Menurut metode Alexander and Strete (2001), diambil 1 ose isolat *Streptomyces* sp., kemudian ditanam pada media ISP-4 padat pada cawan Petri dan diinkubasikan selama 4 hari pada suhu 28°C. Setelah *Streptomyces* sp tumbuh, kemudian dipindahkan pada media ISP-4 agar miring. Untuk proses selanjutnya menurut Davelos *et al.* (2004) bahwa isolat *Streptomyces* sp harus disimpan pada media ISP-4 cair yang mengandung gliserol 20% dengan suhu -80°C agar isolat tidak mengalami perubahan morfologi dan fisiologi.

#### **Identifikasi Isolat *Streptomyces* sp (Alexander and Strete, 2001)**

Pengamatan secara makroskopis dilakukan dengan cara menentukan jenis koloni *Streptomyces* sp dengan ciri-ciri : koloni kecil dengan diameter 2-3 mm, berbulu halus, bentuk seperti kulit dan keras, spora di ujung miseria udara, koloni berbentuk butiran serbuk, granula atau beludru, membentuk macam pigmen dan memberikan bau tanah. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan mengambil 1 ose koloni *Streptomyces* sp. dan diletakkan pada obyek glass berisi air steril dengan pembesara 400X. Untuk pewarnaan Gram dilakukan dengan cara mengambil koloni *Streptomyces* sp dan diletakan di atas gelas obyek kemudian diwarnai dengan kristal violet selama 30 detik. Larutan kristal violet dihilangkan dengan air kemudian ditambahkan larutan jodium untuk meningkatkan afinitas kristal violet. Larutan dihilangkan dengan air mengalir, kemudian ditambahkan alkohol



selama 10-20 detik dan dicuci dengan air mengalir sampai warna biru hilang. Ditambahkan safranin selama 30 detik, kemudian dihilangkan dengan air mengalir dan sisa-sisa air dibersihkan dengan kertas saring. Sediaan diperiksa dengan pembesaran 100-400 X. Untuk uji karbohidrat digunakan enam macam karbohidrat yaitu arabinosa, laktosa, xilosa, manitol, sakarosa, dan amilum. Uji ini dilakukan untuk membuktikan bahwa isolate *Streptomyces* sp mampu menggunakan gula untuk pertumbuhannya.

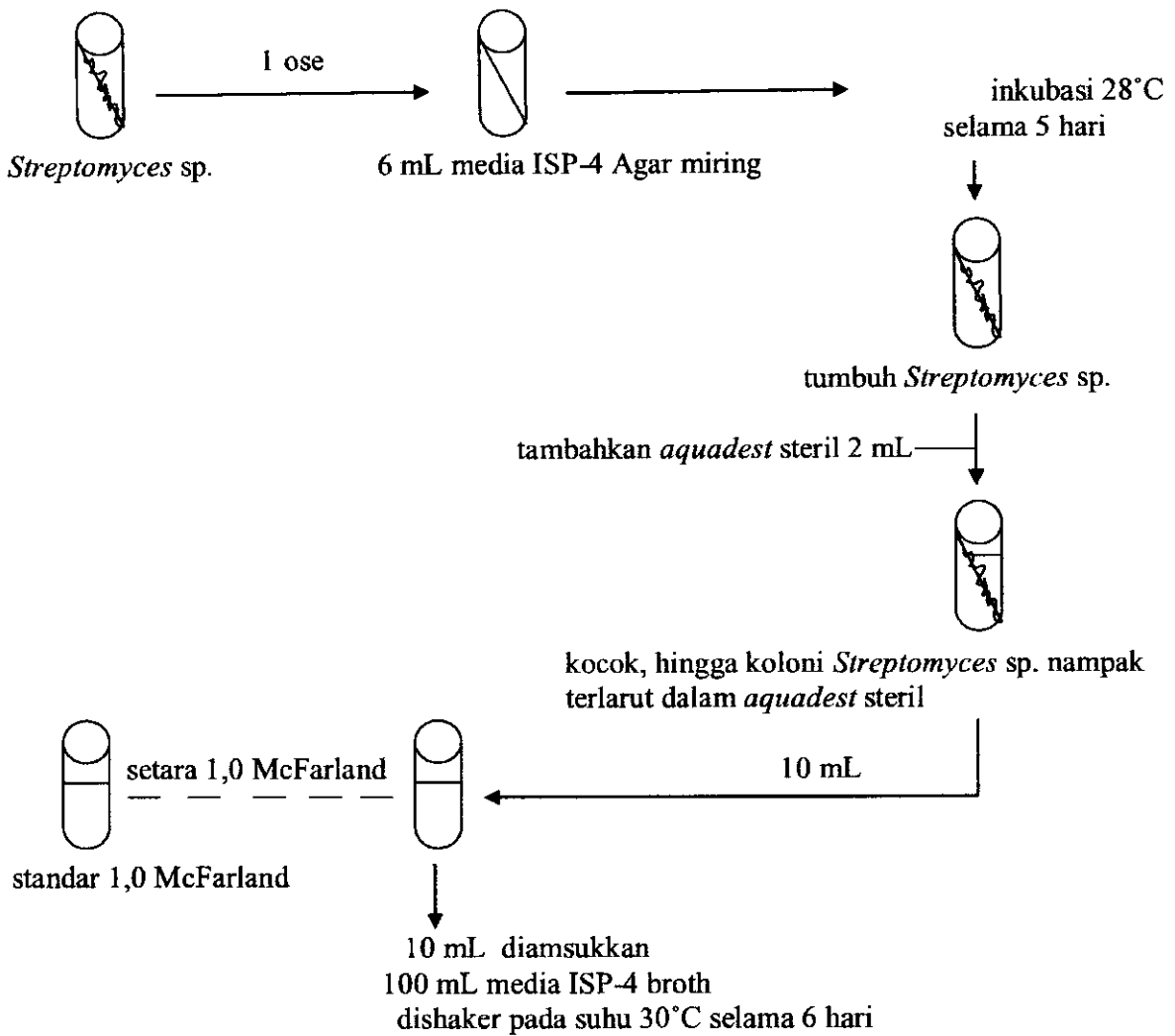
#### **Penyiapan Inokulum Bakteri M.TB H37rv**

