

**LAPORAN HASIL PENELITIAN  
HIBAH PENELITIAN TIM PASCASARJANA-HPTP  
(HIBAH PASCA)**



**PROFILING METABOLOMIK *Streptomyces* spp.  
ISOLAT TANAH KOMPOS BRATANG SURABAYA  
SEBAGAI ANTIINFEKSI**

Peneliti:

Dr. Isnaeni, MS., Apt  
Drs. Achmad Toto Poernomo, MSi., Apt  
Drh. Rochmah Kurnijasanti, MS

DIBIYAI DANA DIPA DP2M  
SURAT PERJANJIAN NOMOR: 844/H3/KR/2011  
DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI  
DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL

UNIVERSITAS AIRLANGGA

OKTOBER 2011

## HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian : **PROFILING METABOLOMIK  
*Streptomyces* spp. ISOLAT TANAH  
RUMAH KOMPOS BRATANG  
SURABAYA SEBAGAI ANTIINFEKSI**
2. Peneliti Utama
- a. Nama Lengkap : Dr. Isnaeni, MS., Apt
- b. Jenis Kelamin : Perempuan
- c. NIP : 19560113198203 2003
- d. Golongan /Pangkat : Pembina/IV a
- e. Jabatan Struktural : Wakil Dekan I
- f. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
- g. Bidang keahlian : Mikrobiologi
- h. Fakultas /Jurusan : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

3. Daftar Anggota Peneliti dan Mahasiswa

No	Nama	Bidang keahlian	Fakultas/Jurusan	Universitas
1	Isnaeni	Mikrobiologi	Farmasi	Airlangga
2	Ach. Toto Poernomo	Mikrobiologi	Farmasi	Airlangga
3	Rochmah Kurnijasanti	Farmakologi	Kedokteran Hewan	Airlangga

4. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 3 tahun
- b. Jangka waktu penelitian yang sudah dijalani: 6 bulan
- c. Biaya total yang diusulkan : Rp. 90.000.000,00
- d. Biaya yang disetujui tahun 2011 : Rp.60.000.000,00



Mengetahui  
a/n Dekan  
Wakil Dekan II

Dr. Junaidi Khotib, S.Si, M.Kes., Ph.D., Apt.  
NIP. 1970 1022 199512 1001

Surabaya, 18 OCT 2011

Ketua Peneliti

Dr. Isnaeni, MS., Apt  
NIP. 19560113198203 2003

Mengetahui,  
Ketua Lembaga penelitian dan pengabdian kepada Masyarakat



Dr. Joko Agus Purwanto, MS., Apt.  
NIP. 1959 0805 198701 1001

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

## Ringkasan dan Summary

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan yang telah dilakukan untuk mengisolasi *Streptomyces spp.* dari kompos Rumah Sampah Bratang. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa sebanyak delapan isolat *Streptomyces spp.* berhasil diidentifikasi secara konvensional dan setelah dilakukan penapisan daya antimikroba terhadap mikroba uji dari golongan Gram positif dan Gram negatif serta *Candida albicans*, beberapa spesies menunjukkan daya antimikroba yang variatif. Penelitian ini dilakukan terutama sebagai upaya eksplorasi senyawa bioaktif anti infeksi baru yang akan menggantikan anti infeksi yang telah resisten. Sifat resistensi atau kepekaan mikroorganisme terhadap anti infeksi yang terdapat pada gen. resistensi mikroorganisme patogen dapat menimbulkan banyak masalah dalam memberantas penyakit infeksi. Oleh karena itu, diperlukan suatu tindakan untuk mengantisipasi masalah resistensi bahan atau senyawa anti infeksi. Penggunaan anti infeksi baru merupakan salah satu alternatif. Eliminasi bentuk resisten dapat dilakukan dengan mengganti anti infeksi yang telah lama digunakan dengan anti infeksi lain yang lebih sensitif, sehingga mikroba resisten akan binasa.

*Streptomyces* merupakan organisme tanah dengan sifat-sifat umum yang dimiliki oleh bakteri dan jamur yaitu *thread bacteria* (bakteri berhifa), digolongkan sebagai jenis bakteri berfilamen dengan diameter hifa 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  dan bersifat Gram positif (Korn and Jurgen, 2002). Menurut Kieser yang dikutip oleh Borodina *et al.* (2005) *Streptomyces* telah menarik banyak perhatian, karena kemampuannya untuk menghasilkan metabolit baik primer maupun sekunder yang mempunyai bioaktivitas cukup luas, antara lain antibiotik, *immunosupressan*, dan agen anti kanker. *Streptomyces* dapat mengelaborasi berbagai substansi anti mikroba melalui berbagai aktivitas pengobatan (Quinn *et al.*, 2002).

Pada penelitian yang terdahulu menunjukkan bahwa pada tanah kompos rumah sampah bratang, ditemukan *Streptomyces spp.* yang mempunyai aktivitas antibiotik terhadap bakteri uji bakteri Gram negatif (*E.coli ATCC 25922* dan *P.aeruginosa ATCC 27853*) dan Gram positif (*S. aureus ATCC 25923* dan *B.subtilis*) serta *Candida albicans* (Yulistiani, 2010).

Pada **tahun pertama**, penelitian telah difokuskan pada pengembangan *Streptomyces spp.* isolat tanah rumah kompos Bratang Surabaya penghasil antibiotik sebagai anti *Mycobacterium tuberculosis*, untuk mengembangkan bahan baku terapi tuberkulosis. Tujuan

---

Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011

khusus penelitian ini adalah 1) Mendapatkan profil aktivitas metabolit *Streptomyces* spp isolat tanah rumah kompos Bratang Surabaya sebagai anti *Mycobacterium Tuberculosis*. 2) Mendapatkan *time course* produksi bioaktif anti tuberkulosis untuk mengetahui awal aktivitas, puncak aktivitas dan durasi aktivitas sel dalam menghasilkan bioaktif. 3) Optimasi media dan faktor lingkungan (pH dan suhu serta kecepatan aerasi) terhadap produktivitas sel dalam menghasilkan senyawa bioaktif 4) Isolasi senyawa bioaktif (*crude substances*) dari *Streptomyces* spp isolat tanah rumah kompos Bratang Surabaya sebagai anti *Mycobacterium Tuberculosis*.

Pada **tahun kedua**, penelitian bertujuan untuk 1) melakukan karakterisasi dan profiling senyawa bioaktif sebagai “marker” *bioactive substace* anti tuberkulosis dengan GC-MS. 2) Mendapatkan profil sekuen gen 16S rRNA *Streptomyces* spp penghasil antibiotik isolat tanah rumah kompos Bratang Surabaya dibandingkan profil sekuen gen 16S rRNA *Streptomyces* standar penghasil antibiotika yang representati untuk antibiotik anti tuberkulosis.

Pada **tahun ketiga**, penelitian bertujuan untuk 1) melakukan karakterisasi dan profiling senyawa bioaktif sebagai “marker” *bioactive substace* anti viral khususnya virus Avian Influenza (H5N1). 2) Mendapatkan profil sekuen gen 16S rRNA *Streptomyces* spp penghasil anti virus Avian Influenza (H5N1) isolat tanah rumah kompos Bratang Surabaya.

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*



## Prakata

Segala puji bagi Allah swt, berkat limpahan rahmat dan hidayah Nya *progress report* Penelitian Hibah Pasca tahun 2011 telah berhasil disusun. Penelitian ini merupakan penelitian payung yang bukan hanya melibatkan beberapa staf, tetapi juga mahasiswa S1 dan S3. Beberapa tahap yang dilakukan dalam penelitian ini merupakan bagian dari penelitian mahasiswa.

Beberapa tahap penelitian menggunakan fasilitas di tempat lain, misalnya melalui kerjasama dengan UITM Malaysia untuk orientasi jumlah metabolit aktif dengan metode bioautografi dan identifikasi *Streptomyces* sp. dengan 16S rRNA.

Berdasarkan data yang diperoleh dan mengacu tujuan penelitian, maka hasil penelitian sudah mencapai 100%, walaupun untuk tahap III baru berupa data kualitatif hasil penapisan aktivitas anti TB. Tahap V masih dalam proses sequencing, sehingga apabila sudah diperoleh profil 16s rRNA dapat dicari korelasi antara aktivitas dan profil metil ester asam lemak dan hasil sequencing DNA secara manual, selanjutnya pada tahun berikutnya akan dianalisis secara kuantitatif dengan program multivariat. Beberapa tahap analisis memerlukan instrumen yang ada di Unit Layanan Pengujian Fakultas Farmasi dan Institute Tropical Disease Unair.

Hasil penelitian telah dipublikasikan dalam bentuk poster pada seminar internasional, sedangkan publikasi dalam bentuk tulisan ilmiah dalam international *Journal of Biological Diversity (Biodiversitas)* masih dalam proses. Hasil penelitian diharapkan dapat dimanfaatkan untuk penapisan aktivitas anti TB dan anti viral (tahun ke II dan III) secara cepat dengan tahapan yang tidak terlalu kompleks, berbasis pada profil metabolomik *Streptomyces* spp. yang dieksplorasi dari bahan alam.

Kepada seluruh pihak terkait yang telah memberikan bantuan dan berkontribusi dalam penelitian ini disampaikan terima kasih.

Surabaya, 18 OCT 2011

Penulis

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

**DAFTAR ISI**

	<b>Halaman</b>
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iii
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I. PENDAHULUAN	1
II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE I	4
III. TINJAUAN PUSTAKA	4
IV. METODE PENELITIAN	9
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	51
VII. RENCANA/PENELITIAN TAHAP SELANJUTNYA	
A. Tujuan Khusus	
B. Metode	
C. Jadwal Kerja	
VIII. DRAF ARTIKEL ILMIAH atau ARTIKEL YANG SUDAH TERBIT	
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN	55

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>		<b>Halaman</b>
4.1a.	Hasil pengamatan aktivitas <i>Streptomyces</i> spp. pada medium agar ISP-4 terhadap bakteri uji setelah 48 jam	18
4.1b	Hasil pengamatan aktivitas <i>Streptomyces</i> spp. pada medium agar ISP-4 terhadap bakteri uji setelah 72 jam	19
4.2a.	Hasil pengamatan time course fermentasi anti mikroba <i>Streptomyces</i> spp	23
4.3a	Data kromatogram ester metil asam lemak <i>Streptomyces</i> spp berdasarkan puncak utama dan puncak yang muncul pada Rt yang sama	49
4.3b	Data kromatogram ester metil asam lemak <i>Streptomyces</i> spp secara keseluruhan	49

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
4.1. Biakan <i>Streptomyces spp.</i> pada medium agar ISP-4	18
4.2a. Hasil penapisandaya antimikroba <i>Streptomyces spp.</i> pada umur 24 jam dengan modifikasi cetak agar	25
4.2b. Hasil penapisandaya antimikroba <i>Streptomyces spp.</i> pada umur 48 jam dengan modifikasi cetak agar	26
4.2c. Hasil penapisandaya antimikroba <i>Streptomyces spp.</i> pada umur 48 jam dengan modifikasi cetak agar	27
4.2d. Hasil penapisandaya antimikroba <i>Streptomyces spp.</i> pada umur 72 jam dengan modifikasi cetak agar	28
4.3a. <i>Time course</i> aktivitas <i>Streptomyces spp.</i> terhadap <i>Bacillus sp.</i> Pada media ISP-4, suhu 28°C, 150 rpm	30
4.3b. <i>Time course</i> aktivitas <i>Streptomyces spp.</i> terhadap <i>P. aeruginosa</i> Pada media ISP-4, suhu 28°C, 150 rpm	33
4.3c. <i>Time course</i> aktivitas <i>Streptomyces spp.</i> terhadap <i>Bacillus sp</i> Pada media ISP-4, suhu 28°C, 150 rpm	36
4.3d. <i>Time course</i> aktivitas <i>Streptomyces spp.</i> terhadap <i>S.aureus sp</i> Pada media ISP-4, suhu 28°C, 150 rpm	38
4.3e. <i>Time course</i> aktivitas <i>Streptomyces spp.</i> terhadap <i>S. Typhymurium</i> Pada media ISP-4, suhu 28°C, 150 rpm	40
4.3f. <i>Time course</i> aktivitas <i>Streptomyces spp.</i> terhadap <i>Bacillus subtilis</i> Pada media ISP-4, suhu 28°C, 150 rpm	41
4.3g. <i>Time course</i> aktivitas <i>Streptomyces spp.</i> terhadap <i>Salmonella sp</i> Pada media ISP-4, suhu 28°C, 150 rpm	43
4.3. Hasil uji aktivitas daya anti <i>Mycobacterium tuberculosis</i> menggunakan media Lowenstein Jensen dengan modifikasi metode cetak	46
4.4. Serbuk fermentation broth hasil spray drying dan hasil uji aktivitas daya hambat terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	47
4.5. Reaksi pembennntukan eeester metal asam lemak	48

## I. Pendahuluan

### Latar Belakang

Mikroorganisme yang hidup di alam ini tersebar luas, baik yang hidup melalui kontak langsung dengan lingkungan maupun yang hidup di dalam jaringan makhluk hidup. Iklim tropis yang dimiliki Indonesia sangat menguntungkan bagi pertumbuhan dan perkembangan mikroorganisme, khususnya mikroorganisme patogen yang dapat menyebabkan infeksi pada makhluk hidup ([www.kabarindonesia.com](http://www.kabarindonesia.com), 2009).

Tingkat penyebaran penyakit infeksi pada manusia di Indonesia masih sangat tinggi, sehingga dibutuhkan biaya penanggulangan yang cukup besar untuk pengadaan obat-obat golongan antibiotik. Sementara Indonesia belum mampu memenuhi kebutuhan tersebut, sehingga harus mengimpor bahan baku antibiotik dari negara lain. Dana yang dibutuhkan untuk keperluan tersebut berkisar antara Rp. 81,6 sampai Rp. 122,4 miliar per tahun (Dhanutirto, 1987)

Di sisi lain, negara maju seperti Inggris, Amerika Serikat, Jerman dan Jepang berlomba-lomba melakukan penelitian intensif untuk pengadaan bahan baku antibiotik. Dilaporkan bahwa hampir semua antibiotik yang telah ditemukan saat ini dihasilkan oleh mikroba tanah, yaitu dari golongan bakteri, jamur dan actinomycetes (Imezawa, 1987). Pada tahun 1963 sudah ditemukan 511 jenis antibiotik dan pada tahun 1974 meningkat tajam menjadi 4.006 jenis dan hingga saat ini diperkirakan sudah ditemukan lebih dari 6.000 jenis antibiotik. Mikroba menghasilkan antibiotik melalui mekanisme mikroba antagonis atau produksi metabolit bioaktif (Thomashow, 2005).

Satu golongan bakteri yang khas penghuni tanah dan yang memberi bau tanah (geosmin) ialah genus *Streptomyces*. *Streptomyces sp.* banyak dijumpai baik di dalam tanah (lapisan akar tanaman, humus, dan pupuk kandang) maupun dalam air sungai, laut, dan kolam. Genus *Streptomyces* dapat memproduksi bermacam-macam metabolit sekunder dengan bermacam-macam struktur kimia. Contoh *Streptomyces sp.* yang menghasilkan antibiotik adalah *Streptomyces griseus* menghasilkan streptomisin, *Streptomyces aureofaciens* menghasilkan aureomisin, *Streptomyces venezuelae* menghasilkan kloromisetin (kloramfenikol), *Streptomyces ranasus* menghasilkan antibiotik paramomisin (El Naggar *et al.*, 2001).

Streptomisin merupakan salah satu obat pilihan untuk penyakit Tuberkulosis. Penelitian resistensi TB banyak dilakukan terutama resistensi terhadap lebih dari satu obat, disebut *multidrug resistance* (MDR) atau resistensi ganda. Data penelitian terhadap penderita TB di India menunjukkan resistensi terhadap isoniazid (60-70%), rifampisin (95%), INH-etionamid (10%), streptomisin (60%), fluoroquinolone (90%), pirazinamid (70-100%), dan etambutol (69%)( Zahner and Maas, 1992). Demikian juga hasil penelitian TB di beberapa wilayah di Indonesia menunjukkan jumlah penderita TB yang resisten terhadap streptomisin jauh lebih banyak daripada obat antituberkulosis lainnya. Hal ini menyebabkan sulitnya pengobatan penyakit TB secara tuntas.

Di Indonesia, penyakit TB masih merupakan masalah kesehatan dan diperkirakan sekitar 500.000 orang setiap tahunnya menderita penyakit tersebut. Menurut Survey Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) oleh Departemen Kesehatan, tahun 1992 TB merupakan penyebab kematian kedua di Indonesia (Ignatia dan Handojo, 1997 dalam Koendhori dan Harsono, 2007). Saat ini peningkatan kasus TB sejalan dengan peningkatan resistensi bakteri *M. tuberculosis* terhadap antibiotik, khususnya di negara berkembang termasuk Indonesia. Kegagalan program pengendalian penyakit tersebut disebabkan oleh kegagalan terapi karena adanya efek samping dan resistensi terhadap obat anti TB (Lina dkk., 2000).

Antibiotik merupakan obat pilihan untuk menanggulangi penyakit infeksi. Antibiotik 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 (Joke, 1999). Salah satu spesies penghasil antibiotik adalah *Streptomyces sp.* Menurut Hoopwood (1999) satu spesies *Streptomyces* dapat menghasilkan lebih dari 2-3 antibiotik yang diperoleh secara alami. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa hasil isolasi dari tanah rumah kompos Bratang Surabaya diperoleh 8 isolat *Streptomyces* tanah rumah kompos Bratang Surabaya. Berdasarkan uji aktivitas antibakteri ternyata 4 isolat *Streptomyces* tanah rumah kompos Bratang Surabaya mampu menghasilkan antibiotik yang dapat menghambat *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E.coli* ATCC 2593 dan *Candida albicans* (Isnaeni, 2010).

Berdasarkan pertimbangan-pertimbangan tersebut, maka penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui profil metabolit *Streptomyces* spp. isolat tanah rumah kompos Bratang Surabaya penghasil antibiotik sebagai anti *Mycobacterium tuberculosis*. Purifikasi,

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*



karakterisasi serta sekuensing gen 16S rRNA dilakukan untuk menentukan spesifikasi antibiotik yang mempengaruhi agen antibakteri (Pfister, *et al.*, 2003). Purifikasi, karakterisasi serta sekuensing gen 16S rRNA juga dilakukan untuk penentuan spesies dari isolat tanah rumah kompos Bratang Surabaya. Uji aktivitas antibakteri metabolit *Streptomyces* spp. isolat tanah rumah kompos Bratang Surabaya penghasil antibiotik terhadap bakteri uji *Mycobacterium tuberculosis* dilakukan untuk mendapatkan gambaran profil anti TB.

### Capaian Indikator Kinerja

Tahap	Aktivitas	Luaran	Capaian
I	Penapisan potensi antibakteri <i>Streptomyces</i> spp.	Data aktivitas <i>Streptomyces</i> spp. Isolat Tanah Rumah Kompos Bratang Surabaya dengan metode modifikasi difusi agar nutrisi	100%
II	Menetapkan <i>time course</i> fermentasi	Data awal aktivitas, lama aktivitas dan puncak aktivitas untuk masing-masing <i>Streptomyces</i> sp sebagai antimikroba	100%
III	Penapisan daya anti <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Data aktivitas anti tuberkulosis <i>Streptomyces</i> sp pada kondisi optimal anti mikroba (puncak aktivitas rata-rata)	100%
IV	Optimasi kondisi GC-MS untuk <i>profiling</i> metil ester asam lemak	Kromatogram GC-MS metil ester asam lemak hasil optimasi	100%
V	Menetapkan korelasi antara profil kromatogram dengan aktivitas <i>Streptomyces</i> spp.	Data korelasi antara profil asam lemak dalam sel dengan aktivitas anti TB sebagai senyawa marker berbasis kromatogram GC	100%
Rerata capaian aktivitas			100%
Penyusunan laporan kemajuan			100%
Belanja pengadaan (rinciana terlampir)			100%

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

## Tujuan Penelitian (Tahun I)

### Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil metabolit *Streptomyces* spp. isolat tanah rumah kompos Bratang Surabaya penghasil antibiotik sebagai anti *Mycobacterium tuberculosis*, sebagai pengembangan bahan baku terapi TB.

### Tujuan khusus

Secara khusus penelitian ini memiliki beberapa tujuan, antara lain :

1. Mendapatkan profil aktivitas metabolit *Streptomyces* spp isolat tanah rumah kompos Bratang Surabaya sebagai anti *Mycobacterium Tuberculosis*
2. Mendapatkan profil sekuen gen 16S rRNA *Streptomyces* spp penghasil antibiotik isolat tanah rumah kompos Bratang Surabaya.
3. Mendapatkan bahan bioaktivitas *Streptomyces* spp. isolat tanah rumah kompos Bratang Surabaya sebagai anti *Mycobacterium Tuberculosis*

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### *Streptomyces*

*Streptomyces* merupakan organisme tanah dengan sifat-sifat umum yang dimiliki oleh bakteri dan jamur yaitu *thread bacteria* (bakteri berhifa), digolongkan sebagai jenis bakteri berfilamen dengan diameter hifa 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  dan bersifat Gram positif.

*Streptomyces* bersifat aerob dan mempunyai dinding sel *diaminopimelic* (DAP). Tidak seperti 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).

*Streptomyces* merupakan mikroba yang paling efisien dalam menggunakan substrat. Sebagai organisme heterotrop, *Streptomyces* memerlukan bahan organik

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

bagi kelangsungan hidupnya. Isolasi anggota *Streptomyces* pada umumnya menggunakan temperatur inkubasi 28 - 30°C. *Streptomyces* sangat lamban tumbuh pada cawan agar. Koloni baru terlihat pada media pertumbuhan setelah 4-20 hari inkubasi, bahkan ada beberapa galur yang baru muncul setelah satu bulan atau lebih. Untuk mengisolasi *Streptomyces* digunakan media khusus yaitu media *International Streptomyces Project* (Suwandi, 1993).