Diambil 1-2 ose koloni *M.tuberculosis* H37Rv yang berumur 2 bulan pada media *Lowenstein Jensen* Agar miring, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 5 mL media *Middle Brook 7H9 broth*, yang didalamnya terdapat 8-10 buah *glass beads* (berfungsi untuk memudahkan terlarutnya *M.tuberculosis* dalam media *Middle Brook 7H9 broth*) selanjutnya dihomogenkan dengan menggunakan vortex.

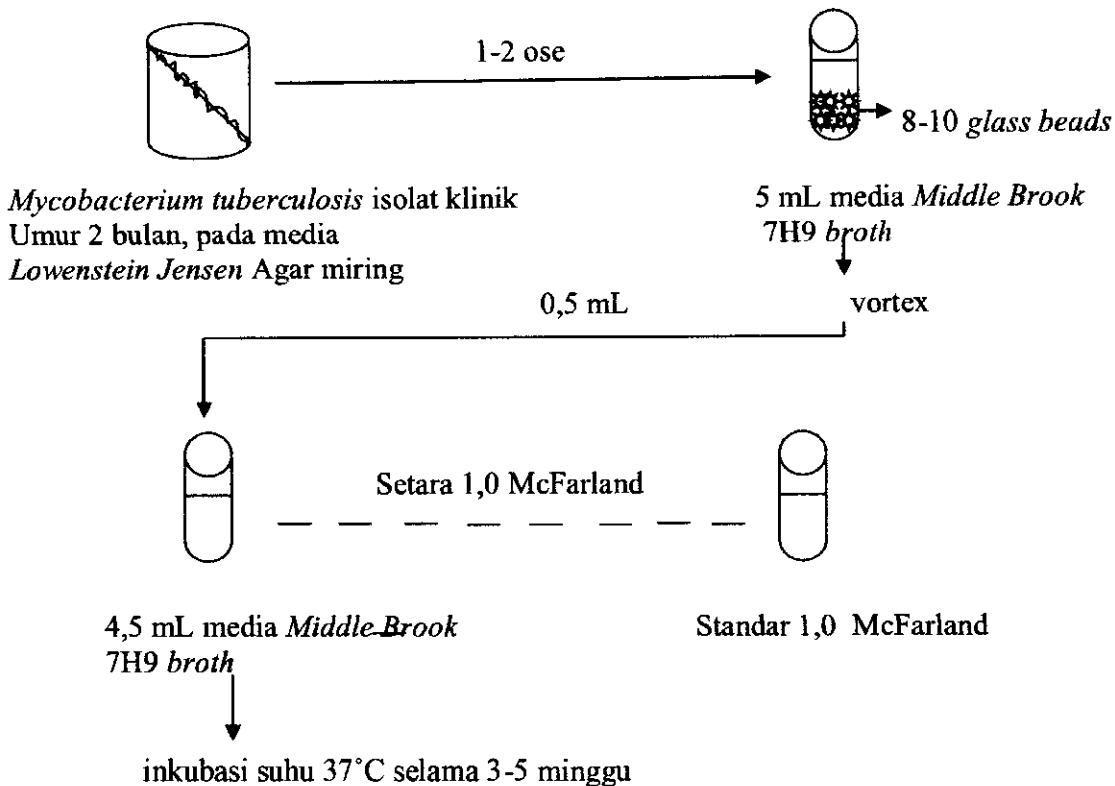
Diambil 0,5 mL biakan *M.tuberculosis* H37Rv yang terlarut dalam media *Middle Brook 7H9 broth* tersebut, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 4,5 mL media *Middle Brook 7H9 broth*. Diencerkan hingga mencapai kekeruhan setara dengan standar 1,0 McFarland (jumlah koloni bakteri uji setara dengan  $3 \times 10^8$  sel/mL), selanjutnya diambil 100  $\mu$ L dan dituangkan ditengah cawan petri yang telah berisi 20 mL media *Middle Brook 7H10* Agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, selama 3-5 minggu (Isenberg, 1992).