### ***Mycobacterium Tuberculosis***

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 patogen untuk manusia di antaranya *Mycobacterium tuberculosis*. Kuman ini disebut juga basil dari Koch. Kuman ini amat penting, karena menyebabkan penyakit TB. 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 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).

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

## Tanah Kompos

Di dalam tanah hidup berbagai mikroorganisme yang melakukan kegiatan, sehingga menguntungkan bagi kehidupan makhluk hidup lain. Kompos merupakan hasil penguraian parsial dari campuran bahan-bahan organik yang dapat dipercepat secara *artificial* oleh populasi berbagai macam mikroba dalam kondisi lingkungan yang hangat, lembab dan aerob atau anaerob.

## Antibiotik

Antibiotik merupakan senyawa yang setelah mengalami absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi selektif ataupun efektif sanggup menghambat multiplikasi mikroba atau memamatkannya di berbagai daerah huni dalam organisme dan karena hanya sedikit 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).

Antibiotik 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 antrasiklin, (5) banyak metabolit sekunder yang diproduksi sebagai suatu kelompok dengan struktur hampir

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

sama, dan komposisinya dipengaruhi oleh medium serta kondisi pertumbuhan, dan (6) biosintesis metabolit sekunder dikontrol oleh mekanisme yang berbeda dengan kontrol dalam metabolit primer.

### TAHAPAN SASARAN, LUARAN DAN METODOLOGI

No.	Tahapan	Sasaran	Luaran	Metodologi
1	Tahap I (Tahun I) Penapisan potensi antibakteri <i>Streptomyces spp.</i>	Memperoleh informasi aktivitas antimikroba <i>Streptomyces spp.</i> Isolat Tanah Rumah Kompos Bratang Surabaya dengan metode difusi agar nutrien	Data aktivitas <i>Streptomyces spp.</i> Isolat Tanah Rumah Kompos Bratang Surabaya dengan metode difusi agar nutrien	Melakukan uji aktivitas <i>Streptomyces spp.</i> Isolat antimikroba (bakteri, jamur, virus) Tanah Rumah Kompos Bratang Surabaya dengan metode difusi agar nutrien
2	Tahap II (Tahun I) Menetapkan <i>time course</i> fermentasi	Memperoleh informasi <i>time course</i> yang menyatakan hubungan antara waktu fermentasi dengan aktivitas antibiotik yang dihasilkan oleh <i>Streptomyces spp.</i>	Data awal aktivitas, lama aktivitas dan puncak aktivitas untuk masing-masing <i>Streptomyces sp</i> sebagai antimikroba	Melakukan observasi pertumbuhan sel dan uji aktivitas antimikroba dengan cara difusi agar pada interval waktu tertentu (24jam) selama 14 hari
3	Tahap III (Tahun I) Penapisan daya anti <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Memperoleh informasi aktivitas anti tuberkulosis masing-masing <i>Streptomyces sp.</i> berdasarkan data <i>time course</i>	Data aktivitas anti tuberkulosis <i>Streptomyces sp</i> pada kondisi optimal (puncak aktivitas rata-rata)	Uji aktivitas anti <i>Mycobacterium tuberculosis</i> pada kondisi optimal berdasarkan data <i>time course</i>
4	Tahap IV (Tahun I) Optimasi kondisi GC-MS untuk <i>profiling</i> metil ester asam lemak	Memperoleh informasi kondisi optimal untuk analisis profil kromatogram GC-MS metil ester asam lemak <i>Streptomyces spp</i> yang memiliki aktivitas anti TB	Kromatogram GC-MS metil ester asam lemak hasil optimasi	Melakukan kromatografi gas-spektrometri massa dan spektrometri massa sel <i>Streptomyces spp.</i> yang aktif sebagai anti tuberkulosis setelah mendapat perlakuan metilasi asam lemak dalam sel
5	Tahap V (Tahun I) Menetapkan	Memperoleh informasi korelasi antara profil asam lemak dalam sel	Data korelasi antara profil asam lemak dalam sel dengan aktivitas	Melakukan analisis statistik multivariat untuk klasterifikasi komponen asam lemak

Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011

	korelasi antara profil kromatogram dengan aktivitas <i>Streptomyces spp.</i>	dengan aktivitas anti TB sebagai senyawa marker	anti TB sebagai senyawa marker	dan aktivitas berbasis data kromatogram GC-MS
6	Tahap VI (Tahun II) Penapisan daya anti viral	Memperoleh informasi aktivitas anti viral masing-masing <i>Streptomyces sp.</i> efektivitas berdasarkan data <i>time course</i>	Data aktivitas anti viral <i>Streptomyces sp</i> pada kondisi optimal (puncak aktivitas rata-rata)	Uji aktivitas anti viral pada kondisi optimal berdasarkan data <i>time course</i>
7	Tahap VII (Tahun II) Menetapkan korelasi antara profil kromatogram dengan aktivitas <i>Streptomyces spp.</i>	Memperoleh informasi korelasi antara profil asam lemak dalam sel dengan aktivitas anti viral sebagai senyawa marker	Data korelasi antara profil asam lemak dalam sel dengan aktivitas anti viral sebagai senyawa marker	Melakukan analisis statistik multivariat untuk mengklasterifikasi komponen asam lemak dan aktivitas berbasis data kromatogram GC-MS
8	Tahap IX (Tahun III) Validasi metode analisis/penapisan antimikroba berbasis metabolit profile dengan multivariat	Memperoleh parameter validasi metode analisis/penapisan antimikroba berbasis metabolit profil dengan multivariat	Data parameter validasi metode analisis/penapisan antimikroba berbasis metabolit profil dengan multivariat	Malakukan validasi metode analisis/ penapisan antimikroba berbasis metabolit profil dengan multivariat
9	Tahap X (Tahun III) Implementasi analisis potensi antimikroba <i>Streptomyces spp</i> dari sumber bahan alam berbasis metabolit (metil ester) profile	Memperoleh hasil analisis potensi antimikroba <i>Streptomyces spp</i> dari sumber bahan alam berbasis metabolit (metil ester) profile	Memperoleh hasil analisis potensi antimikroba <i>Streptomyces spp</i> dari sumber bahan alam berbasis metabolit (metil ester) profile	Memperoleh hasil analisis potensi antimikroba <i>Streptomyces spp</i> dari sumber bahan alam berbasis metabolit (metil ester) profile



### III. METODE PENELITIAN

#### Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksploratif dengan metode observasional dan pendekatan yang digunakan adalah Biologi Molekuler. Bertujuan untuk mengkaji profil metabolit *Streptomyces* spp. isolat Tanah Rumah Kompos Bratang Surabaya penghasil antibiotik sebagai *Mycobacterium tuberculosis*, sebagai pengembangan bahan baku terapi pada tuberkulosis.

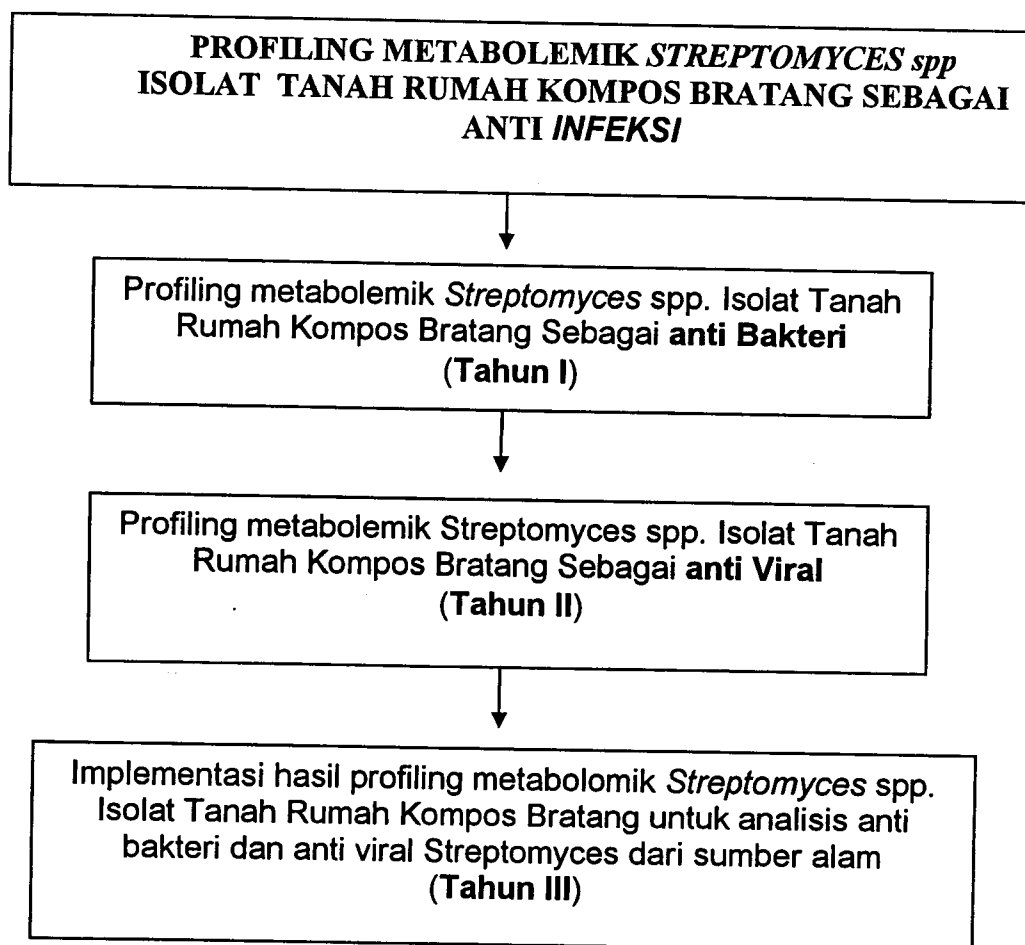
Pendekatan yang digunakan untuk mencapai tujuan penelitian ini meliputi tiga kajian atau tahap besar yaitu: 1) penapisan potensi antimikroba, dan menetapkan *time course* fermentasi antibiotik untuk mengetahui profil hubungan antara produksi biomassa dan aktivitas, 2) Puncak aktivitas yang dihasilkan digunakan sebagai landasan untuk uji aktivitas anti TB dengan bakteri uji *Mycobacterium tuberculosis*, karena hambatan masa inkubasi yang lama (lebih dari tiga minggu), 3) Karakterisasi dan identifikasi *Streptomyces* spp. isolat Tanah Rumah Kompos Bratang Surabaya penghasil antibiotik sebagai anti *Mycobacterium tuberculosis* berbasis biomolekuler (sekuensing gen 16S rRNA).

Uji aktivitas antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis* yang dilakukan dalam beberapa tahap penelitian sebagai berikut: 1) melakukan uji aktivitas *Streptomyces* spp. Isolat Tanah Rumah Kompos Bratang Surabaya dengan metode difusi agar, 2) fermentasi *Streptomyces* spp untuk mendapatkan metabolit sekunder khususnya antibiotik *Streptomyces* spp, 3) melakukan uji aktivitas metabolit hasil fermentasi terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan metode difusi agar, 4) karakterisasi dan deteksi biomolekuler *Streptomyces* spp., 5) Ekstraksi DNA dari *Streptomyces* spp, purifikasi dan karakterisasi metabolit *Streptomyces* spp. dengan elektroforesis (SDS-PAGE), 6) Sekuensing gen 16S rRNA *Streptomyces* spp. yang menunjukkan aktivitas anti *Mycobacterium tuberculosis*.

Rancangan analisis yang digunakan adalah observasional eksploratif, karena penelitian ini melakukan pengamatan untuk memperoleh suatu data berupa isolat *Streptomyces* spp. dan mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *M. Tuberculosis*. Perhitungan statistik digunakan untuk melakukan pengukuran terhadap isolat

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

dengan puncak dominandan dan/atau frekuensi penampilannya tinggi pada kromatogram kromatografi gas, dan menggunakan spektrofotometer massa untuk menentukan karakterisasi metabolit *Streptomyces* spp. berdasarkan berat molekul. Bagan penelitian secara keseluruhan tersaji pada Gambar 1 berikut.



Gambar 1. Bagan tahapan penelitian

### Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah isolat bakteri *M. Tuberculosis* H37Rv yang didapat dari Balai Besar Kesehatan Surabaya. *Streptomyces* spp (8) diperoleh dari hasil isolasi tanah Rumah Kompos Bratang Surabaya.

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

## Definisi operasional variabel

*Streptomyces* adalah isolat yang mampu menghasilkan antibiotik yang diperoleh dari tanah Rumah Kompos Bratang Surabaya melalui penapisan dengan metode difusi agar.

Profil aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp. adalah pola atau gambaran aktivitas *Streptomyces* sp. terhadap *M. Tuberculosis* dengan metode modifikasi difusi cetak agar, yang potensinya dinyatakan sebagai diameter (mm) zona hambatan.

Sekuen gen 16S rRNA *Streptomyces* sp. adalah susunan nukleotida gen 16S rRNA *Streptomyces* penghasil antibiotik pada 1500 bp yang diperoleh dari hasil sekuensing dengan metode terminator rantai/dideoksi ABI Prism 310 yang merupakan pengembangan dari metode Sanger. Analisis sekuen DNA berdasarkan urutan polipeptida sekuen DNA yang kemudian dibandingkan dengan bank data dari sekuen lain dan dibuat diagram pohon filogenetik dengan menggunakan program *Sci Ed Central, Clone Manager Profesional Suite, Scientific and Educational Software* 1994-2000.

Jenis antibiotik adalah antibiotik yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. melalui gen pengkode yang terletak pada sekuen gen 16 S rRNA.

## Prosedur Penelitian

### Karakterisasi *Streptomyces* spp

Karakterisasi *Streptomyces* spp. dilakukan dengan pengamatan morfologi, secara makroskopis dan mikroskopis. Karakteristik berdasarkan sekuensing 16 S rRNA juga dilakukan terutama untuk spesies yang menunjukkan aktivitas.

### Uji aktivitas antibakteri dengan difusi agar nutrient

#### Penyiapan *Streptomyces* sp.

*Streptomyces* sp. dibiakkan kembali dengan cara mengambil 1 ose biakan *Streptomyces* sp. dari kultur persediaan dalam media agar miring, dipindahkan ke

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

dalam tabung berisi 6 mL media ISP-4 agar miring dengan metode *streak*, kemudian inkubasi pada suhu 28°C selama 5 hari.

*Aquadest* atau larutan salin 0,9% ditambahkan pada biakan *Streptomyces* sp. tersebut sebanyak 2 mL selanjutnya dikocok dengan vortex sampai biakan terlepas dari agar, dihomogenkan, kemudian diambil 1 mL, dimasukkan dalam tabung steril dan dibandingkan kekeruhannya dengan standar 1,0 McFarland, sehingga jumlah koloni bakteri *Streptomyces* sp. setara dengan  $3 \times 10^8$  sel/mL. Diambil 0,1 mL suspensi *Streptomyces* sp. yang telah setara dengan standar 1,0 McFarland tersebut, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri berisi 20 mL media ISP-4 Agar yang telah dicairkan pada suhu 50°C, selanjutnya dihomogenkan, dibiarkan memadat, dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 6 hari (Alexander and Strete, 2001).

#### Penyiapan Inokulum Bakteri Uji

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

Diambil 0,5 mL biakan *M. tuberculosis* H37Rv yang dalam media *Middle Brook 7H9 broth*, kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 4,5 mL media *Middle Brook 7H9 broth*. Suspensi 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 di tengah cawan petri yang telah berisi 20 mL media *Middle Brook 7H10 Agar*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C, selama 3-5 minggu (Isenberg, 1992).

#### Metode Difusi Modifikasi Cetak Agar

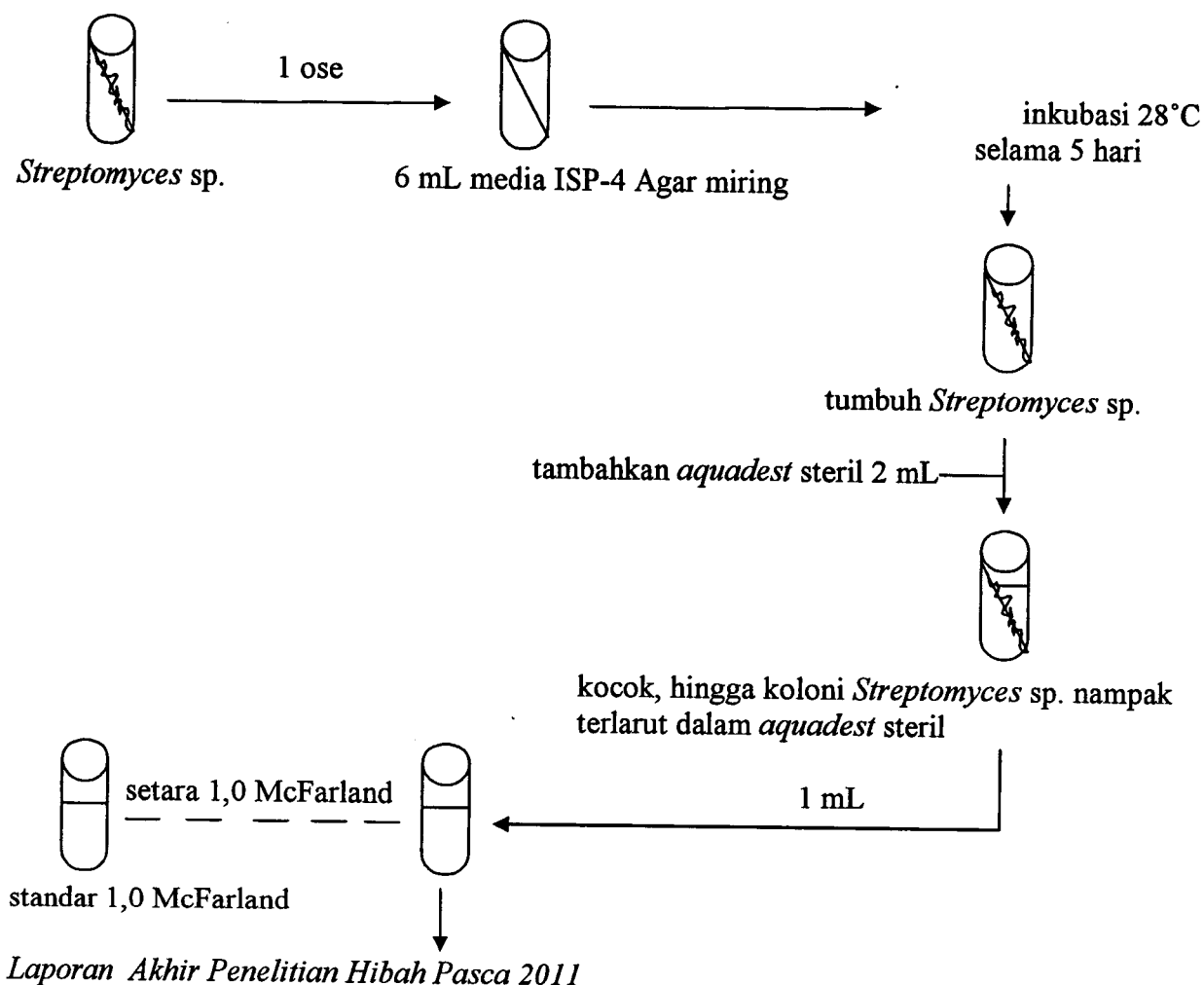
*Streptomyces* sp. pada media ISP-4 agar yang telah berumur 6 hari dicetak dengan diameter 0,8 cm dan tinggi 3 mm, kemudian diletakkan di atas permukaan

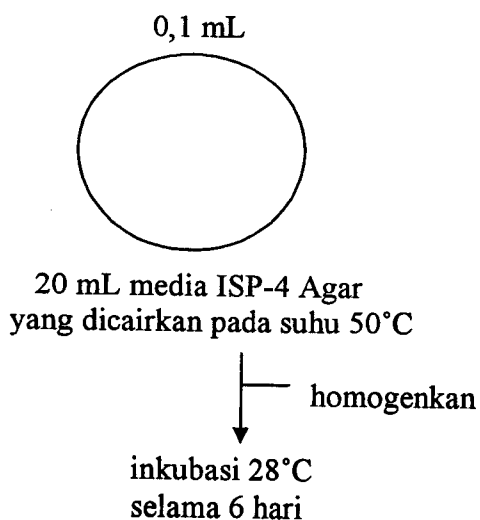
*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

media yang telah diinokulasi dengan bakteri uji *M.tuberculosis* H37Rv (rumur 15 hari), selanjutnya diinkubasikan kembali pada suhu 37°C selama 1-3 minggu.

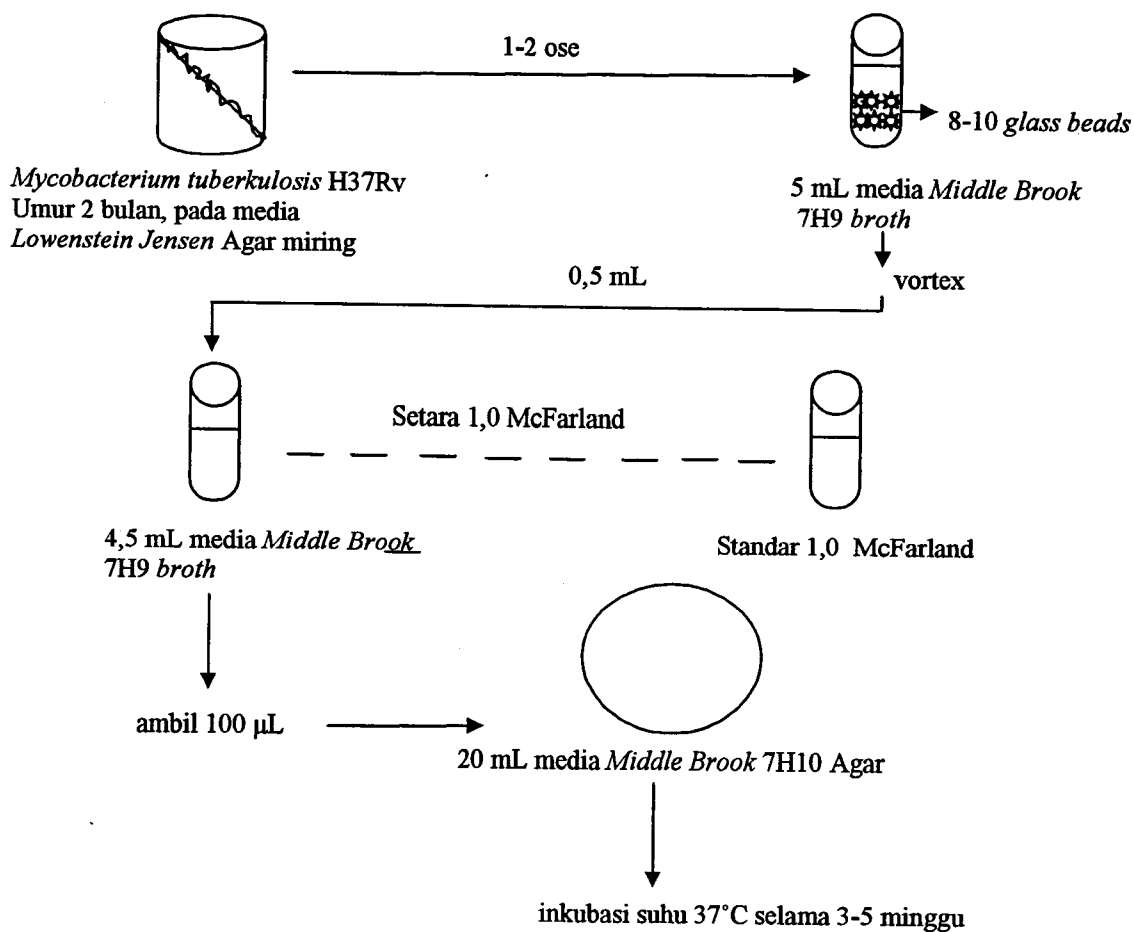
Pengamatan dilakukan pada hari ke-16 sampai hari ke-35 dengan tujuan melihat kemampuan *Streptomyces* sp. dalam menghasilkan antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji *M.tuberculosis* H37Rv. Pada tahun pertama, sampai dengan laporan ini ditulis, pengamatan aktivitas dilakukan terhadap hasil fermentasi umur empat hari, berdasarkan hasil konfirmasi data *time course* fermentasi menggunakan bakteri dan jamur, karena waktu inkubasi *M. tuberculosis* yang panjang (3 minggu).

Hasil positif ditandai dengan zona jernih yang dihasilkan di sekitar koloni *Streptomyces* sp. disekitar koloni bakteri uji dalam media cetak agar pada cawan petri yang berarti bahwa isolat *Streptomyces* sp. mampu menghasilkan antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji *M. tuberculosis* H37Rv.





Gambar 1. Skema Penyiapan *Streptomyces* sp.



Gambar 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).

### Isolasi DNA *Streptomyces* sp. (Ausubel et al., 1995)

Diambil 1 Öse biakan *Streptomyces* sp. dari agar miring dan dipindahkan pada media ISP-4 cair 10 mL, kemudian dikocok menggunakan *Shaker* dengan kecepatan 150 rpm (*Rotation per minute*) pada suhu 30°C selama 2-4 hari. Kemudian diambil 2,5 mL dengan mikropipet dan dipindahkan pada 25 mL media ISP-4 cair, kemudian dikocok dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 30°C selama 2 hari. Setelah 6 jam diambil 3 mL sampel dan disentrifugasi pada 6.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci sebanyak dua kali dengan dapar fosfat pH 7 pada 6.000 rpm selama 10 menit. Ditambahkan 50 mL dapar fosfat pH 7 pada sel yang telah tercuci tersebut.

Isolasi DNA *Streptomyces* sp. dilakukan dengan menggunakan kit Qiagen. Sebanyak 1 mL suspensi sel *Streptomyces* sp. dimasukkan ke dalam *cell suspension solution* kit dengan volume akhir 1,85 mL dan dihomogenkan. Ditambahkan sebanyak 50 µL *RNase mix kit* dan dicampur dengan cara dipipet dengan hati-hati, kemudian ditambahkan 100 µL *cell lysis kit* dan diinversi 2-5 kali. Campuran diinkubasikan pada suhu 55°C selama 15 menit, ditambah 25 µL *protease mix* dan dicampur merata, selanjutnya diinkubasi pada suhu 55°C selama 30-120 menit, ditambah 500 µL *salt-out mixture kit*, didinginkan selama 10 menit pada suhu

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

4°C dan dimikrosentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Secara hati-hati pelet dibuang, kemudian supernatan dimasukkan pada tabung konikal steril 15 mL, ditambah 2 mL dapar TE dan 8 mL etanol absolut. Campuran pada tabung diinversi sampai terlihat benang halus DNA, disentrifugasikan pada 10.000 rpm selama 2 menit dan etanol dibuang dengan hati-hati. Tabung dikeringkan pada konsentrator, atau dibalikkan pada *tissue* bersih selama 10-15 menit, kemudian DNA genom dilarutkan dalam TE (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA). Selanjutnya DNA disimpan pada suhu 2-8°C. Sebelum digunakan jika pada cairan stok terdapat endapan, maka dipanaskan pada suhu 60°C agar larut.

#### **Amplifikasi PCR 16S rRNA *Streptomyces* sp. (Ausubel et al., 1995)**

Primer yang digunakan adalah Sigma Proligo dengan urutan :

*forward* pA 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

dan *reverse* pH 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' (Davelos, A.L., et al., (2004)

Amplifikasi dilakukan dengan campuran *reagen* sebagai berikut : 25 µL *master mix kit*, primer *forward* 2 µL, primer *reverse* 2 µL, *destilated water* 11 µL, DNA 10 µL sehingga didapatkan total reaksi 50 µL. Denaturasi awal 95°C selama 5 menit. Melakukan amplifikasi sebanyak 35 daur : denaturasi 95°C selama 1 menit, *annealing* 60°C selama 1 menit, *elongasi* 72°C selama 1 menit. Pada putaran yang ke 35 *post elongasi* 72°C selama 10 menit.

Digunakan sebagai kontrol positif adalah DNA dari *Streptomyces griseus* ATCC 10971 dan kontrol negatif adalah tanpa menggunakan DNA.

#### **Elektroforesis Produk PCR (Ausubel et al., 1995)**

Dilarutkan 0,4 Gram agarose (Gibco BRL, no. cat 15510-019) dalam 20 mL TBE 0,5X untuk mendapatkan gel agarose 2%. Larutan agarose dipanaskan sampai mendidih dan cetakan disiapkan. Sisir elektroforesis ditempatkan untuk membentuk sumur gel. Setelah mendidih, larutan agarose didiadakan sampai suhu 60°C kemudian ditambah 0,5 µL/mL larutan EtBr (*ethidium bromide*). Larutan agarose dituang ke cetakan dan dibiarkan hingga membeku. Setelah membeku, penutup cetakan dan sisirnya diangkat. Cetakan ditempatkan pada elektroforesis yang telah berisi dapar TBE 0,5X. Delapan µL larutan produk PCR dimasukkan dan ditambah

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

2  $\mu$ L dapar *loading* ke dalam sumur elektroforesis. DNA *marker* juga dimasukkan ke dalam salah satu sumur. Elektroforesis dijalankan pada 100 V selama 20 menit dan hasil elektroforesis dilihat dibawah sinar UV dan difoto.

### **Purifikasi DNA (Ausubel et al., 1995)**

Produk PCR dipurifikasi dengan *QIA quick PCR Purification Kit*. Ditambahkan ET-OH 96% pada dapar PE. Ditambahkan dapar PB (5 X volume) ke dalam hasil produk PCR. Sampel diletakkan pada *QIA Quick spin column* (2 mL *colect tube*) dan disentrifugasi selama 30-60 detik (untuk mengikat DNA). Setelah *flow through* dibuang, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan maksimal 15.000 rpm selama 1 menit. Bagian atas diambil, dipindah ke tabung 1,5 mL steril dan ditambah dapar EB pada bagian sentral membran, dibiarkan selama 1 menit kemudian disentrifugasi selama 1 menit.

### **Sekuensing DNA**

*Template* untuk sekuensing adalah DNA produk PCR yang telah dimurnikan. Sekuensing dilakukan dengan metode Sanger yaitu terminator rantai/dideoksi menggunakan sekuenser *ABI Prism 310*. Dilakukan pelabelan dengan *big dye*. Volume yang digunakan adalah 150  $\mu$ L dengan konsentrasi 200 ng/mL. Untuk pembacaan hasil, sampel *diloading* dalam semua sumuran pada mesin *Sequencer ABI Prism 310* dengan volume 1,5  $\mu$ L. Hasil sekuensing dapat dilihat dalam beberapa jam melalui monitor dalam bentuk grafik alogram dan hasilnya dapat dicetak. Untuk analisis sekuen DNA dilakukan dengan menggunakan *software computer Genetic Mac Version 8,0*.

## **IV. HASIL DAN PEMBAHASAN**

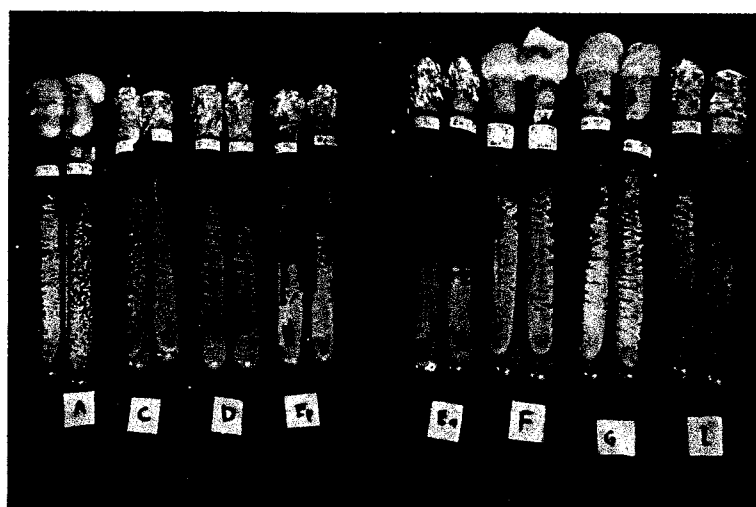
### **4.1. Penapisan potensi antibakteri *Streptomyces spp.***

Tahap ini dilakukan untuk mengetahui potensi antimikroba *Streptomyces spp.* secara keseluruhan, sehingga dapat diketahui *trend* awal, lama (durasi) dan puncak aktivitas. Profil aktivitas juga dapat memberikan informasi, apakah *Streptomyces spp.* menghasilkan satu atau beberapa jenis senyawa antimikroba berdasarkan data *time course*. Sebagai mikroba uji digunakan bakteri termasuk *Mycobacterium*

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

*tuberculosis*, jamur, dan virus. Mengingat masa inkubasi *M. tuberculosis* cukup lama (21 hari), maka untuk mengetahui *time course* (alur fermentasi *Streptomyces* spp sebagai anti *Mycobacterium tuberculosis*) belum dilakukan sampai saat laporan disusun. Penapisan hanya didasarkan pada *trend* anti mikroba pada umumnya.

Gambar 4.1. menyajikan tampilan biakan *Streptomyces* spp. pada media ISP-4 yang digunakan dalam penelitian ini. Secara umum warna ke-8 koloni putih, beberapa berwarna abu-abu, bentuknya liat seperti kulit, sehingga sulit dilepas dari media agar.



Gambar 4.1. Biakan *Streptomyces* spp. pada medium agar ISP-4

Masing-masing spesies diuji aktivitasnya menggunakan bakteri uji yang mewakili Gram positif, Gram negatif, dan jamur, menghasilkan data tersaji pada Tabel 4.1 dan Gambar 4.2.

Tabel 4.1a. Hasil pengamatan aktivitas *Streptomyces* spp. terhadap bakteri uji setelah 48 jam

Mikroba	Rep.	<i>Streptomyces</i> sp.							
		A	F	G	I	D	C	Ea	Ep
<i>Escherichia Coli</i>	1	11.4	13.4	11.1	0	0	0	0	0
	2	12.9	12.3	13.96	0	0	0	0	0
<i>Salmonella thiphymurium</i>	1	10.6	9.5	10.6	0	0	8.1	0	0
	2	9.9	11.4	9.2	0	0	6.4	0	0
<i>Salmonella</i> sp.	1	14.0	14.6	14.9	7.1	8.7	0	0	0
	2	13.1	13.8	15.5	6.1	5.8	0	0	0
<i>Basilus</i> sp.1	1	9.3	10.7	10.1	7.2	0	0	0	0
	2	10.7	10.7	10.7	8.4	0	0	0	0

Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011

<i>Basillus sp.2</i>	1	11.9	12.8	9.4	5.5	6.1	0	0	0
	2	10.1	11.2	12.2	7.1	6.7	0	0	0
<i>Basillus subtilis</i>	1	12.7	11.1	9.8	0	0	0	0	0
	2	11	11.7	10.7	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	10.7	11.6	10.5	5.2	5.5	0	0	0
	2	12.7	10.4	11.6	4.2	5.2	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	9.6	10	8.3	5.3	7.1	0	0	0
	2	9.2	9.4	9.4	5.9	5.4	0	0	0
<i>Candida albicans</i>	1	14.7	13.9	12.4	6.1	7.6	0	0	0
	2	11.7	13.1	12.1	7.9	6.1	0	0	0

Tabel 4.1b. Hasil pengamatan aktivitas *Streptomyces* spp. terhadap bakteri uji setelah 72 jam

Mikroba	Rep.	<i>Streptomyces</i> sp.							
		A	F	G	I	D	C	Ea	Ep
<i>Escherichia Coli</i>	1	13.7	10.9	0	0	0	0	0	0
	2	10.7	12.1	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella thiphymurium</i>	1	11.1	12.2	10.1	0	0	8.1	0	0
	2	11.3	10.6	10.9	0	0	6.4	0	0
<i>Salmonella sp.</i>	1	16.2	9.7	10.3	0	8.7	0	0	0
	2	13.5	8.9	9.2	0	5.8	0	0	0
<i>Basillus sp.1</i>	1	11.3	11.4	10.1	0	0	0	0	0
	2	11.1	11.1	10.1	0	0	0	0	0
<i>Basillus sp.2</i>	1	12.3	13.4	11.5	0	6.1	0	0	0
	2	13.1	13.5	0	0	6.7	0	0	0
<i>Basillus subtilis</i>	1	11.9	12.9	11.1	0	0	0	0	0
	2	11.8	12.5	10.4	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	10.9	9.8	9.4	0	5.5	0	0	0
	2	9.3	10.9	9.9	0	5.2	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	13.7	14.8	12	0	7.1	0	0	0
	2	13.6	12.3	12	0	5.4	0	9.1	0
<i>Candida albicans</i>	1	13.5	14.7	14.8	9.3	7.6	0	7.8	0
	2	13.4	12.3	13.4	8.9	6.1	0	5.2	0

Dari Tabel 4.1 tampak bahwa pada hari ke-4 beberapa spesies menunjukkan aktivitas terhadap semua bakteri dan jamur uji (A, F, dan G), sedangkan spesies lain menunjukkan aktivitas hanya terhadap jamur (Ea). Perbedaan aktivitas ini akan dipetakan pada kromatogram metil ester asam lemak dengan kromatografi gas, sehingga apabila dilakukan scanning dengan spektrometri massa dan berdasarkan data dalam *library* akan dapat

Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011

diketahui korelasi antara aktivitas dengan komponen atau komposisi asam lemak.

Berdasarkan sebaran data waktu retensi, jumlah dan intensitas puncak pada kromatogram dalam Tabel 4.3 menunjukkan bahwa untuk semua spesies yang memberikan aktivitas anti mikroba baik bakteri maupun jamur dan virus memberikan puncak pada waktu retensi 14,9; 34,5; 35,6 menit, sedangkan. Untuk memvalidasi hasil pengamatan dengan GC-MS perlu dilakukan analisis statistik menggunakan analisis multivariat.

#### 4.2. Menetapkan *time course* fermentasi

Profil *time course* masing-masing spesies yang menunjukkan aktivitas positif menghambat pertumbuhan mikroba uji (isolat A, F, G, dan I) ditetapkan dengan cara mencari korelasi antara waktu fermentasi dengan aktivitas atau daya hambat terhadap bakteri uji. Tabel 4.2 menyajikan hasil pengamatan *time course* *Streptomyces* spp. dengan 10 macam mikroba uji yang terdiri dari bakteri dan jamur. Gambar 4.3 menggambarkan potensi dan aktivitas *Streptomyces* spp. yang variatif dan spesifik tergantung spesies.

Tabel 4.2a. Hasil pengamatan *time course* fermentasi antimikroba *Streptomyces* spp.

Mikroba Uji		2 Jam	1 Hari	2 Hari	3 Hari	4 Hari	5 Hari	6 Hari	7 Hari
<i>Candida albicans</i>	A1	10.4	11.4	16.1		20.5	17.2	13.3	15
	A2	8.6	12.7	16.2		17.2	17.6	13.1	12.4
	F1	11.2	12.5	15.9		15.6	14.6	12.6	15.9
	F2	11.6	10.4	14.1		16.3	13.7	12.9	17.7
	G1	11.5	13.4	15.4		15.3	14.6	13.6	16.2
	G2	12.6	12.3	13.1		14.6	13.5	11.6	20.7
	Kandistatin	11.1	13.1	13.4		13.2	10.5	9.1	12.7

<i>Escherichia Coli</i>	A1	8.3	14.1	14.9		19.5	14.7	16.1	1535
	A2	8.1	11.4	13.3		20.6	15.9	14.9	13.7
	F1	10.5	12.1	16.5		11.9	13.7	14.9	13.2
	F2	10.9	12.1	14.3		13.9	13.3	11.5	13.8
	G1	10.7	12.4	21.8		16.6	15.3	15.7	15.9
	G2	10.5	11.1	21.2		15.1	14.4	13.9	15.5
	Sreptomisin	15.8	18.6	27.4		20.1	17.2	18.3	16.1

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A1	10.8	11.8	16.9		18.1	12.2	13.6	17.8
	A2	12.9	10.7	17.5		18.2	14.6	15.8	17.2
	F1	9.2	11.4	15.5		13.6	14.9	12.1	14.4
	F2	10.1	11.9	16		12.2	13.5	10.5	16.1
	G1	9.4	12.9	19.6		16.3	13.4	12.4	14.6

Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011



	G2	10	11.8	17.2		15.3	13.9	14.3	14.4
	Sreptomisin	15.1	16.8	18.9		15.2	15.7	15.9	15.5

<b>Basilus SP</b>	A1	8.9	10.3	17.3		15.2	14.8	15.8	13.7
	A2	7.1	10.6	14.6		18.9	15.1	14.9	14.2
	F1	8.9	10.2	13.1		13.2	13.1	14.9	11.2
	F2	7.2	10.2	13.4		13.3	14.9	14.9	10.2
	G1	8.3	12.2	15.1		13.7	14.5	12.1	12.5
	G2	9.8	9.3	17.6		16.3	14.8	13.1	12.3
	Sreptomisin	16.2	16.9	15.9		16.4	12.2	14.8	13.3

<b>S Aureus</b>	A1	9.5	11.6	15.9		16.2	15.3	14.8	14.9
	A2	8.5	11.3	15.7		15.1	14.1	13.1	13.4
	F1	7.2	11.1	14.9		14.1	12.8	11.4	12.6
	F2	8.5	12.7	15.3		15.7	12.3	12.9	13.7
	G1	8.4	11.8	19.1		14.7	13.4	13.2	13.7
	G2	9.9	11.4	20.8		14.2	14.3	13.2	11.4
	Sreptomisin	17.9	17.6	20.2		15.7	13.8	14.5	15.7

<b>Salmonella typhimurium</b>	A1	8.1	12.5	16.5		16.5	13.4	13.4	15.8
	A2	9.5	11.2	16.3		17.1	12.2	13.1	16.5
	F1	8.5	11.4	14.2		12.6	13.4	14.2	12.1
	F2	8.3	13.6	15.1		13.3	13.1	13.8	11.6
	G1	9.5	11.3	18.1		14.4	13.9	14.1	14.2
	G2	8.9	11.8	17.9		16.2	14.7	12.4	16.9
	Sreptomisin	16.9	14.9	16.1		13.2	20.6	13.9	14.2

<b>Basilus Subtilis</b>	A1	0	13.5	17.2		18.8	21.1	18.2	18.3
	A2	0	11.1	17.9		19.2	21.4	18.6	17.8
	F1	0	12.7	19.2		15.1	17.4	14.2	16.6
	F2	0	12.3	17.4		16.2	17.8	15.4	18.1
	G1	0	13.6	21.4		21.1	21.8	16.6	16.2
	G2	0	11.7	23.4		17.9	20.9	17.6	16.8
	Sreptomisin	25.3	23.7	22.9		23.5	17.7	19.7	20.6

<b>Salmonella Sp</b>	A1	9.7	12.1	18.7		16.4	15.5	15.9	15.6
	A2	9.3	11.1	17.6		19.5	15.6	14.4	16.9
	F1	10.6	13.2	16.5		15.5	13.9	12.7	13.3
	F2	9.2	13.9	16.9		14.8	12.4	13.1	14.2
	G1	10.2	15.9	18.1		18.1	15.9	13.1	15.7
	G2	10.6	12.4	18.1		18.2	14.4	15.7	14.7

Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011

	Sreptomisin	18.5	17.5	24.4		15.6	17.1	19.6	17.5
--	-------------	------	------	------	--	------	------	------	------