#### **Uji Aktivitas Anti TB in vivo pada mencit**

Penelitian uji aktivitas anti TB dari *Streptomyces* hasil optimasi secara invivo ditunjukkan dengan adanya hambatan pertumbuhan bakteri pada paru mencit. Dalam hal ini, mencit diinokulasi *Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv*, kemudian mencit diberikan metabolit sekunder *Streptomyces* hasil optimasi dengan FeSO<sub>4</sub> secara subkutan. Selanjutnya jumlah bakteri yang masih mampu tumbuh di paru paru mencit dibanding kontrol negatif dan kontrol obat streptomisin.



Gambar 4.1. Skema Penyiapan *Streptomyces* sp.



Gambar 4.2 Skema Penyiapan Inokulum Bakteri Uji

### Pewarnaan Tahan Asam (Ziehl-Neelsen)

Dibuat sediaan bakteri pada *obyek glass* kemudian fiksasi, selanjutnya *carbol fuchsin* dituangkan pada sediaan dan dipanaskan sampai timbul uap selama 5 menit. Dibiarkan hingga dingin selama 3 menit, kemudian sisa *carbol fuchsin* dibuang dari *obyek glass* selanjutnya dibilas dengan air bersih.

*Carbol fuchsin* yang melekat pada *obyek glass* dilunturkan dengan menggunakan alkohol asam selama 10-20 detik sampai warna merah hilang, dibilas dengan air bersih selanjutnya dituangkan *metylen blue*, dibiarkan selama 10-20 detik, kemudian *metylen blue* dibuang dari *obyek glass* dan dibilas dengan air bersih. Dikeringkan dengan kertas pengering. Ditetaskan satu tetes minyak emersi pada sediaan tersebut kemudian dilihat dibawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 100x. Bakteri berwarna merah adalah bakteri bersifat tahan asam (Tenover, 1993).

### Uji Aktivitas Anti TB *in vivo* pada mencit

Penelitian uji aktivitas anti TB dari *Streptomyces* hasil optimasi secara *invivo* ditunjukkan dengan adanya hambatan pertumbuhan bakteri pada paru mencit. Dalam hal ini, mencit diinokulasi *Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv*, kemudian mencit diberikan metabolit sekunder *Streptomyces* hasil optimasi dengan  $\text{FeSO}_4$  secara subkutan. Selanjutnya jumlah bakteri yang masih mampu tumbuh di paru paru mencit dibanding kontrol negatif dan kontrol obat streptomisin.

### Perlakuan Pada Hewan Coba

Penelitian menggunakan 50 ekor mencit jantan berumur 2-3 bulan dibagi menjadi 5 kelompok. Kelima kelompok tikus yang dipakai dalam penelitian ini dapat digambarkan sebagai berikut: 1) Kontrol negatif (K-): 10 ekor mencit jantan yang hanya diberi akuades 2) Kontrol positif (K+): 10 ekor mencit jantan diinfeksi M.TB H37rv, 3) P1: 10 ekor mencit jantan yang diinfeksi M.TB H37rv dan diberi metabolit sekunder *Streptomyces* hasil optimasi dengan  $\text{FeSO}_4$  selama 30 hari, 4) P2: 10 ekor mencit jantan yang diinfeksi M.TB H37rv dan diberi metabolit sekunder *Streptomyces* hasil optimasi selama 30 hari, 5) P3: 10 ekor mencit jantan yang diinfeksi M.TB H37rv dan diberi metabolit sekunder *Streptomyces* hasil optimasi selama 30 hari. Pada hari ke-31 masing-masing kelompok dilakukan pemeriksaan imunohistokimia TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  dan IL-6 dari jaringan paru-paru dan pembuatan preparat histopatologi.