<b><i>Basilus Spisize</i></b>	A1	0	10.6	17.9		16.3	13.4	169.8	14.3
	A2	0	11.2	18.6		16.2	14.9	13.8	15.7
	F1	0	10.8	19.1		15.8	12.9	11.4	12.4
	F2	0	9.5	17.9		14.8	13.9	11.6	13.9
	G1	0	12.1	23.8		16.1	14.9	12.5	14.3
	G2	0	13.7	28.4		15.9	14.7	13.9	13.1
	Sreptomisin	27.5	25.6	23.1		18.6	14.8	15.2	19.3



Tabel 4.2b. Hasil pengamatan time course fermentasi antimikroba *Streptomyces* spp. (...lanjutan)

Mikroba Uji		8 Hari	9 Hari	10 Hari	11 Hari	12 Hari	13 Hari	14 Hari
<b>Candida</b>	A1	17.75	19.1	11.4	22.1	14.2	14.2	14.9
	A2	16.23	21	10.3	21.1	14.5	15.5	14.5
	F1	17.63	20.3	9.5	16.1	12.1	14.6	13.1
	F2	15.3	20.2	12.9	17.1	12.9	14.8	13.4
	G1	15.5	17.7	13.1	14.9	12.9	12.9	14.5
	G2	15.7	14.8	13.9	15.1	12.9	11.7	14.2
	Kandistatin	12.72	16.9	9.6	8.9	12.6	14.3	15.7
<b>E. Coli</b>	A1	16.22	19.6	15.3	14.4	16.2	17.9	17.3
	A2	16.1	19.4	14.2	16.3	16.2	17.4	18.9
	F1	14.7	13.3	13.9	12.9	12.2	12.7	15.7
	F2	13.7	17	13.6	12.1	12.6	12.5	16.2
	G1	15.1	19.7	13.1	14.7	14.2	16.8	17.3
	G2	15.2	21.4	14.9	12.1	14.5	15.3	15.9
	Sreptomisin	17.9	18.2	13.9	14.7	14.3	18.7	17.4
<b>P Aeruginosa</b>	A1	16.1	14.6	18.2	20.5	19.1	20.2	13.9
	A2	15.5	11.3	17.9	21.4	20.3	20.9	13.7
	F1	13.5	11.6	11.4	15.5	12.3	14.2	12.8
	F2	13.8	10.1	20.7	14.1	13.5	13.2	10.3
	G1	14.6	13.1	19.1	14.3	19.1	19.9	12.3
	G2	15.7	14.6	13.1	13.5	18.7	19.6	12.9
	Sreptomisin	15.5	15.3	17.3	22.1	16.1	16.3	15.3
<b>Basilus SP</b>	A1	15.6	10.3	14.2	15.5	12.8	13.4	13.6
	A2	17.7	10.7	14.7	14.8	12.7	12.3	12.5
	F1	13.1	16.9	13.2	12.1	13.4	12	12.6
	F2	12.4	15.8	13.1	11.6	12.2	11.5	11.3
	G1	17.8	17.2	13.8	13.8	13.5	13.2	12.3
	G2	14.1	17.7	13.1	13.7	12.2	14.5	12.7
	Sreptomisin	16.7	15.7	13.1	15.6	12.6	11.7	17.5
<b>S Aureus</b>	A1	15.2	12.1	13.4	16.5	12.4	11.1	14.4
	A2	16.8	13.1	13.2	16.3	11.2	12.4	18.7
	F1	15.7	20.6	11.4	13.8	11.1	11.9	12.4
	F2	13.4	17.3	12.2	14.9	11.9	12.9	14.4
	G1	12.4	20.3	13.9	14.3	11.2	12.4	13.6
	G2	15.6	21	11.6	14.5	11.9	11.8	14

Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011

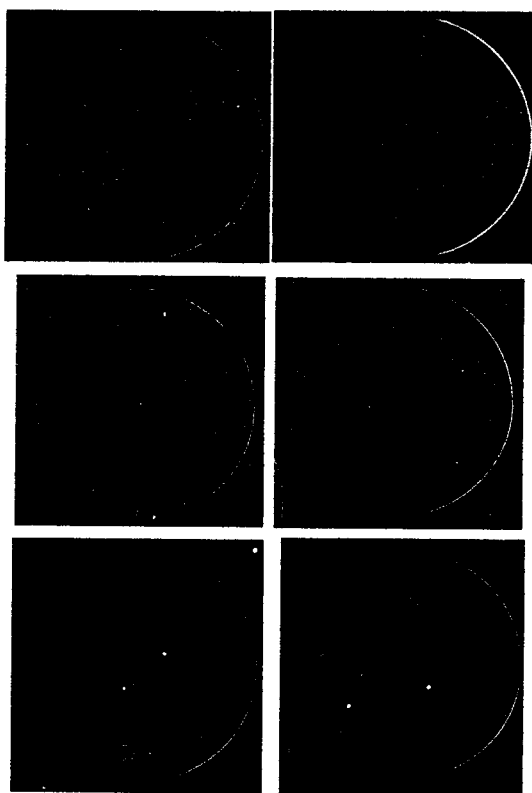
	Sreptomisin	16.4	17.3	13.1	17.5	16	16.4	18.4
--	-------------	------	------	------	------	----	------	------

<b>Salmonella tpymurium</b>	A1	15.2	15.8	16.2	18.1	16.4	18	13
	A2	16.1	15.4	14.4	18.5	15.3	18.6	13.3
	F1	14.8	13.8	12.9	14.6	10.6	14.7	11.2
	F2	12.8	12.1	13.4	14.7	10.9	13.2	12.9
	G1	14.8	15.9	13.9	13.3	15.9	16.2	13.4
	G2	15.8	15	13.9	11.6	13.6	17.5	12.6
	Sreptomisin	16.3	13.1	15.4	15.4	13.6	14.4	14.6

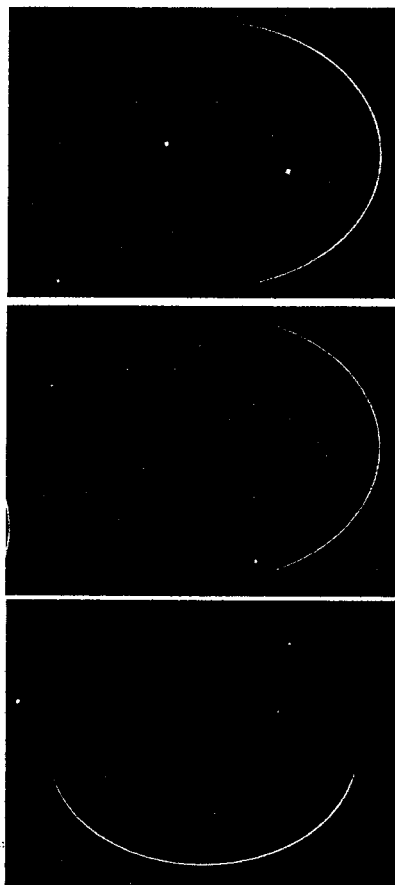
<b>Basilus Subtilis</b>	A1	17.1	14.6	17.5	18.4	19.3	15.5	15
	A2	19.6	14.8	21.1	20.3	18.6	18	16.1
	F1	15.4	11	17.9	17.5	15.1	13.2	12.5
	F2	14.9	11.3	16.6	17.3	14.5	12.7	13.5
	G1	18.7	10.4	16.1	18.2	17.9	16.2	13.5
	G2	16.8	12.2	14.1	18.1	14.6	14	14.4
	Sreptomisin	20.5	20.2	18.5	21.3	18.8	16.8	19.2

<b>Salmonella Sp</b>	A1	16.3	15.4	15.5	21.9	18.6	18	14.7
	A2	15.2	16.1	16.7	22.6	20.9	19.2	15.8
	F1	13.5	13.2	13.6	15.7	11.6	10.8	12.2
	F2	13.1	13.1	14.6	16.1	11.7	10.5	11.1
	G1	14.8	15.4	14.7	20.4	16	15.5	13
	G2	15.5	14.5	14.5	19.9	18	14.6	14.8
	Sreptomisin	16.4	19.4	12.3	16.8	13.6	16.3	15

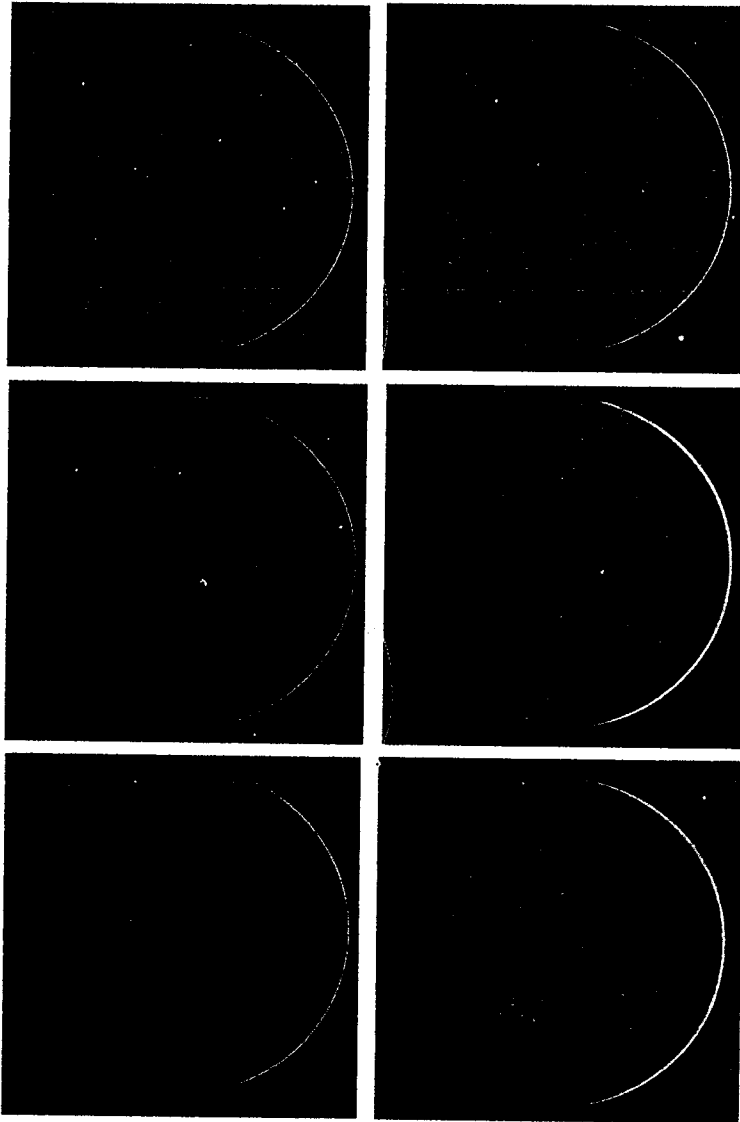
<b>Basilus Spisize</b>	A1	13.5	20.1	15.9	17.8	17.2	16.2	15.4
	A2	14.5	22.9	14.4	18.9	17	18.8	14.4
	F1	12.8	14.9	12.8	13.1	13.1	13.6	12.9
	F2	12.3	16.1	12.5	13.1	12.3	13.3	11.4
	G1	13.2	19.2	13.3	14.4	15.8	14.4	14
	G2	12.3	21.1	14.3	14.4	15.7	15	14.9
	Sreptomisin	17.1	18.9	19.9	22.4	20.4	19.9	18.1



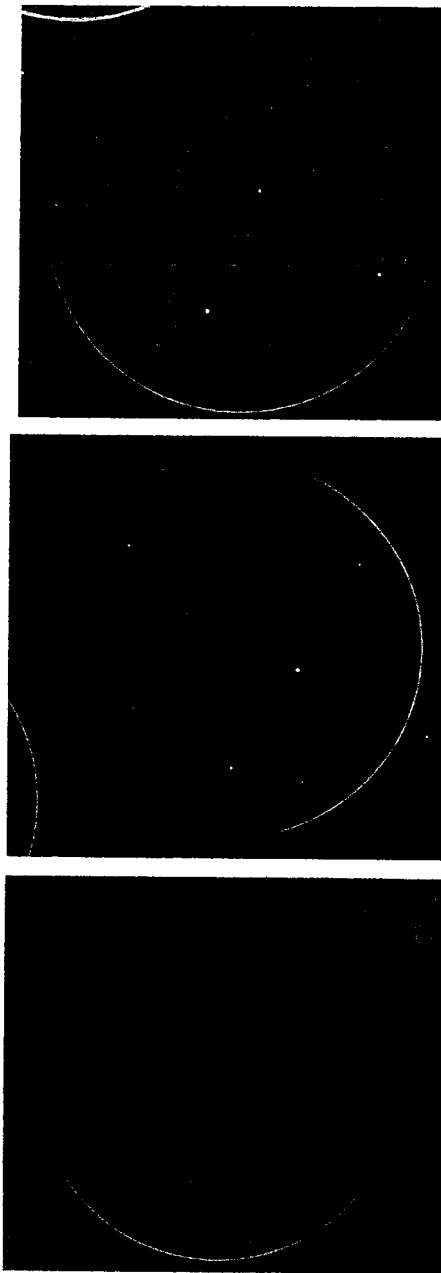
Gambar 4.2a. Hasil penapisan daya antimikroba *Streptomyces* spp. pada umur 24 jam dengan modifikasi cetak agar



Gambar 4.2b. Hasil pcnapisan daya antimikroba *Streptomyces* spp. pada umur 48 jam dengan modifikasi cetak agar

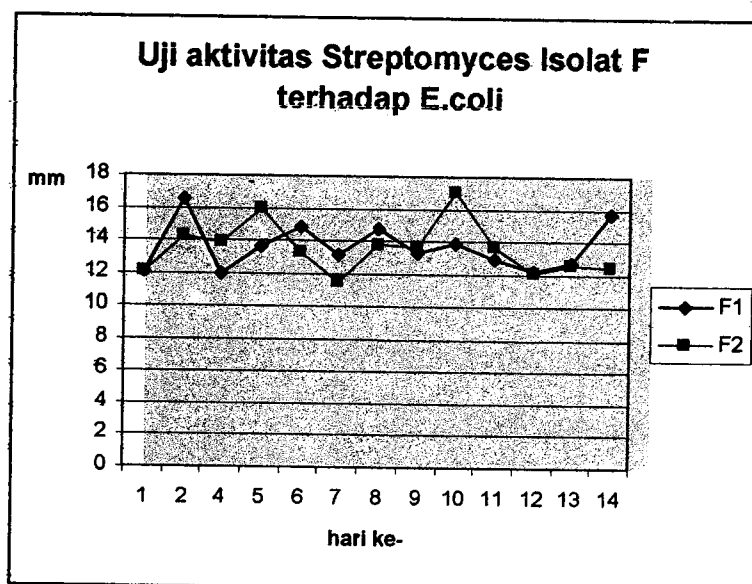
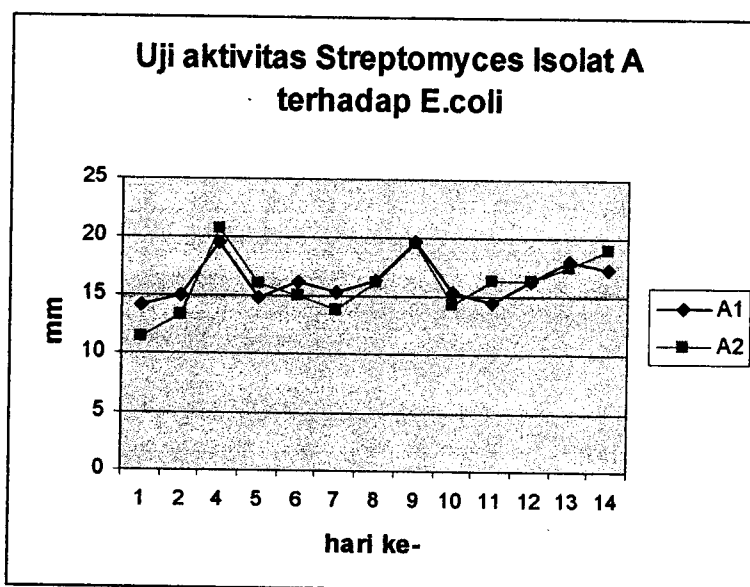


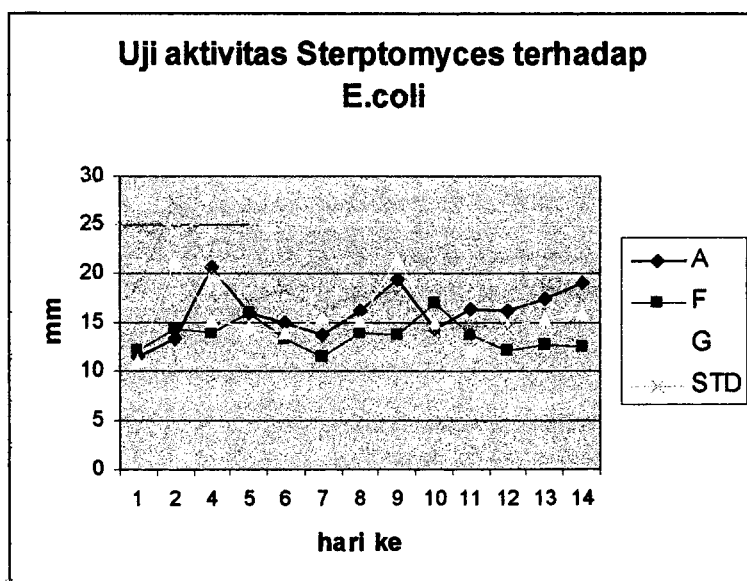
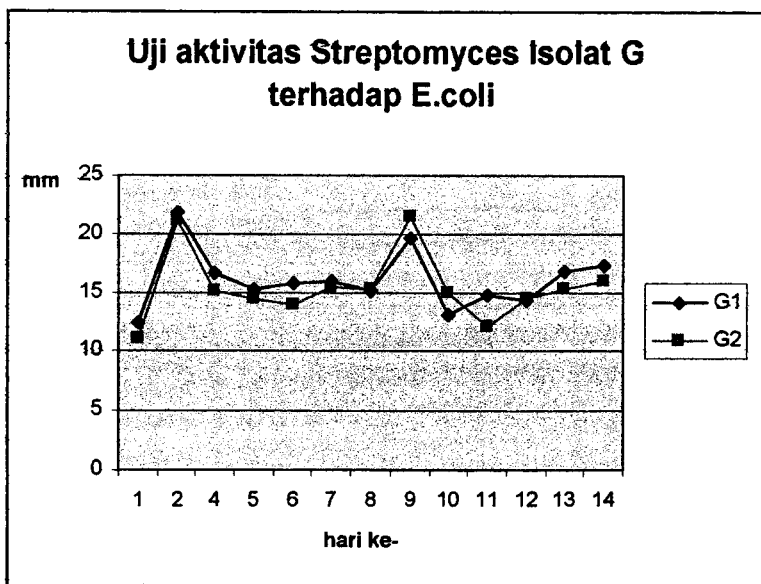
Gambar 4.2c. Hasil penapisan daya antimikroba *Streptomyces* spp. pada umur 72 jam dengan modifikasi cetak agar



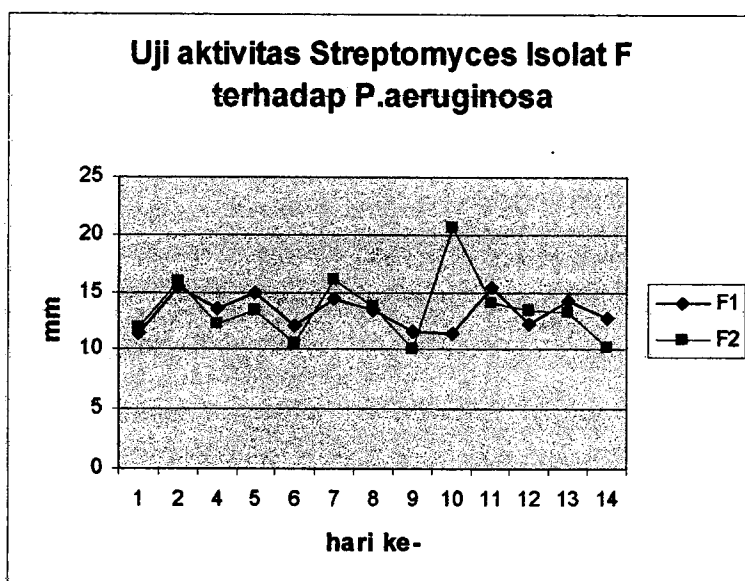
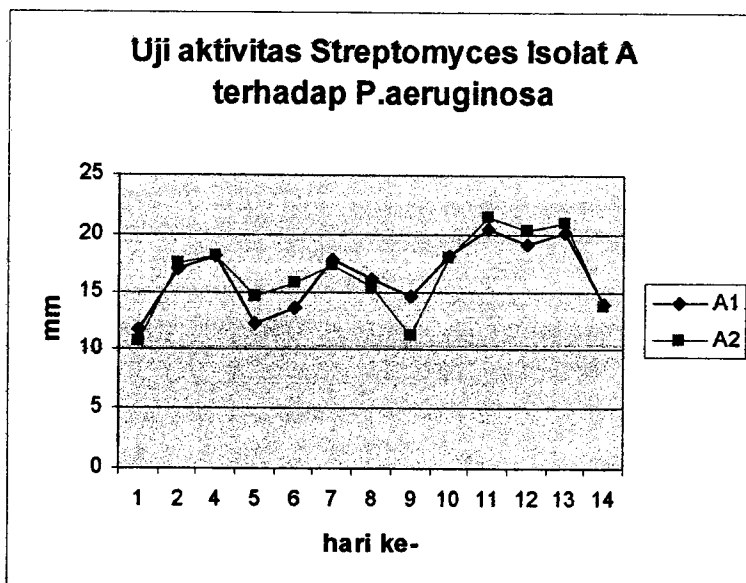
Gambar 4.2d. Hasil penapisan daya antimikroba *Streptomyces* spp. pada umur 72 jam dengan modifikasi cetak agar