### Analisis Data

Analisis statistik yang dilakukan terhadap variabel score kerusakan paru menggunakan metode Dorman dan jumlah bakteri M.TBC H37rv dari kultur paru. Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang bermakna variabel score kerusakan paru menggunakan metode Dorman dan jumlah bakteri M.TBC H37rv dari kultur paru antara kelompok dilakukan uji ANOVA dilanjutkan dengan uji Jarak Berganda *Duncan's* dengan tingkat kemaknaan 5 %.

## BAB V

### HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

#### Fermentasi *Streptomyces* Hasil Optimasi



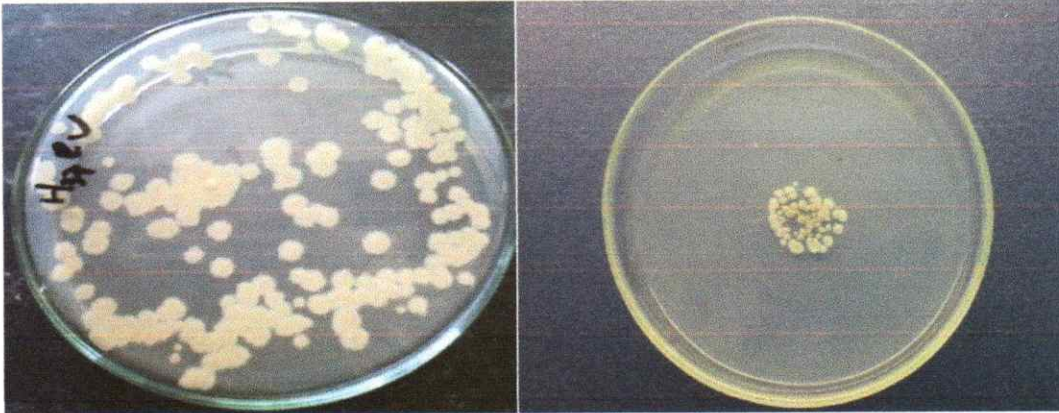
Gambar 5.1. Fermentasi *Streptomyces* Hasil Optimasi

#### *Streptomyces* Kultur dan Perbanyakkan Bakteri pada *Middle brook 7H11*

Sampel paru dikultur pada medium *middlebrook 7H11* dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 2 minggu untuk melihat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* dari 5 kelompok perlakuan. Hasil penelitian ini menunjukkan ciri morfologi karakteristik koloni

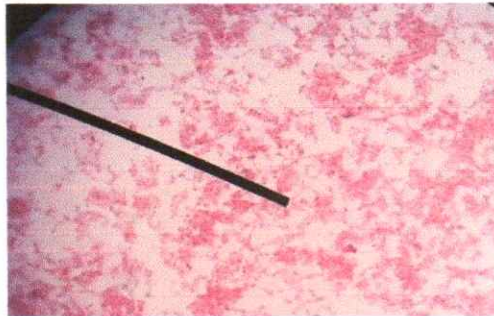


*Mycobacterium tuberculosis* yaitu koloni yang berbungkul-dungkul dengan permukaan kasar, warna putih tulang. Setelah dikultur selama dua minggu, koloni bakteri dilakukan identifikasi ulangan dengan pengecatan Ziehl-Neelsen untuk mengetahui kemurnian koloni bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Forbes, 2002).



Gambar 5.2 Koloni bakteri *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv pada medium Middlebrook 7H11.

Dari hasil pengecatan dengan metode pengecatan Ziehl-Neelsen tampak bakteri berwarna merah dan berbentuk batang langsing, hal ini menunjukkan bahwa bakteri adalah bakteri tahan asam yang merupakan salah satu ciri bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.