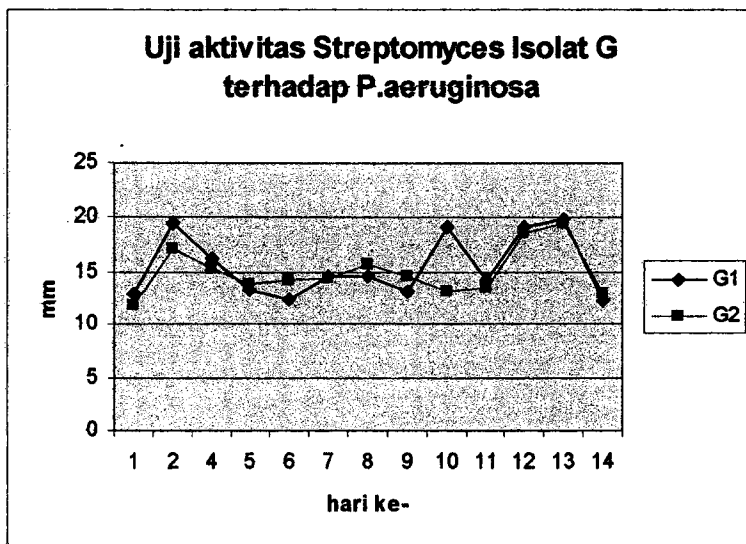
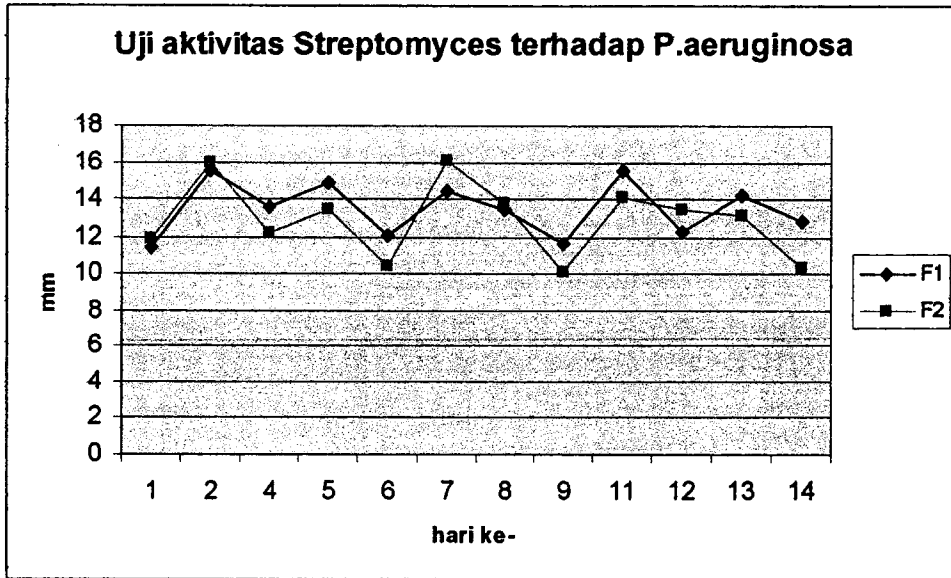


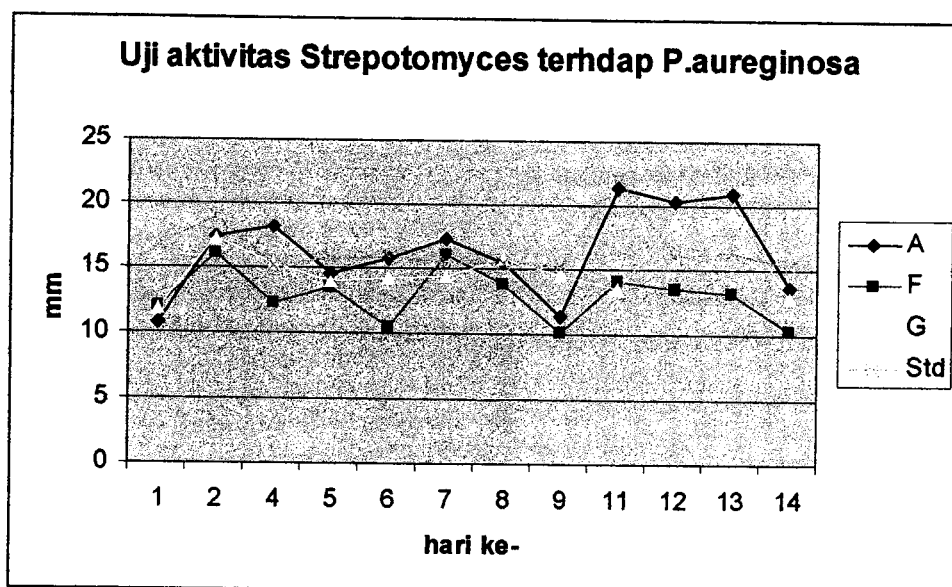
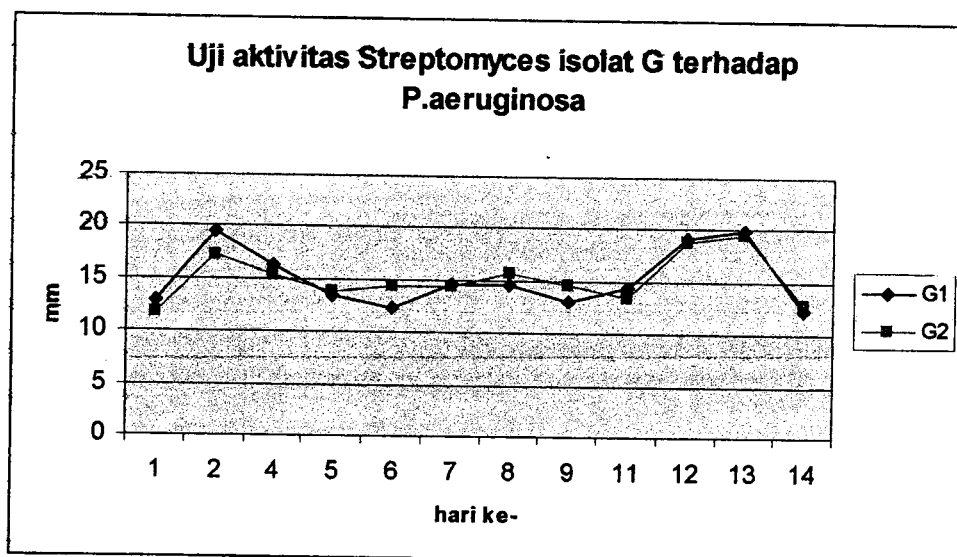




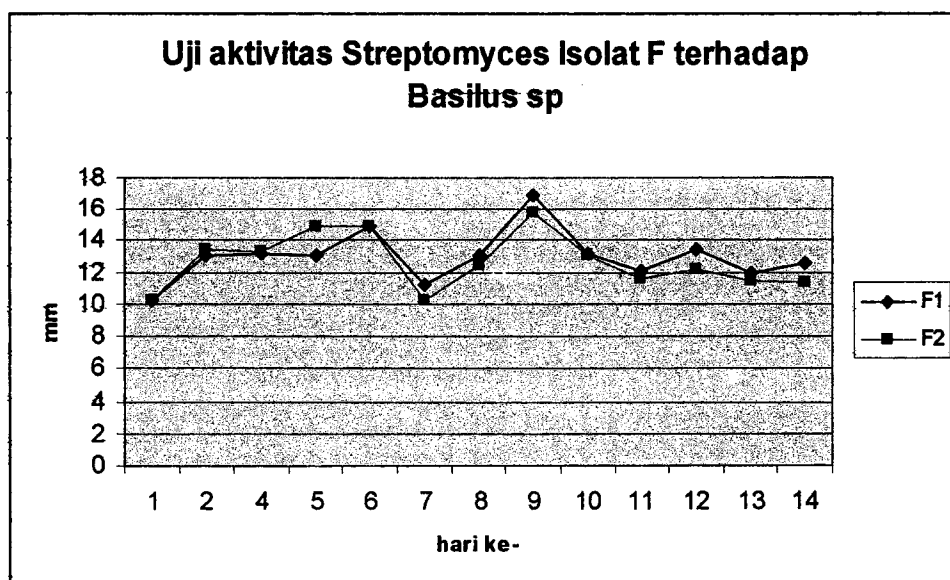
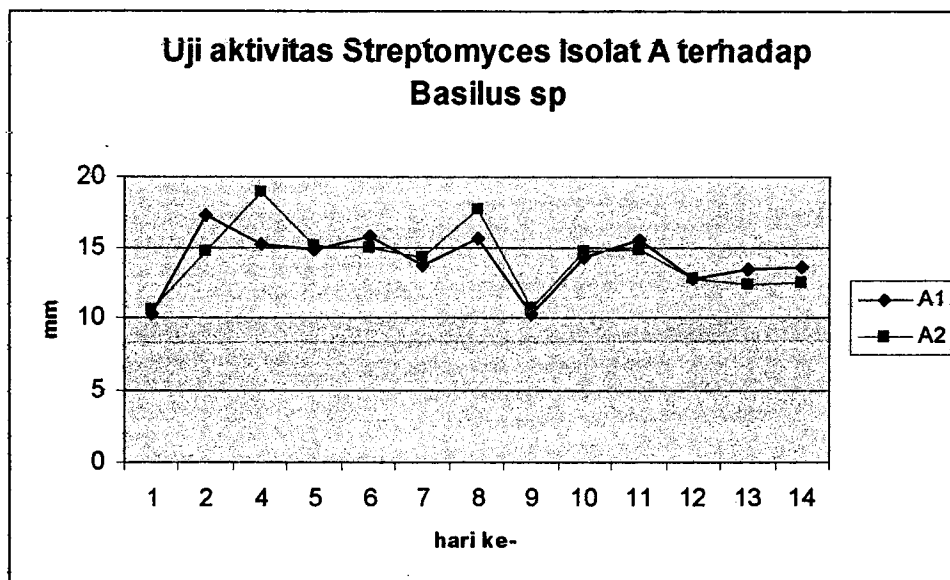
Gambar 4.3a. *Time course* aktivitas *Streptomyces* spp terhadap *E. coli* pada media ISP-4, suhu 28°C, 150 rpm.

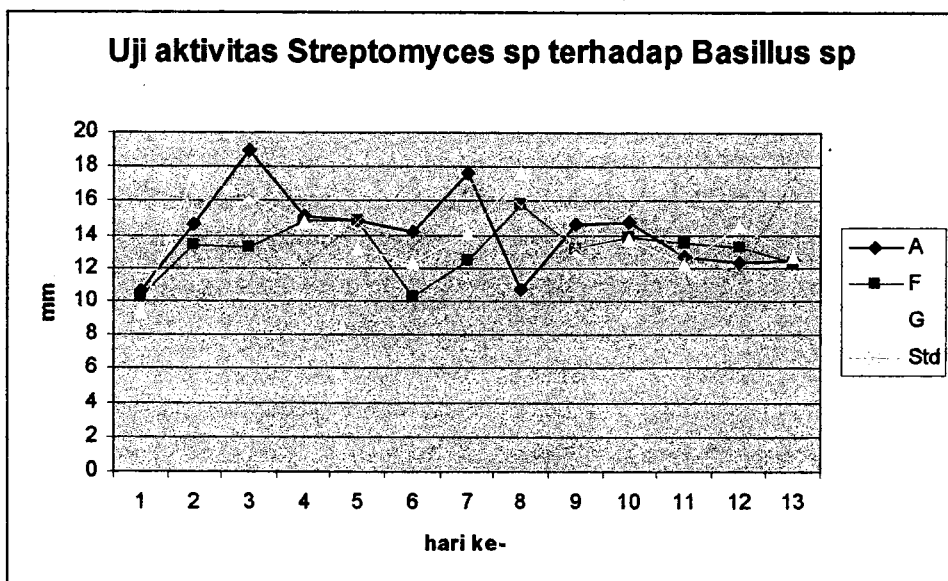
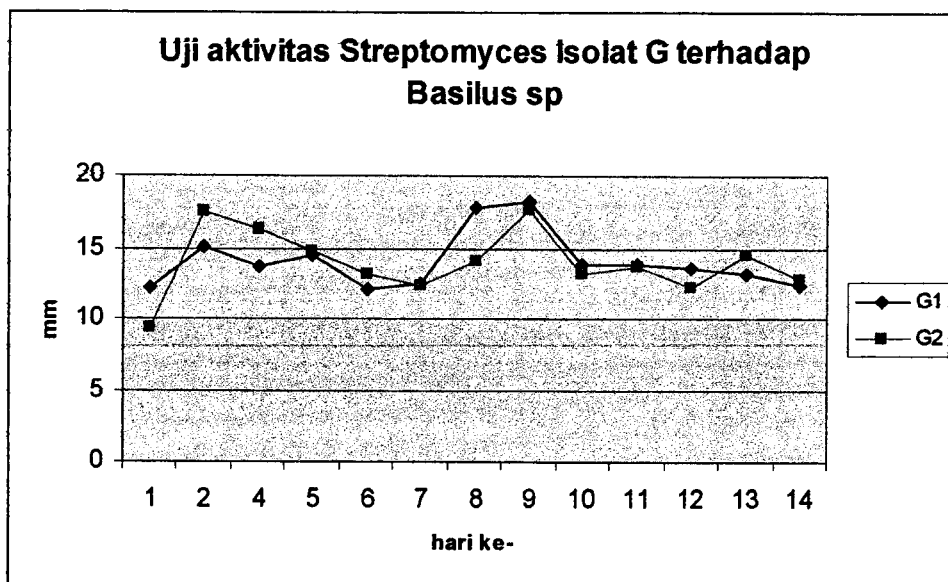




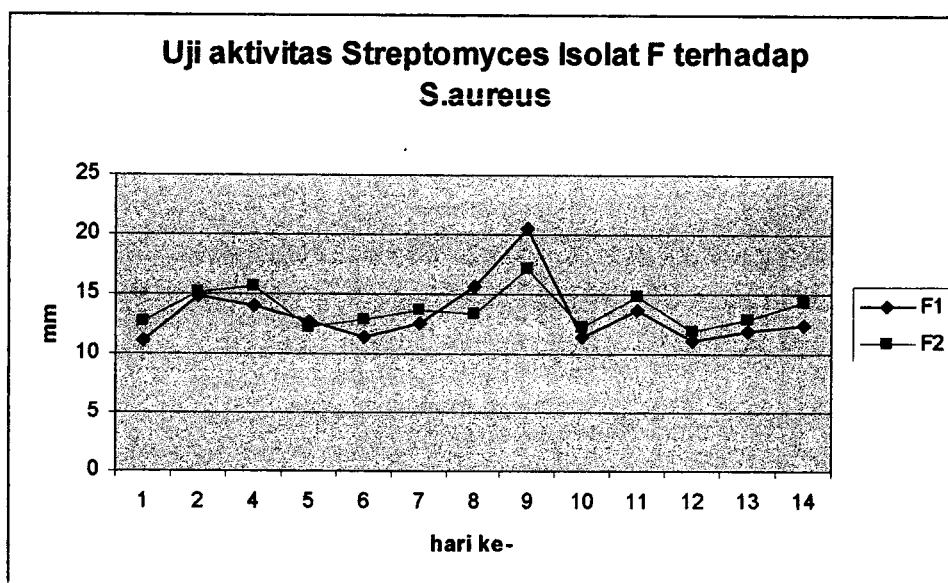
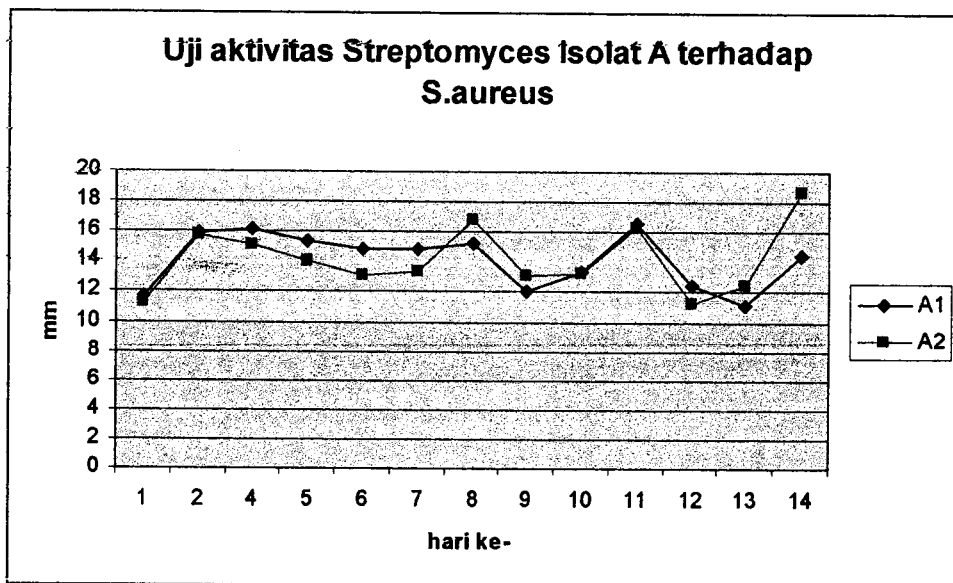


Gambar 4.3b. *Time course* aktivitas *Streptomyces* spp terhadap *P. aeruginosa* pada media ISP-4, suhu 28°C, 150 rpm.

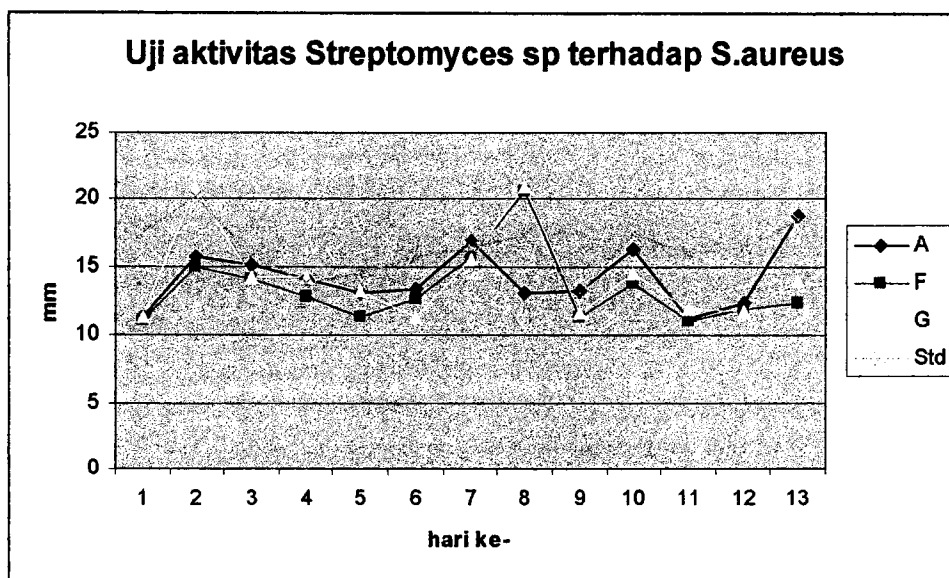
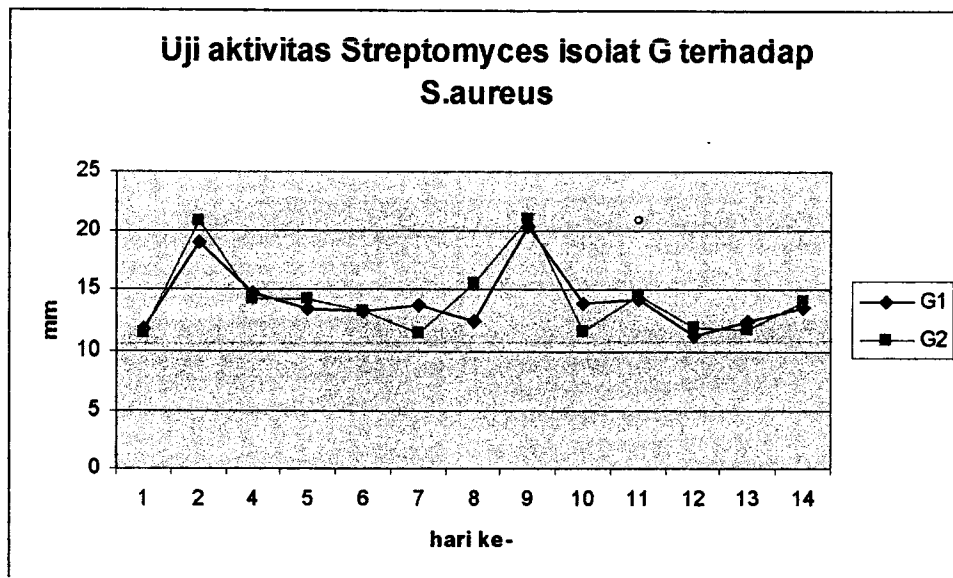




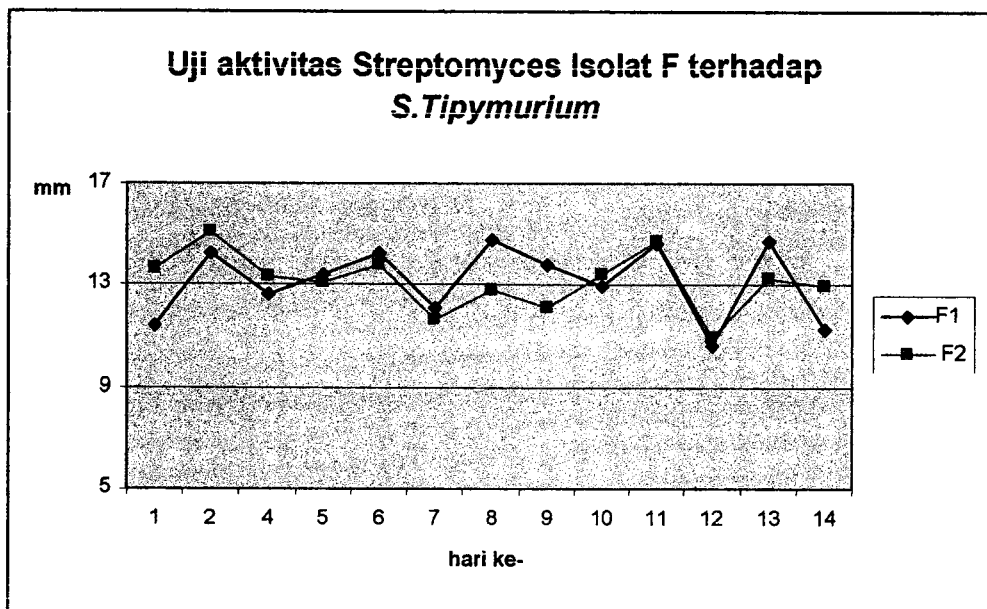
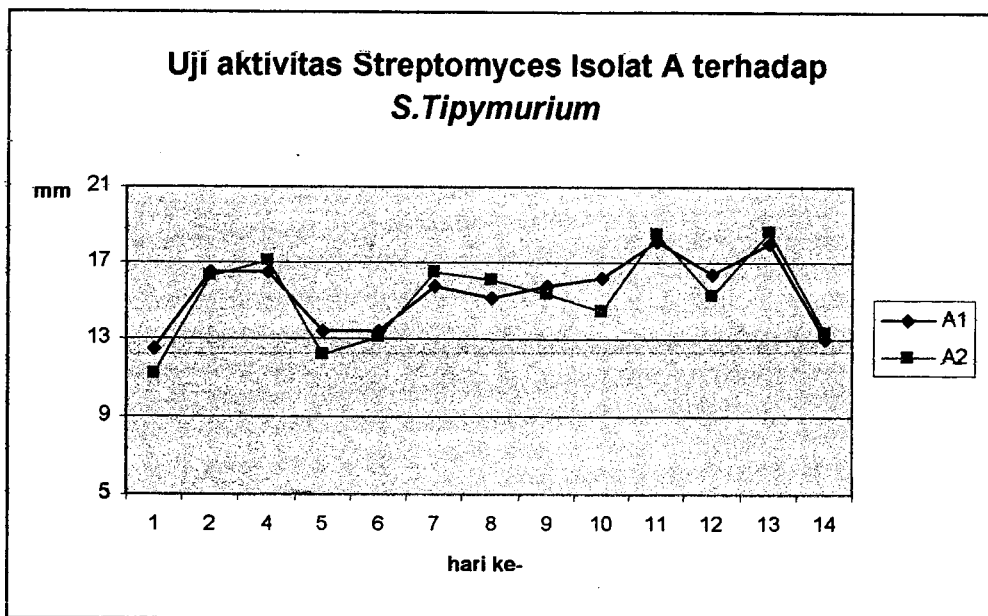
Gambar 4.3c. Time course aktivitas *Streptomyces* spp terhadap *B. subtilis* pada media ISP-4, suhu 28°C, 150 rpm.

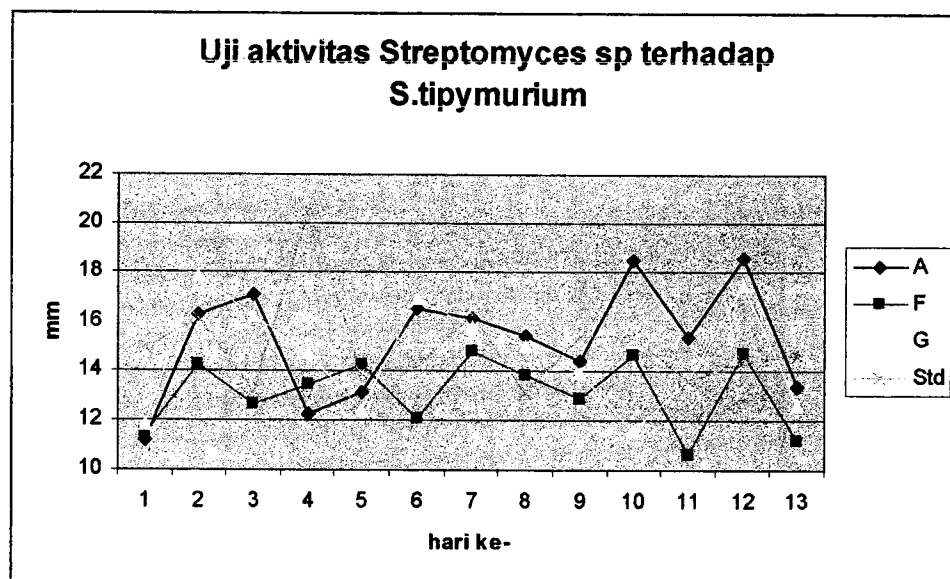
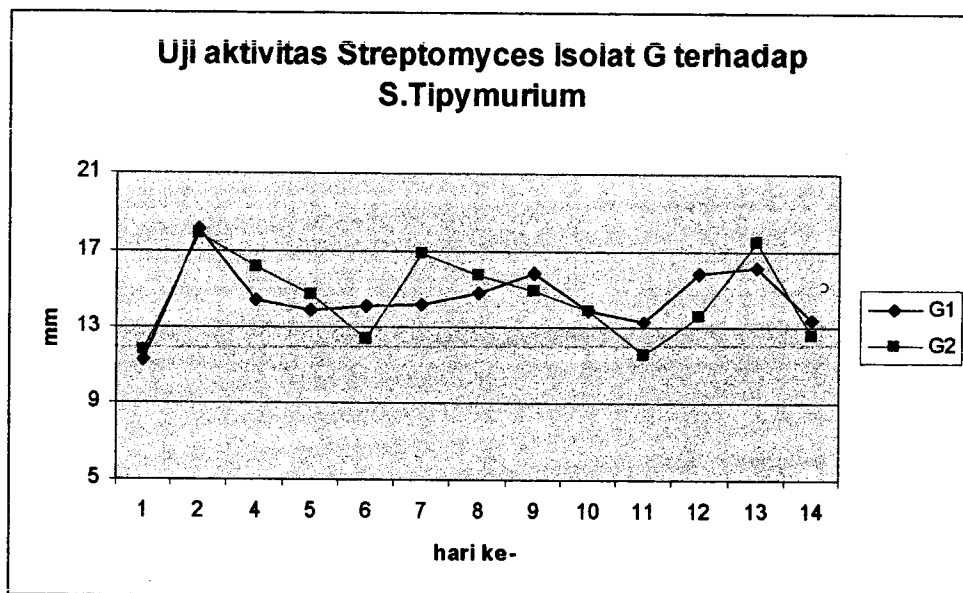




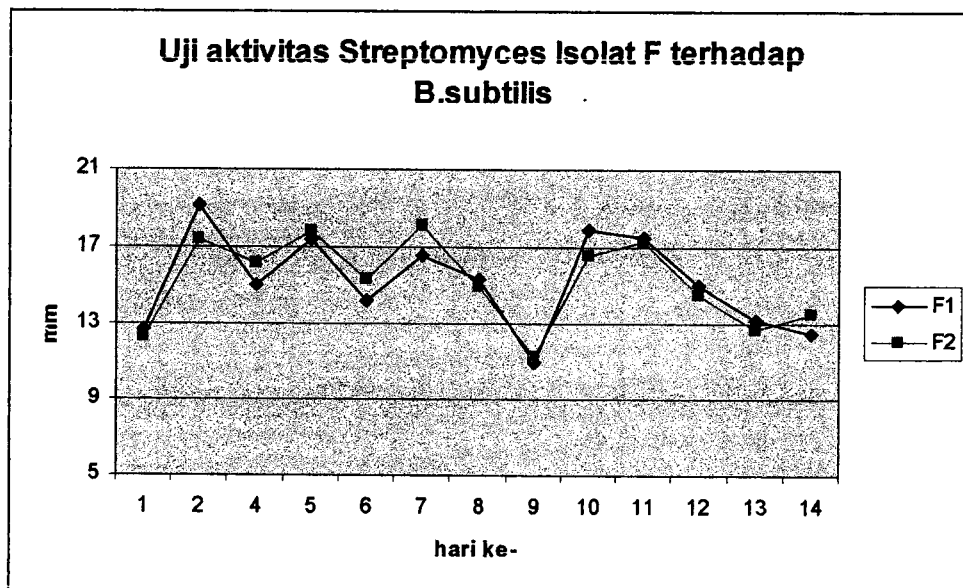
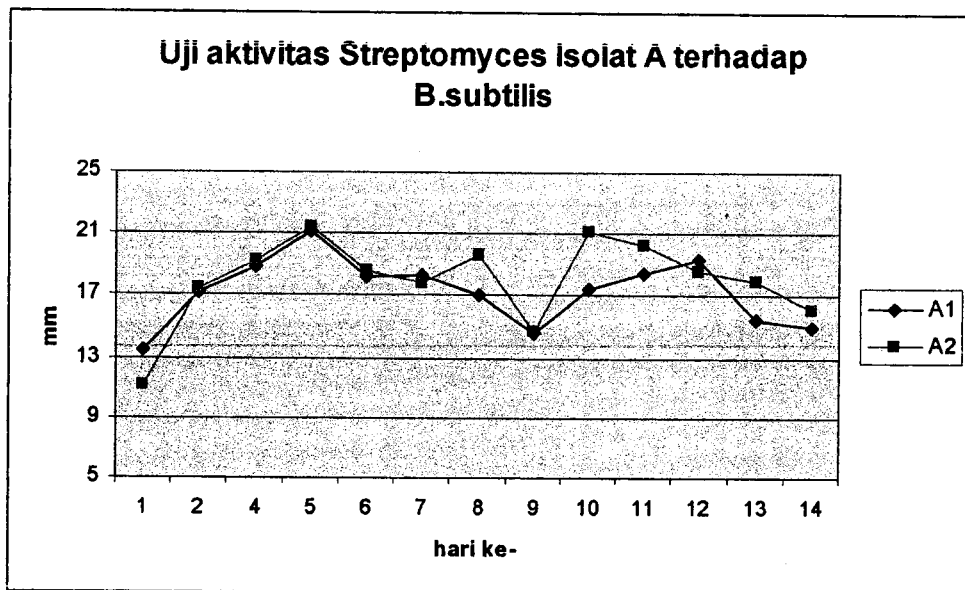


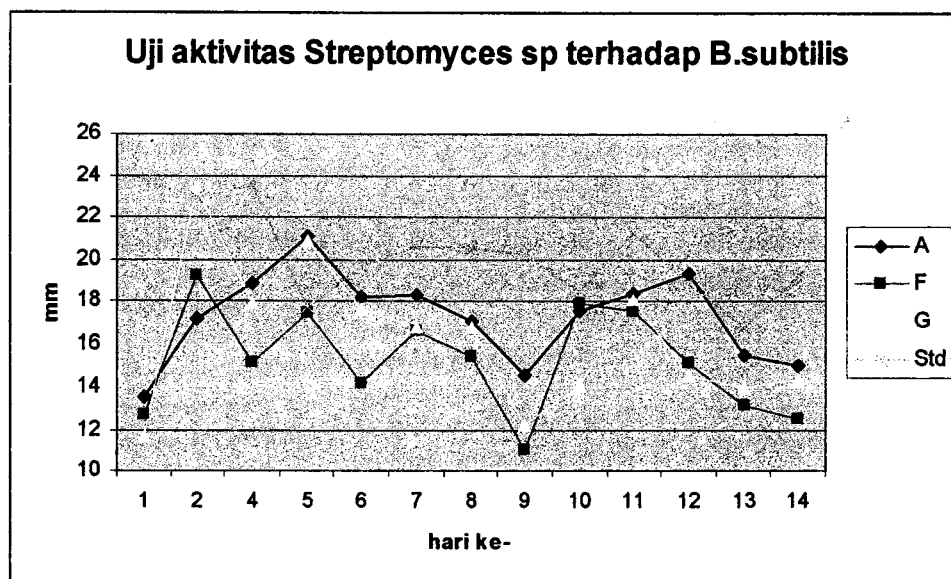
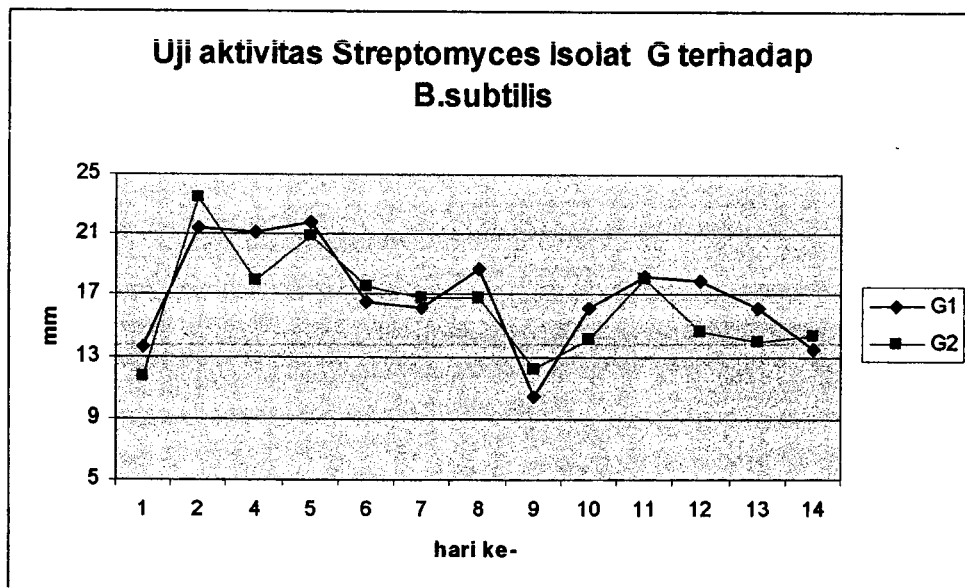
Gambar 4.3d. Time course aktivitas *Streptomyces* spp terhadap *S. aureus* pada media ISP-4, suhu 28°C, 150 rpm.



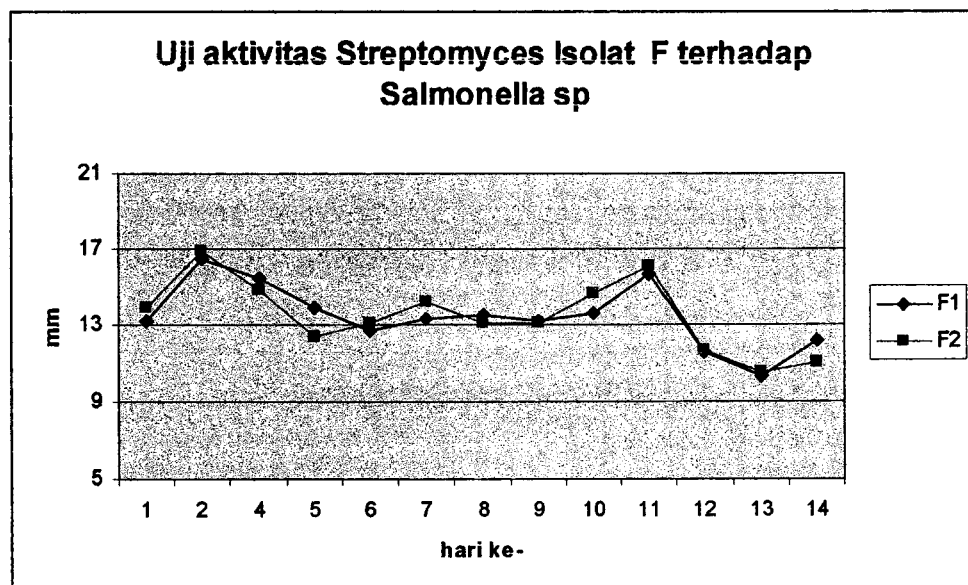
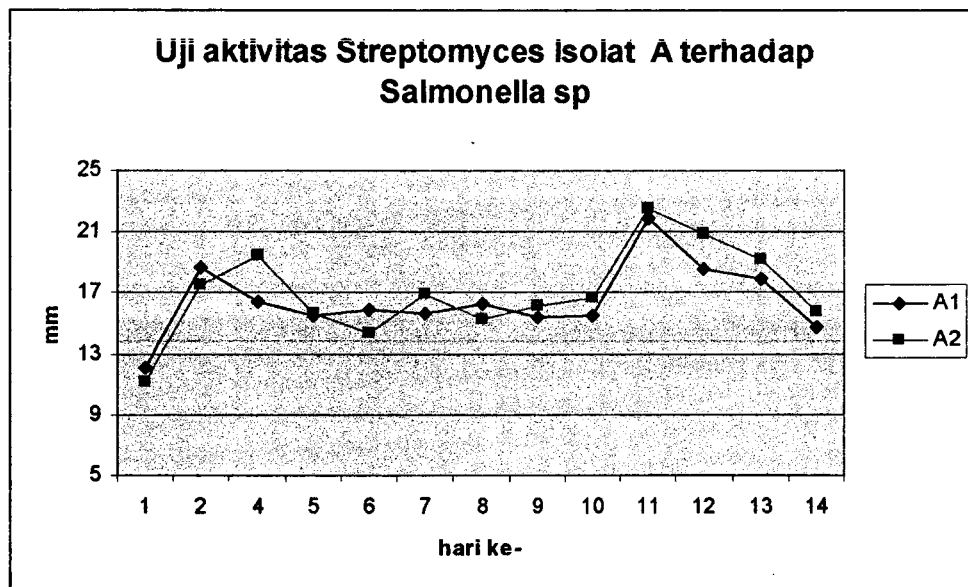


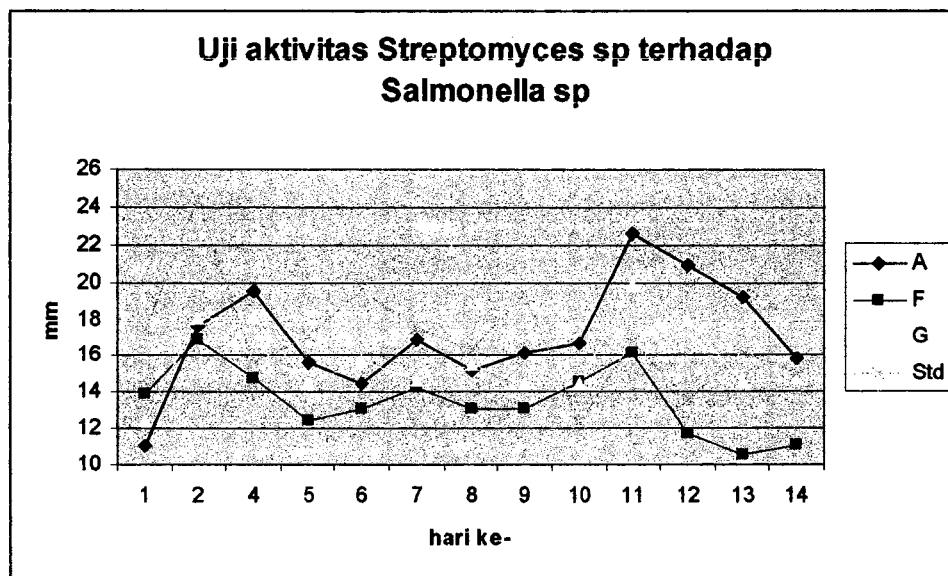
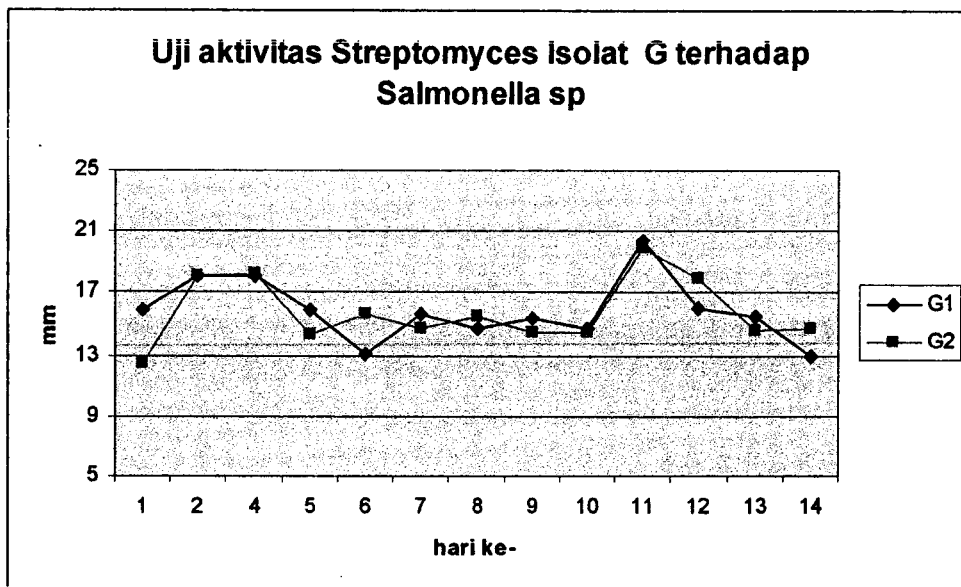
Gambar 4.3e. Time course aktivitas *Streptomyces* spp terhadap *S. tipymurium* pada media ISP-1, suhu 28°C, 150 rpm.