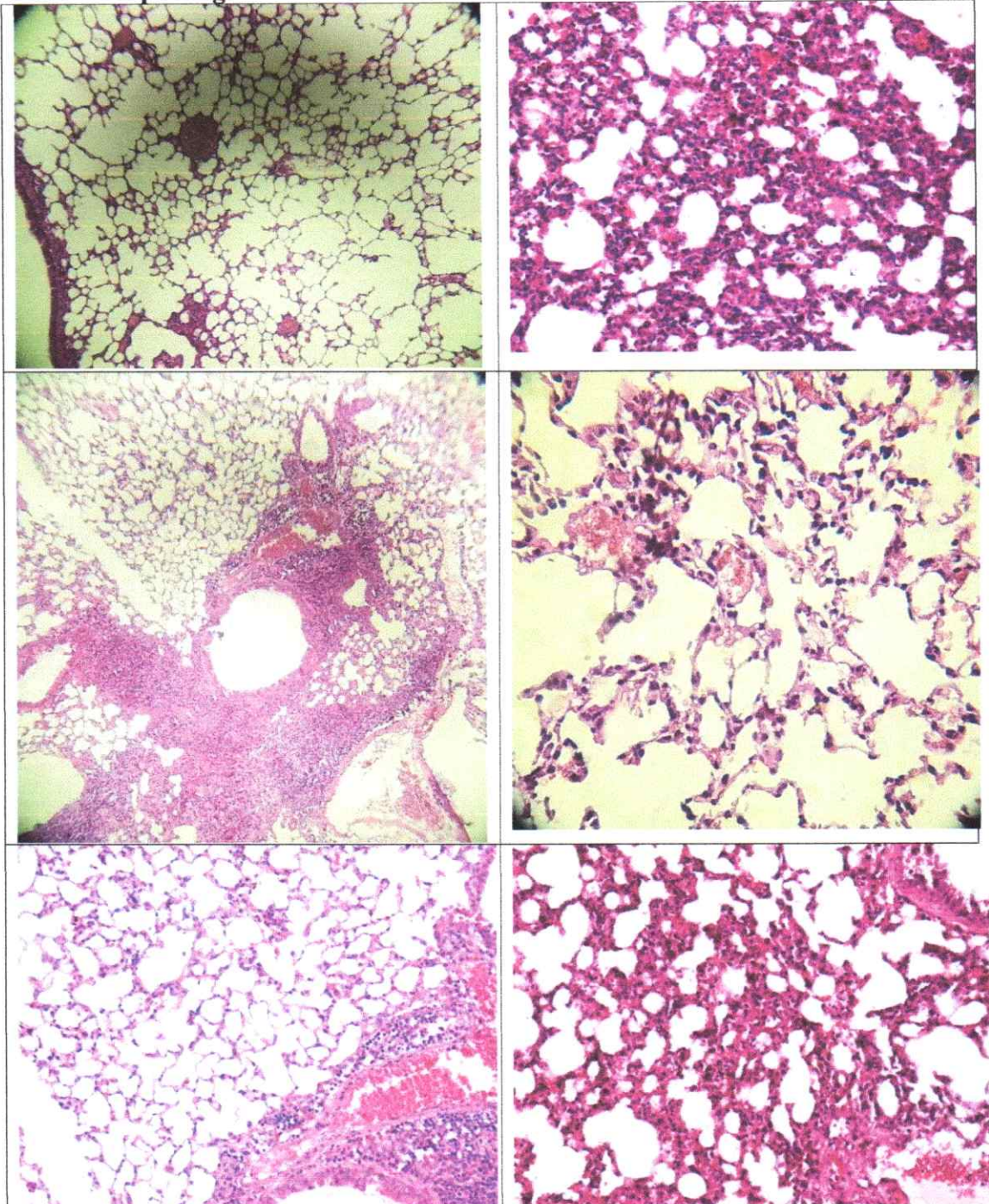
Gambar 5.3 Hasil pengecatan Koloni bakteri *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv dengan pengecatan Ziehl-Neelsen.

**Tabel 5.1 Jumlah Koloni *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv pada Media Middlebrook**

Kelompok	Rerata Jumlah Koloni <i>M. tuberculosis</i>
Kontrol Negatif	$0^a \pm 0$
Kontrol Positif	$277.83^d \pm 21.094$
Streptomyces D6	$80.50^c \pm 13.590$
Streptomyces D7	$46.33^b \pm 10.708$
Streptomyces D7.1	$4.17^a \pm 3.971$



### Hasil Histopatologi Paru Mencit



### LUARAN YANG DICAPAI

1. Publikasi pada Jurnal Nasional Terakreditasi (Accepted)
2. Publikasi pada Jurnal International Veterinary World India (Draft artikel)

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah M.TBC H37rv dari sampel paru mengalami penurunan dibandingkan kontrol positif yang diinfeksi M.TBC H37rv pada perlakuan dengan pemberian Streptomyces D6, D7 dan D7.1. Hasil pemeriksaan histopatologi paru menggunakan score Dorman menunjukkan perlakuan dengan pemberian Streptomyces D6, D7 dan D7.1 menurunkan kerusakan paru yang dilihat dari gambaran peribronkiolitis, perivaskulitis, alveolitis, dan granuloma.



## DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, A.S. and Wellington, M.H.E. 2001. The Taxonomy of Streptomyces and Related Genera. *Internatl. J. System and Evolut Microbiol Rev.* Vol. 51.p.797–814.
- Arabolaza, A., D'Angelo, M., Comba, S. and Gramajo, H. (2010). FasR, a Novel Class of Transcriptional Regulator, Governs the Activation of Fatty Acid Biosynthesis Genes in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 78: 47–63.
- Ausubel, F.,M., Brent, R., Kingston, R.,E., Moore, D.,D., Smith, J.,A., and Sthrl, K. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*. Third Edition. John Wiley & Sons. Inc.
- Bax R, Mullan N and Verhoef J. 2000. The Millenium bugs: The need for and development of new antibacterials. *Imt J Antimicrob Agent*, 15: 51-59
- Borodina, I., K. Preben and N. Jens. 2005. Genome-Scale Analysis of Streptomyces coelicolor (2) Metabolism. *Genome Research.* 15:821.
- Chandrasekaran, M., Kannathasan, K. and Venkatesalu, V. Antimicrobial Activity of Fatty Acid Methyl Esters of Some Members of Chenopodiaceae. *Z. Naturforsch C.* 63(5-6):331-6.
- Dikbas, N. 2010, *Determination of Antibiotic Susceptibility and Fatty Acid Methyl Ester Profiles of Bacillus cereus Strain Isolated from Different Food Sources in Turkey*. Biotechnology Research and Application Centre. Ataturk University. Erzurum. Turkey.
- Flynn JL.2004. Immunology of Tuberculosis and Implication in Vaccine Development. *Tuberculosis* 84. 93-101.
- Guzman LM, Weiss D and Beckwith J. 2000. Domain Swapping Analysis of FtsI, FtsL and FtsQ, Bitopic Membrane Protein Essential for Cell Division in Escherichia coli. *J. Bacteriol*, Aug: 5049-51
- Hoopwood, D.A. 1999. Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. *Chemical Rev.* 97:2465-2497.
- Korn F.W. and Jurgen, H.K. 2002. The Family Streptomycetaceae. [www.biology.eku.edu/piecece/streptomyces](http://www.biology.eku.edu/piecece/streptomyces). (diakses tanggal 20 Pebruari 2010).
- Kurnijasanti, R. (2013). Pengembangan Metode Penapisan Anti Tuberkulosis Berdasarkan Profil *Fatty Acid Methyl Ester (FAME) Streptomyces* sp. Disertasi. Fakultas Kedokteran. Universitas Airlangga.
- Kyuma, K. 2000. *Soil Degradation in the Coastal Lowlands of Southeast Asia*. Kyoto. Japan.
- Lina, M., S. Dadang dan F. Suhadi. 2000. Pengujian Isolat Klinik *Mycobacterium tuberculosis* Resisten Terhadap Beberapa Antibiotika Dengan Metode Reaksi

Berantai Polimerase / Polymerase Chain Reaction (PCR). Risalah Pertemuan Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi. 69.

- Mainous III, Arch and Pomeroy. 2001. *Claire Mangement of Antimicrobial in infeksiions Diseases*. Humana press. P.349
- Quinn, P.J., B.K. Markey., M.E. Carter., W.J. Donnelly and F.C. Leonard. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Science Ltd. UK. 63
- Ruzin A, Singh G, Severin A, Yang Y, Dustin RG, Sutherland AG, Minnick A, Greensrein M, May MK, Shlaes DM and Bradford PA. 2004. Mechanisme of action of the mannopeptimycins, a novel class of glycopeptide antibiotics active againts Vancomycin resistant garm positive Bacteriae, antimicrobial agents and Chemotherapy. *Am Soc Microbiol*: 728-738
- Sasser, M. 2006. *Bacterial Identification by Gas Chromatography Analysis of Fatty Acids Methyl Esters (GC-FAME)*, TechnicalNote #101, MIDI Inc.
- Sudibyo. 1991. *Petunjuk Praktikum Kursus Singkat Fermentasi Antibiotika*. PAU Bioteknologi. UGM. Yogyakarta.
- Tenover, F.C. 1993. The Resurgence of Tuberculosis : Is Your Laboratory Ready ?. *J.Clin.Microbiol*. 31:767-770.
- Todar K. 2005. *Todar's Online Texbook of Bacteriology*. University of Wsconsin-Madison Department of bacteriology. Todar, K. 2009. *Mycobacterium tuberculosis and Tuberculosis*. [http://www. textbookofbacteriology. net](http://www.textbookofbacteriology.net). [18 Agustus 2009]
- Triatmodjo, P. 2002. *Pola Resistensi M.tuberculosis terhadap Obat Anti Tuberkulosis (OAT) di Jawa Barat*. Center for Research and Development of Disease Control. NIHRD. Jakarta.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D. 2001. How Many Antibiotics Are Produced by the Genus Streptomyces ?. *Arch. Microbiology*.
- WHO Report. *Global Tuberculosis Control:Surveillance, Planning, Financing*. 2009.
- Wibowo, J. 1990. *Teknologi Fermentasi. Proyek Pengembangan Pusat Fasilitas Bersama Antar Universitas (Bank Dunia XVII) PAU Pangan dan Gizi*. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Zhao G, Yeh WK, Carnahan RH, Flokowitsch J, Meyer TI, William E, Alborn JR, Gerald W, Becker and Jaskunas R. 1997. Biochemical Characteriization of Penicilline Resistant and Sensitive Penicillin Binding Protein transpeptidase activities of Streptococcus Pneumoniae and Mechanistic Implications in bacterial resistance to B lactam antibiotic. *J. Bacteriol Aug*:4901-4908