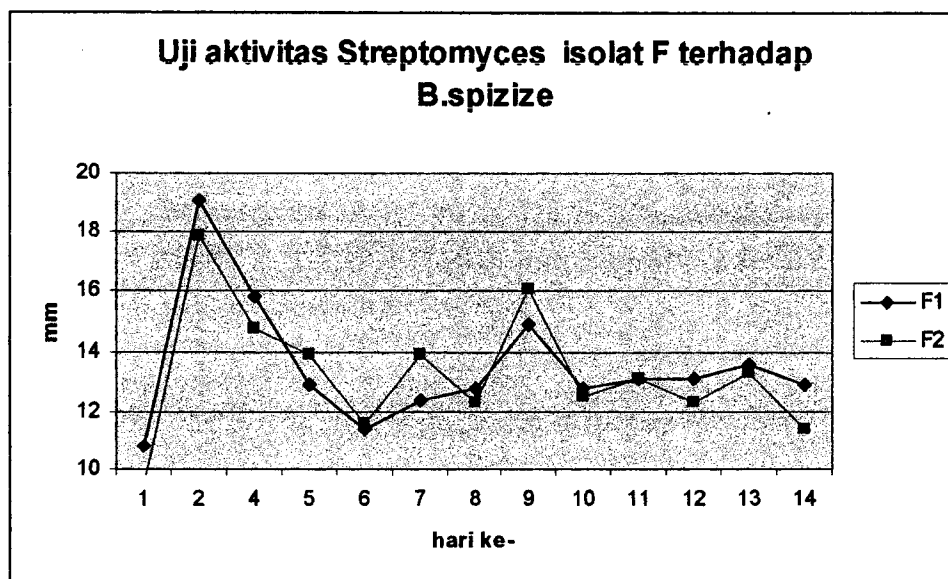
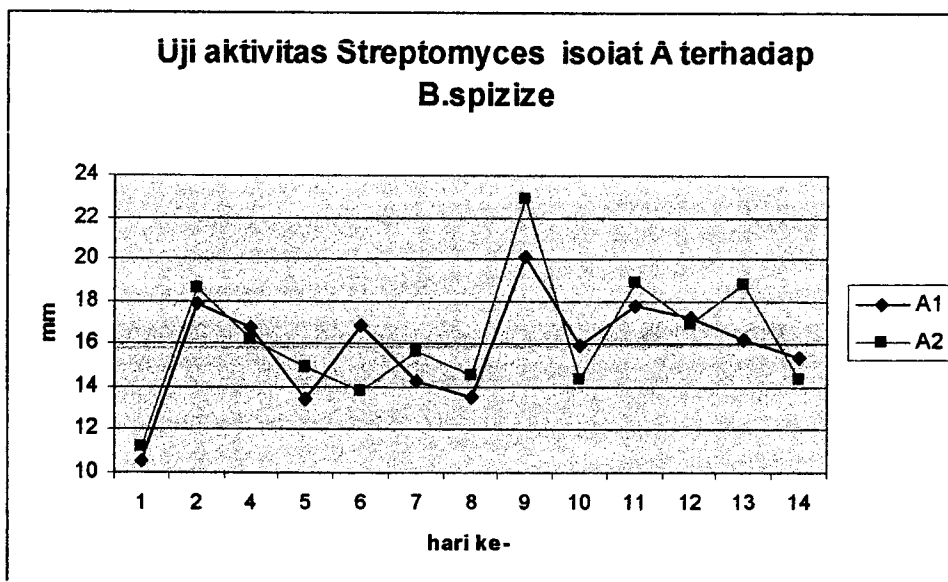


Gambar 4.3f. *Time course* aktivitas *Streptomyces* spp terhadap *B. subtilis* pada media ISP-4, suhu 28°C, 150 rpm.

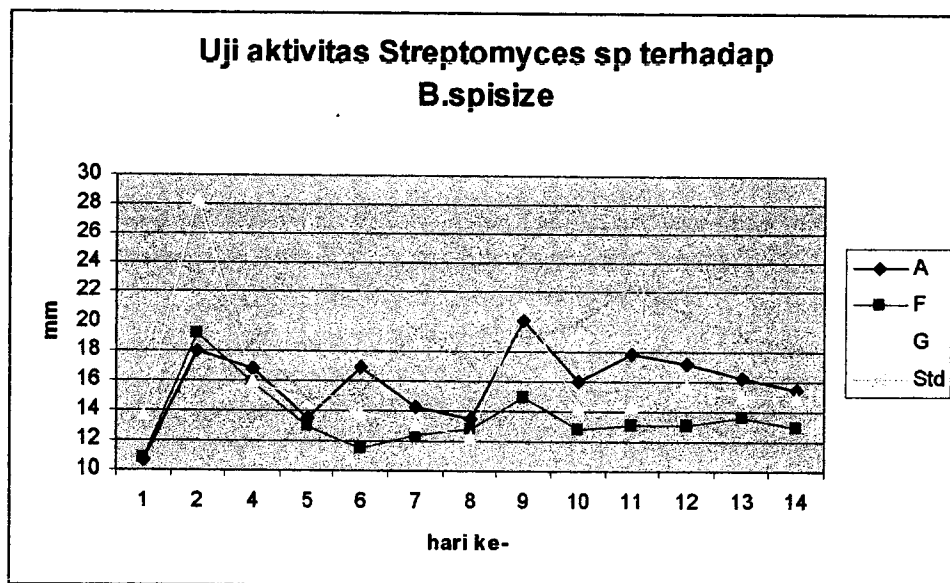
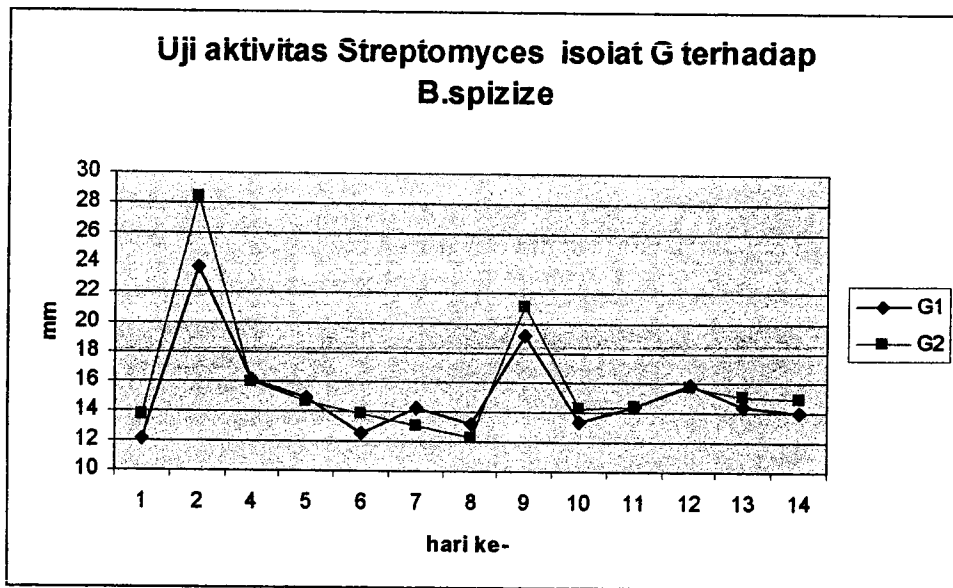




Gambar 4.3g. Time course aktivitas *Streptomyces* spp terhadap *Salmonella* sp. pada media ISP-4, suhu 28°C, 150 rpm.



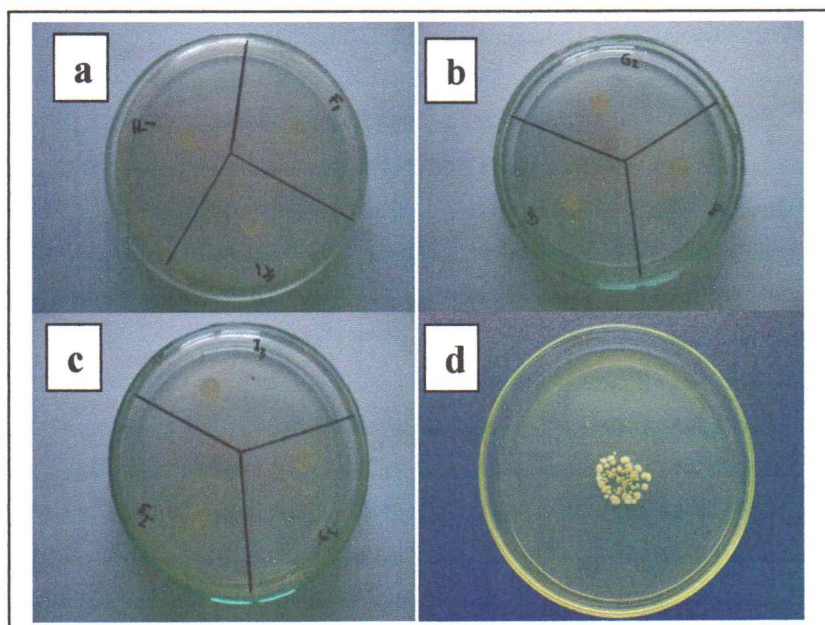




Gambar 4.3a. *Time course* aktivitas *Streptomyces* spp terhadap *Bacillus* sp. pada media ISP-4, suhu 28°C, 150 rpm.

#### 4.3. Penapisan daya anti *Mycobacterium tuberculosis*

Hasil penapisan daya anti bakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis* menunjukkan bahwa semua isolat menunjukkan daya hambat terhadap pertumbuhan dengan urutan potensi dari yang kuat menuju ke lemah dimulai dari isolat C, D, F, I, dan G. Sedangkan isolat A, Ep dan Ea menunjukkan daya hambat. Potensi relatif dibandingkan terhadap streptomisin yang terkenal sebagai anti TB. Isolat C menunjukkan potensi lebih besar dibandingkan kontrol positif streptomisin, sedangkan isolat I menunjukkan potensi relatif sama dengan kontrol streptomisin.



Gambar 4.3. Hasil uji aktivitas daya anti *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan media *Lowenstein Jensen* dengan modifikasi metode cetak agar. a = daya hambat isolate F, b = daya hambat isolate G, c = daya hambat isolate I, d = kontrol (pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* tanpa *Streptomyces* sp)

Hasil uji aktivitas *supernatan fermentation broth* menggunakan mikroba uji dilakukan sebagai tahap awal untuk isolasi senyawa aktif yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba uji termasuk *Mycobacterium tuberculosis*. Salah satu isolat (G) telah berhasil dianalisis secara

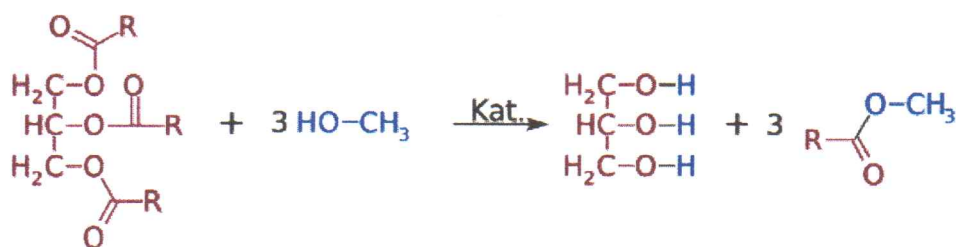
kualitatif kandungan senyawa aktif anti mikroba menggunakan bioautografi dan menghasilkan satu komponen (publikasi terlampiran) aktif. Gambar 4.4 menyajikan hasil *spray dryer fermentation broth* dan hasil uji potensi serbuk yang diperoleh menggunakan *Staphylococcus aureus* sebagai mikroba uji. Hasil uji ini menunjukkan bahwa setelah proses *spray dryer* serbuk kering *fermentation broth* masih menunjukkan aktivitas. Uji rasio potensi perlu dilakukan untuk observasi stabilitas aktivitas terhadap pengaruh pemanasan pada suhu 50°C pada proses *spray dryer*. Pada penelitian lanjutan isolasi senyawa aktif akan lebih mudah dan hasilnya diharapkan lebih reproduibel apabila dilakukan terhadap serbuk kering hasil *spray drying fermentation broth*.



Gambar 4.4. Serbuk *fermentation broth* hasil *spray drying* dan hasil uji aktivitas daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus*

#### 4.4. Optimasi kondisi GC-MS untuk *profiling* metil ester asam lemak

Penentuan komposisi asam lemak dalam suatu matriks yang kompleks tidaklah mudah, karena matriks dapat tersusun dari campuran asam lemak jenuh, baik dalam bentuk senyawa mono maupun poli. Metode yang sering digunakan untuk analisis asam lemak adalah kromatografi gas melalui analisis turunan asam lemak dalam bentuk ester metilnya. Ester metil asam lemak dapat dibuat melalui reaksi antara lemak atau asam lemak dan metanol dengan katalisator alkali, seperti reaksi di bawah ini.



Gambar 4.5. Reaksi pembentukan ester metal asam lemak

Setiap mikroorganisme memiliki profil ester metil asam lemak yang spesifik, sehingga menghasilkan sidik jari (*fingerprint*) dan dapat dijadikan sebagai *microbial source tracking*. Tipe dan proporsi asam lemak yang ada di dalam atau di luar membran sel merupakan fenotip mayor bagi suatu galur mikroorganisme. Hasil *review* yang telah dilakukan oleh Annaliesa *et al* (2001) menyebutkan bahwa profil ester metil asam lemak yang dianalisis dengan kromatografi gas dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies *Streptomyces*. Sampai saat ini telah ditemukan 10 000 senyawa aktif yang berhasil diisolasi *Streptomyces* sp.

Berdasarkan reaksi esterifikasi tersebut di atas, asam lemak yang diekstrak dari sel mikroba dapat direaksikan dengan metanol baik dalam bentuk basah maupun kering, kemudian metil ester asam lemak yang dihasilkan ditetapkan dengan kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS). Asam lemak selular yang dihasilkan variatif dalam hal panjang rantai karbon, ikatan, dan percabangannya. Asam lemak mayor yang biasanya teridentifikasi antara lain tetradekanoat, heksadekanoat, dan oktadekanoat. Seringkali asam lemak minor juga dapat membedakan spesies satu dari yang lain.

Optimasi kondisi kromatografi gas-spektrometri massa metil ester asam lemak *Streptomyces* spp telah dilakukan, terutama terkait kontrol temperatur pada analisis dengan GC-MS dan menghasilkan data tersaji pada Tabel 4.3. Data dalam Tabel tersebut menginformasikan bahwa isolate D dan Ea secara keseluruhan menunjukkan karakteristik kromatogram yang sama, demikian pula isolat Ep dan G, walaupun intensitas puncak berbeda. Perbedaan puncak pada waktu retensi 4,94 menit hanya disebabkan oleh perbedaan Tabel 4.3a. Data kromatogram ester metal asam lemak *Streptomyces* spp berdasarkan puncak utama dan puncak yang muncul pada Rt yang sama

Sampel	Puncak utama	Puncak yang muncul pada Rt (min) yang sama
--------	--------------	--------------------------------------------

	(min)								
A	8,71	2,92	6,65	6,49	8,71	9,76	12,15	12,58	
C	8,71	2,92	6,65	6,49	8,71	9,77	12,15	12,59	
D	9,76	2,91	6,65	6,49	8,71	9,76	12,15	12,58	
Ea	9,76	2,91	6,65	6,49	8,71	9,76	12,14	12,58	
Ep	6,65	2,91	6,65	6,49	8,71	9,76	12,14	12,58	
F	6,65	2,91	6,65	6,49	8,70	9,76	12,14	12,58	
G	6,64	2,90	6,65	6,48	8,69	9,73	12,12	12,55	
I	8,71	2,92	6,65	6,49	8,70	9,75	12,14	12,58	

Tabel 4.3b. Data kromatogram ester metil asam lemak *Streptomyces* spp secara keseluruhan

Sampel	Puncak pada waktu Retensi (Rt/menit)														
	2,59	3,26	4,94	5,46	7,21	8,23	9,17	11,05	11,38	11,87	14,37	14,63	15,32	15,42	17,95
A	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
C	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Ea	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Ep	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
F	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
G	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
I	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-

intensitas, sehingga dengan optimasi kondisi kromatograf dan volume sampel yang diinjeksikan, maka puncak pada menit ke 4,94 dapat dipertajam. Isolat A dan F secara keseluruhan sama, hanya berbeda pada puncak dominan yang muncul pada 8,71 dan 6,65 menit masing-masing untuk isolate A dan F. Selain itu, puncak pada Rt 15,42 juga hanya berbeda intensitas.

Dari data tersebut dapat dipelajari lebih lanjut korelasi antara aktivitas anti mikroba dengan profil metil ester asam lemaknya, yang akan dilakukan pada **penelitian tahun II** dengan analisis multivariat.

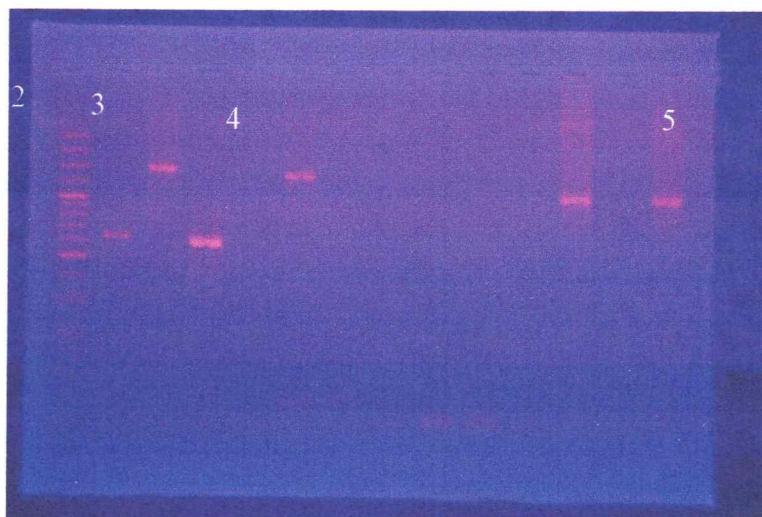
#### 4.5. Hasil analisis PCR

Hasil PCR isolat *Streptomyces* spp. Rumah Kompos Bratang Surabaya dilakukan menggunakan minimal tiga *primer*. Primer 1 yang digunakan adalah Sigma Proligo dengan urutan : *foward* **5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGAC-3'** dan *reverse* **5'-AAAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'**. Primer 2 yang digunakan adalah Sigma Proligo dengan



urutan : *foward* pA 5'-CCCCACTGCTGCCTCCCGTAG-3' dan *reverse* pH 5'-AAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGC-3'

Hasil PCR isolat *Streptomyces* A, C, D, Ea, Ep, F, G dan I dengan formulasi PCR yaitu PCR mix kit 25  $\mu$ L, akuabides steril 10  $\mu$ L, pA (*forward*) 10 pmol 5  $\mu$ L, pH (*reverse*) 10 pmol 5  $\mu$ L, DNA 5  $\mu$ L dan optimasi PCR dengan denaturasi awal 95<sup>o</sup>C selama 5 menit, amplifikasi sebanyak 35 daur : denaturasi 95<sup>o</sup>C selama 1 menit, *annealing* 60<sup>o</sup>C selama 1 menit, *elongasi* 72<sup>o</sup>C selama 1 menit dan pada putaran ke 35 *post elongasi* 72<sup>o</sup>C selama 10 menit, dapat dilihat pada Gambar di bawah ini.



Gambar 4.6. Elektrogram hasil PCR *Streptomyces* spp. menggunakan kit PCR.

Pita 1	:	<i>Streptomyces</i> A
Pita 2	:	<i>Streptomyces</i> A
Pita 3	:	<i>Streptomyces</i> F
Pita 4	:	<i>Streptomyces</i> F
Pita 5	:	<i>Streptomyces</i> G
Pita 6	:	<i>Streptomyces</i> I
M	:	Marker

Dari Gambar di atas terlihat bahwa *Streptomyces* sp A (pita 2), sp F (pita 4), sp G (pita 5), sp I (pita 6) menghasilkan 1 pita menggunakan *primer* 1 dengan 1500 bp, sedangkan pita 1 dan 3 tidak sesuai dengan posisi nukleotida DNA target, sehingga yang dipakai untuk sequencing

adalah pasangan *primer* 1. Sequencing dengan metode otomatis ABI Prism 310. masih dalam proses.

Sequencing 16S rRNA juga telah dilakukan untuk isolat C yang ternyata memiliki aktivitas sebagai anti *Mycobacterium tuberculosis* relatif lebih poten dibandingkan isolat yang lain. Berdasarkan hasil *sequencing* 16SrRNA, isolat C memiliki kemiripan dengan *Streptomyces sampsonii* yang telah dilaporkan memiliki daya anti fungi, sehingga sesuai dengan data yang diperoleh dalam penelitian ini, bahwa isolat tersebut menunjukkan daya hambat terhadap *Candida albicans*. Dalam literatur disebutkan bahwa *Streptomyces sompsonii* tidak memiliki daya anti bakteri, namun hasil uji daya hambat pertumbuhan terhadap *Mycobacterium tuberculosis* menunjukkan aktivitas yang nyata.

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut:

1. Seluruh isolat *Streptomyces* spp. dengan kode A, C, D, Ea, Ep, F, G, dan I memiliki daya hambat terhadap bakteri uji Gram positif dan Gram negatif baik pada media padat, media fermentasi cair, maupun hasil *spray dryer supernatant hasil fermentasi* pada hari ke-4.
2. Daya hambat terhadap *Candida albicans* hanya ditunjukkan oleh isolate dengan kode C, Ea dan Ep.
3. Daya hambat terhadap *Mycobacterium tuberculosis* ditunjukkan oleh isolat C, A, F, dan D. dibandingkan terhadap streptomisin.
4. Kromatogram GC-MS metal ester asam lemak menghasilkan profil spesifik, dengan puncak dominan terakumulasi di tiga titik, yaitu pada waktu retensi (Rt) 6,65, 8,71, dan 9,76 menit.
5. Hasil *sequencing* DNA isolat *Streptomyces* spp. menggunakan dua macam *primer* menunjukkan bahwa seluruh isolat menunjukkan pasangan basa sama dengan genus *Streptomyces* yang ada pada *gen bank*.