Lampiran 1. Draft Artikel pada Jurnal Nasional Terakreditasi



UNIVERSITAS AIRLANGGA  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
GRHA MASYARAKAT ILMIAH KEDOKTERAN (GRAMIK)  
Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya Fax: 5013749  
Telp. (031) 50202251-5030252 Pos. 135 Kode Pos. 60131  
Telp. (031) 5020569

1 Oktober 2018

Nomor : 193/UN3.1.1/FM/2018  
Lamp : -  
Hal : Pemberitahuan penerimaan naskah

Kepada Yth  
Rochmah Kurnijasanti  
Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Airlangga  
Surabaya

Dengan Hormat,

Sekretariat redaksi Fohs Medica Indonesia telah menerima naskah dengan judul "*Potensial of *Streptomyces* sp. Isolate of Porong River Land as Anti Tuberculosis*" dengan penulis Rochmah Kurnijasanti, Rahmi Sugihartun, Arimba. Naskah tersebut selanjutnya akan menjalani proses redaksional sesuai dengan ketentuan.

Terima Kasih.

Sekretariat Redaksi  
Atahiyatul Fatmahan, S. Ant

## Potential of *Streptomyces* sp. Isolate of Porong River Land as Anti Tuberculosis

Rochmah Kurnijasanti, Rahmi Sugihartuti, Arimbi

Department of Basic Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

### ABSTRACT

The aim of the study was to obtain the potential of *Streptomyces* sp soil isolates from the Porong River as an anti-TB in vivo on mice.

The research method was carried out through stage 1) Optimization of M.TBC H37rv dose as the causative agent of infection 2) Optimization of *Streptomyces* dose 3) Anti Tuberculosis activity test of *Streptomyces* sp. optimization results 4) Culture on Middlebrook agar media with parameters of M.TBC H37rv number from lung samples.

The results showed that the number of M.TBC H37rv from lung samples decreased compared to positive controls infected with M.TBC H37rv in treatment with administration of *Streptomyces* D6, D7 and D7.1. The results of pulmonary histopathology examination using Dorman score showed that treatment with administration of *Streptomyces* D6, D7 and D7.1 reduced lung damage seen from the description of peribronkiolitis, perivaskulitis, alveolitis, and granuloma..

**Key words:** *Streptomyces* sp, anti Tuberculosis potency, Middlebrook, Porong river soil,

### INTRODUCTION

*Streptomyces* is a bacterium including in Actinobacteria which can live in many kind of habitations like soil including mud soil (Korn and Jurgen, 2002; Madigan et al, 2002), mangrove land, sea, sea sponge, river bank, soil in high land and high polluted soil. Several *Streptomyces* potents to produce anti-parasite substance e.i. avermectin that can catch directly on 16S rRNA prokaryote in location that has a potent to solve a resistance code (Woodcock et al, 1991). Characterization by using 16S rRNA gene can determine the species of *Streptomyces*.

Number of *Streptomyces* which can be discovered based on Gene Bank data until now are 1,489 species which consisted of 11 isolates from Indonesia and 1,478 isolates from world. *Streptomyces* produces secondary metabolites consisted of antibiotics and such substances that can act as insect larvasides e.i. faerifungin, macrotetroloid, flavonoid and tetranectin as mentioned by Ando, 1983; Pampligione et al, 1985; Zizka et al, 1989; Anonymous, 1990 and Rao et al, 1990 (Vijayakumar et al, 2010).

Based on the above mentions, therefore the study is done for searching new isolate of *Streptomyces* sp based on the characteristic of sequence profile of gene of 16S rRNA that be collected from Porong river soil, Sidoarjo, and hopefully the determined species of *Streptomyces* can survive and has anti TB activity .



## MATERIALS AND METHODS

### Location of Porong River Soil.

Porong River soil is located in Sidoarjo District. The distance is around 35 km southern part from Surabaya, the capital of East Jawa Province, Indonesia. Mud was spurted come out from the hole of petroleum drilling mine since 2006 and still flowing over one subdistrict area until now.

### Soil sample

Soil samples were collected from several parts of Porong river soil, Sidoarjo. The collected samples were brought to Laboratory of Pharmacology of Faculty of Veterinary, Airlangga University, Surabaya in order to culture the *Streptomyces* bacterium from soil samples.

### Culture of *Streptomyces* sp isolate

According to Alexander and Strete method (2001), each mud soil samples were cultured in ISP-4 media in petridish for 4 days to get mix-cultures. From the mix-cultures were selected *Streptomyces* sp colonies. One "ose of *Streptomyces* sp from each colony was taken and then cultured in ISP-4 hard media in a petridish, then incubated for 4 days at 28°C for several replications. After that *Streptomyces* sp cultures were transferred into ISP-4 media slant agar. The next step, according to Davelos et al (2004) *Streptomyces* sp isolates must be saved in ISP-4 liquid media which added 20% glycerol at temperature of -80°C in order to prevent the morphology and physiological changing.

## RESULT AND DISCUSSION

**Tabel 5.1 Number of Mycobacterium tuberculosis colonies of H37R strain on the Middlebrook 7H10 Agar**

Kelompok	Rerata Jumlah Koloni <i>M. tuberculosis</i>
Kontrol Negatif	0 <sup>a</sup> ± 0
Kontrol Positif	277.83 <sup>d</sup> ± 21.094
<i>Streptomyces</i> D6	80.50 <sup>c</sup> ± 13.590
<i>Streptomyces</i> D7	46.33 <sup>b</sup> ± 10.708
<i>Streptomyces</i> D7.1	4.17 <sup>a</sup> ± 3.971

## CONCLUSIONS

The results of research on anti tuberculosis activity of *Streptomyces* sp isolates collected from Sidoarjo Porong river can be concluded that 1) there were eight *Streptomyces* sp. isolates could be isolated from mud soil that showed different characters morphologically, 2) results of anti TB effect screening against *M.tuberculosis* that there were three isolates that had effective anti TB potency viz. *Streptomyces* SP-D6, SP-D7 and SP-D7.1, 4) comparing anti tuberculosis effect of the three species showed that *Streptomyces* SP-D7.1 has highest potent

## REFERENCES

- Alexander, SK. and Strete, D., 2001. *Microbiology: A Photographic Atlas for the Laboratory*. Addison Wesley Longman. Inc.
- Anderson, AS. and Wellington, MHE., 2001. Review Article the Taxonomy of *Streptomyces* and Related Genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 797-814.
- Davelos, AL., Xiao, K., Samac, DA., Kinkel, LL., 2004. Spatial Variation in the Frequency and Intensity of Antibiotic Interaction among *Streptomyces* in a Prairie Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1051-1058.
- Forbes, BB., Sahm, DF., Weissfeid, AS., 1998. *Diagnostic of Microbiology*. 9<sup>th</sup> Ed. Mosby Inc. USA.
- Hoopwood., 1999. Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases. *Chemical Rev.*, 97: 2465-2497.
- Isnaeni, 1998. Mutasintesis Antibiotika Mutan *Streptomyces griseus* ATCC 10137. Disertasi. ITB. Bandung.
- Jawetz, Z.E., Melnick, J.L. and Adelberg, E.A., 1986. *Mikrobiologi untuk Profesi Kedokteran*. Edisi XIV. Penerjemah: Tonang, H. Jakarta: EGC Penerbit Buku Kedokteran.
- Jun, LW., Zhang, LP., Xu, P., Cui, XL., Hua, LX., Zhang, Z., Schumann, P., Stackebrandt, E., Jiang, CL., 2003. *Agromyces aurentiacus* sp. nov. Isolated from a Chinese Primeval Foest. *Evol. Microbiology*, 53: 303-307.
- Purnomo, E., 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Hidrocarbon pada Isolat Tanah Lumpur Lapindo. Tesis. UB. 2012.
- Rinehart, K.L. Jr. and Stroshane, R.M., 1998. Biosynthesis of Aminocyclitol Antibiotic. *J. Antibiotic.*, 29: 319-353.

**Lampiran 2. Personalia Pelaksana dan kualifikasinya**

<b>Personalia</b>	<b>Kualifikasi</b>
Dr. Rochmah Kurnijasanti,drh., MSi	Farmakologi, Mikrobiologi
Dr. Rahmi Sugihartuti,drh., MKes	Farmakologi, Mikrobiologi
Arimbi,drh., MKes	Patologi
Yuyun	Mikrobiologi
Fachrul	Manajemen Hewan Coab
ucik	Mikrobiologi