### 5.2. SARAN

1. Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan pemetaan korelasi antara aktivitas sebagai anti tuberkulosis dan anti viral dengan profil metil ester asam lemak dengan analisis multivariat

2. Implementasi metoda analisis untuk skrining atau penapisan aktivitas isolate *Streptomyces* spp. berdasarkan profil metil ester asam lemak dengan GC-MS dapat dilakukan terhadap isolate *unknown*, tanpa dilakukan uji aktivitas terlebih dahulu.



**DAFTAR PUSTAKA**

- Bax R, Mullan N and Verhoef J. 2000. The Millenium bugs: The need for and development of new antibacterials. *Int J Antimicrob Agent*, 15: 51-59
- Borodina, I., K. Preben and N. Jens. 2005. Genome-Scale Analysis of *Streptomyces coelicolor* A<sub>3</sub> (2) Metabolism. *Genome Research*. 15:821.
- 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.
- 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 infections Diseases*. Humana press. P.349
- Noivak R, Henriques b, Charpentier E, Normark S, Tuomanen E. 1999. Emergence of Vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae* *Nature*. 399(6736):590-591.
- 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 against Vancomycin resistant gram positive Bacteriae, antimicrobial agents and Chemotherapy. *Am Soc Microbiol*: 728-738
- 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 Depoartment of bacteriology.
- WHO(2) 2004. *treatment of Tuberculosis: Guidelines For National Programmes*. Edisi Revisi.
- Wibowo, J. 1990. *Teknologi Fermentasi. Proyek Pengembangan Pusat Fasilitas Bersama Antar Universitas (Bank Dunia XVII) PAU Pangan dan Gizi. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta*.

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

Zhao G, Yeh WK, Carnahan RH, Flokowitsch J, Meyer TI, William E, Alborn JR, Gerald W, Becker and Jaskunas R. 1997. Biochemical Characterization 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

*Laporan Akhir Penelitian Hibah Pasca 2011*

## FATTY ACID METHYL ESTER (FAME) PROFILE OF ANTIMICROBIAL PRODUCING *Streptomyces* spp ISOLATED FROM COMPOST SOIL

Rochmah Kurnijasanti\*\*, Isnaeni \* and Achmad Toto Poernomo\*

\*Faculty of Pharmacy Airlangga University

\*\*Faculty of Veterinary Airlangga University

### Abstract

Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. from compost soil has been investigated. Eight species have showed variety activities against microorganism tests including Gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., and *Mycobacterium tuberculosis*) Gram negative (*Salmonella* sp. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *streptococcus faecalis*, *enterococcus* sp), fungi (*Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*), and viral (H1N1). The present study performed the differences in susceptibility among eight species; that was observed their fatty acid methyl ester (FAME) profile by using GC-MS analysis.

Result of the research showed that the eight species (A, C, D, Ea, Ep, Es, F, G, and I) of *Streptomyces* spp. expressed antimicrobial activities. All of the samples showed antibacterial activities, except C, D, and *Ea* species, although the *Ea* species showed activity against *Candida albicans*. On the other hands, the *Ep* and *D* species showed anti viral against H1N1. The Isolate of *Streptomyces* A, F, G and I showed a specific and in moderate intensity peak at 6.65 and 8.71 minute of retention time (Rt), where species A, *Ep*, F, G and I have activity against gram-positive, negative, and *Mycobacterium tuberculosis*. GC-MS profiles C, D and *Ea* showed a difference in the peak of Rt, where *Streptomyces* species C, D and *Ea* showed activity as an anti-fungal. The Isolate of *Streptomyces* D and *Ea* showed a specific and in moderate intensity peak at 9.76 and 12.58 minute of retention time (Rt). GC-MS profile similar to the D and E correlated with anti-viral resources.

### METHOD

Fatty acid methyl ester (FAME) profile is determined by using GC-MS analysis. Furthermore, the antimicrobial activity was correlated with the fatty acid profile that composed the cells and analyzed in the methyl ester of *Streptomyces* spp from compost soil. Base-catalyzed (0.5M NaOH in MeOH) method was used to form the fatty acid methyl ester in whole cells.

## RESULT AND DISCUSSION

Result of the research showed that the eight species (A, C, D, Ea, Ep, Es, F, G, and I) of *Streptomyces* spp. expressed antimicrobial activities. All of the samples showed antibacterial activities, except C, D, and *Ea* species, although the *Ea* species showed activity against *Candida albicans*. On the other hands, the Ep and D species showed anti viral against H1N1. The difference of the activities was not only indicated by ability of the species to inhibit testing microorganisms growth, but also by their potencies. Based on the FAME GC-MS profile, the Isolate of *Streptomyces* A, F, G and I showed a specific and in moderate intensity peak at 6.65 and 8.71 minute of retention time (Rt); that was not found in other samples. GC-MS profile similar to A, Ep, F, G and I correlated with anti-microbial resources, where species A, Ep, F, G and I have activity against gram-positive, negative, and *Mycobacterium tuberculosis*. Several samples (C, D and Ea) exhibited peak at the same Rt, although the intensity is different. GC-MS profiles C, D and Ea showed a difference in the peak of Rt, where *Streptomyces* species C, D and Ea showed activity as an anti-fungal. The Isolate of *Streptomyces* D and Ea showed a specific and in moderate intensity peak at 9.76 and 12.58 minute of retention time (Rt); that was not found in other samples. GC-MS profile similar to the D and E correlated with anti-viral resources.

Table 1. Retention Time of *Streptomyces* sp

SPECIES	Retention Time (minute)													
	2,92	4,94	6,49	6,65	7,21	8,22	8,71	9,76	11,38	11,87	12,15	12,58	14,37	14,63
A														
C	2,91	4,94	6,50	6,65		8,22	8,71	9,77	11,38	11,87	12,15	12,58	14,37	14,63
D	2,92	4,94	6,49	6,65	7,22		8,71	9,76	11,38	11,87	12,15	12,58	14,37	14,63
Ea	2,92		6,49	6,65	7,21		8,71	9,76	11,38	11,87	12,15	12,58	14,37	14,63
Ep	2,92	4,94	6,49	6,65	7,21	8,22	8,71	9,76	11,38	11,87	12,15	12,58	14,37	14,63
F	2,91	4,94	6,49	6,65	7,21	8,22	8,70	9,76	11,38	11,87	12,15	12,58	14,37	14,63
I	2,92	4,94	6,49	6,65	-	8,22	8,70	9,75	11,38	11,87	12,15	12,58	14,37	14,63

Figure 1. *Sterptomycetes* sp activity test against *E. coli*

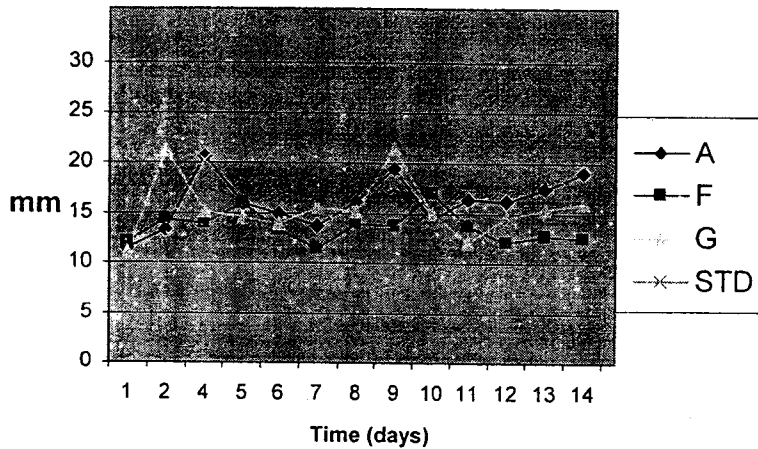
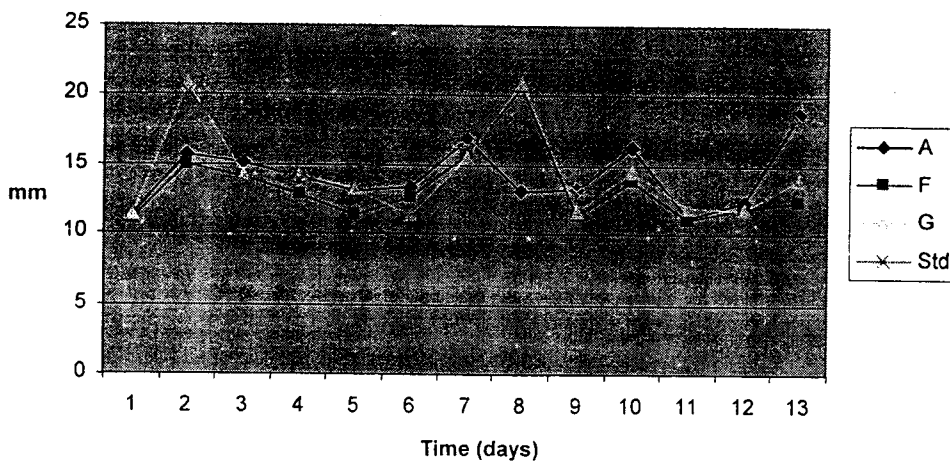


Figure 2. *Streptomycetes* sp activity test against *S. aureus*



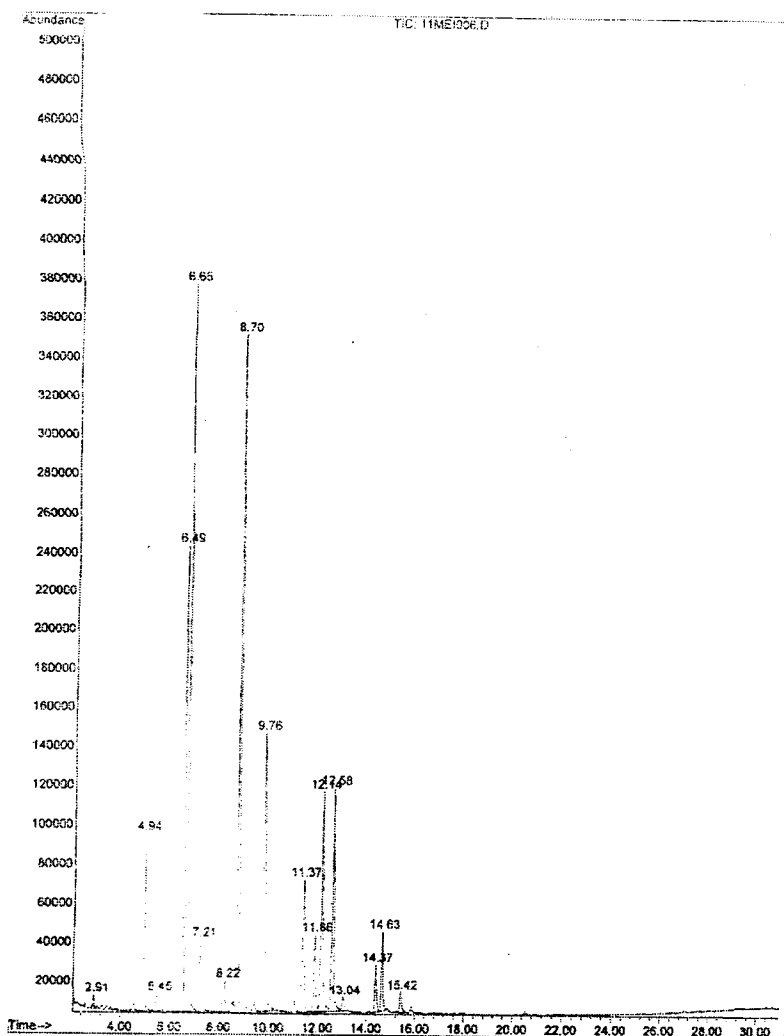


Figure 3. Chromatogram of *Streptomyces* Species F

## CONCLUSION

Fatty acid methyl ester (FAME) profile of *Streptomyces* spp. from compost soil is determined by using GC-MS analysis showed the antimicrobial activity was correlated with the fatty acid profile .

## REFERENCES

- 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.
- Gago, G., Diacovich, L., Arabolaza, A., Tsai, S.-C. and Gramajo, H. (2011), Fatty acid biosynthesis in actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev.* 35: 475–497.
- Sasser, M. 2006. *Bacterial Identification by Gas Chromatography Analysis of Fatty Acids Methyl Esters (GC-FAME)*, TechnicalNote #101, MIDI Inc.



# FATTY ACID METHYL ESTER (FAME) PROFILE OF ANTIMICROBIAL PRODUCING *Streptomyces* spp ISOLATED FROM COMPOST SOIL



Rochmah Kurnijasanti\*\*, Isnaeni \* and Achmad Toto Poemomo\*

\*Faculty of Pharmacy Airlangga University

\*\*Faculty of Veterinary Airlangga University

## ABSTRACT

Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. from compost soil has been investigated. Eight species have showed variety activities against microorganism tests including Gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., and *Mycobacterium tuberculosis*) Gram negative (*Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Enterococcus* sp), fungi (*Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*), and viral (H1N1). The present study performed the differences in susceptibility among eight species; that was observed their fatty acid methyl ester (FAME) profile by using GC-MS analysis.

Result of the research showed that the eight species (A, C, D, Ea, Ep, Es, F, G, and I) of *Streptomyces* spp. expressed antimicrobial activities. All of the samples showed antibacterial activities, except C, D, and Ea species, although the Ea species showed activity against *Candida albicans*. On the other hands, the Ep and D species showed anti viral against H1N1. The isolate of *Streptomyces* A, F, G and I showed a specific and in moderate intensity peak at 6.65 and 8.71 minute of retention time (Rt), where species A, Ep, F, G and I have activity against gram-positive, negative, and *Mycobacterium tuberculosis*. GC-MS profiles C, D and Ea showed a difference in the peak of Rt, where *Streptomyces* species C, D and Ea showed activity as an anti-fungal. The isolate of *Streptomyces* D and Ea showed a specific and in moderate intensity peak at 9.76 and 12.58 minute of retention time (Rt). GC-MS profile similar to the D and E correlated with anti-viral resources.

## METHOD

Fatty acid methyl ester (FAME) profile is determined by using GC-MS analysis. Furthermore, the antimicrobial activity was correlated with the fatty acid profile that composed the cells and analyzed in the methyl ester of *Streptomyces* spp from compost soil. Base-catalyzed (0.5M NaOH in MeOH) method was used to form the fatty acid methyl ester in whole cells.

## RESULT AND DISCUSSION

Result of the research showed that the eight species (A, C, D, Ea, Ep, Es, F, G, and I) of *Streptomyces* spp. expressed antimicrobial activities. All of the samples showed antibacterial activities, except C, D, and Ea species, although the Ea species showed activity against *Candida albicans*. On the other hands, the Ep and D species showed anti viral against H1N1. The difference of the activities was not only indicated by ability of the species to inhibit testing microorganisms growth, but also by their potencies. Based on the FAME GC-MS profile, the isolate of *Streptomyces* A, F, G and I showed a specific and in moderate intensity peak at 6.65 and 8.71 minute of retention time (Rt); that was not found in other samples. GC-MS profile similar to A, Ep, F, G and I correlated with anti-microbial resources, where species A, Ep, F, G and I have activity against gram-positive, negative, and *Mycobacterium tuberculosis*. Several samples (C, D and Ea) exhibited peak at the same Rt, although the intensity is different. GC-MS profiles C, D and Ea showed a difference in the peak of Rt, where *Streptomyces* species C, D and Ea showed activity as an anti-fungal. The isolate of *Streptomyces* D and Ea showed a specific and in moderate intensity peak at 9.76 and 12.58 minute of retention time (Rt); that was not found in other samples. GC-MS profile similar to the D and E correlated with anti-viral resources.

Table 1. Retention Time of *Streptomyces* sp

SPECIES	Retention Time (minutes)													
A	2,92	4,94	6,49	6,65	7,21	8,22	8,71	9,76	11,38	11,87	12,15	12,58	14,37	14,63
C	2,91	4,94	6,50	6,65	-	8,23	8,71	9,77	11,38	11,87	12,15	12,58	14,37	14,63
D	2,92	4,94	6,49	6,65	7,23	-	8,71	9,76	11,38	11,87	12,15	12,58	14,37	14,63
Ea	2,92	-	6,49	6,65	7,21	-	8,71	9,76	11,38	11,87	12,15	12,58	14,37	14,63
Ep	2,92	4,94	6,49	6,65	7,21	8,22	8,71	9,76	11,38	11,87	12,15	12,58	14,37	14,63
F	2,91	4,94	6,49	6,65	7,21	8,22	8,70	9,76	11,38	11,87	12,15	12,58	14,37	14,63
I	2,92	4,94	6,49	6,65	-	8,22	8,70	9,75	11,38	11,87	12,15	12,58	14,37	14,63

Figure 1. *Streptomyces* sp activity test against *E. coli*

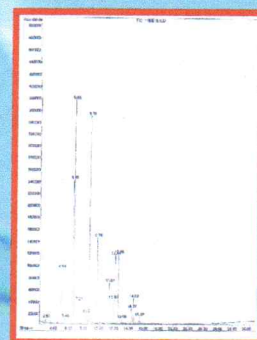
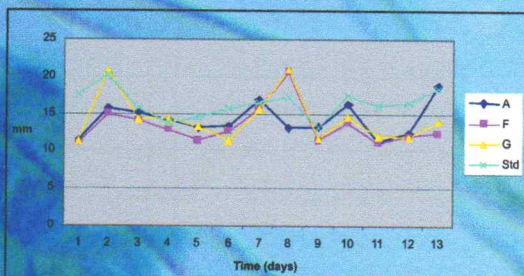
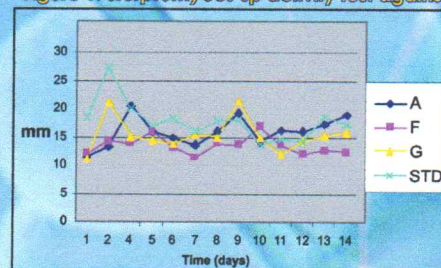


Figure 3. Chromatogram of *Streptomyces* Species F

## CONCLUSION

Fatty acid methyl ester (FAME) profile of *Streptomyces* spp. from compost soil is determined by using GC-MS analysis showed the antimicrobial activity was correlated with the fatty acid profile

## REFERENCES

- 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, Atefen University, Erzurum, Turkey.
- Gago, G., Diacovich, L., Arandimino, A., Tosi, S., C. and Ormajo, M. (2011). Fatty acid biosynthesis in actinomycetes. *FEMS Microbiol Rev.* 35: 475-497.
- Sasser, M. 2006. *Bacterial Identification by Gas Chromatography Analysis of Fatty Acids Methyl Esters (GC-FAME)*, Technical Note #101, MIDI Inc.



# Antibiotic Activity of *Streptomyces* sp. G against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Escherichia coli* ATCC 8739 using Contact Bioautography Technique



Ifah Yulistyani\*, Isnaeni, Juniar Soerjono, Achmad Toto Poernomo

Faculty of Pharmacy Airlangga University, Surabaya, Indonesia

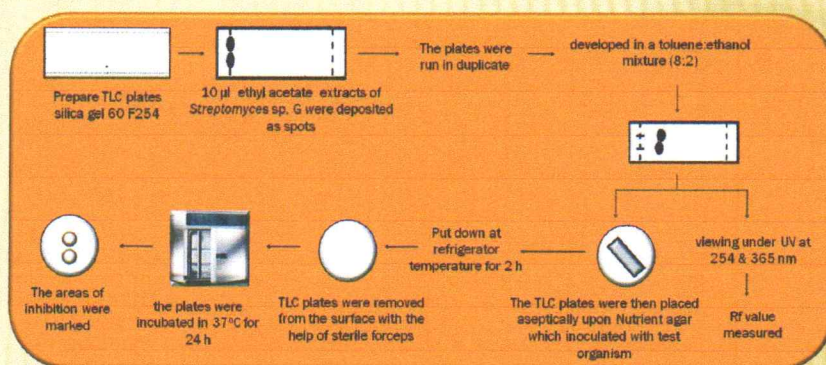
\* Corresponding author: Faculty of Pharmacy Airlangga University, Surabaya, Indonesia, Email: gif.myangel@gmail.com

## Introduction

Microbial natural products remain the most promising source of novel antibiotics. About 66% of all the bioactive microbial metabolites were isolated from *actinomycetes* especially from *Streptomyces* spp. [1].

Ifah *et al.* (2010) have done the isolation and primary screening of *Streptomyces* sp. from soil of Rumah Kompos Bratang Surabaya. From these studies was known *Streptomyces* sp. G has a relatively strong antimicrobial activity [2]. Accordingly, we are investigating the potential of *Streptomyces* sp. G as a resource for new antibiotic. To investigate the active compounds of *Streptomyces* sp. G, we have used contact bioautography technique.

## Method



Active compound stock solution was tested for heat stability by keeping samples at 60°C for 30 min and at 100°C for 5 min. After heat treatment, samples were used for assay of bioautography again [3].

## Results

On the thin layer chromatograms, the extracts were separated into one spot by viewing under ultraviolet at 254 nm ( $R_f$  value 0.54) and two spots ( $R_f$  value 0.53 and 0.64) at 365 nm. This spot gave purple colours under ultraviolet (Figure 1). In the bioautography studies only one ( $R_f$  value 0.53) showed antibacterial activity (Figure 2). These results may suggest that this compound, after its purification and identification, could be used for the development of the valuable pharmaceuticals. In the case of heat treatment, active component was found as heat-stable (Figure 3).

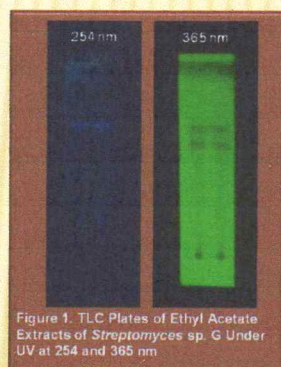


Figure 1. TLC Plates of Ethyl Acetate Extracts of *Streptomyces* sp. G Under UV at 254 and 365 nm

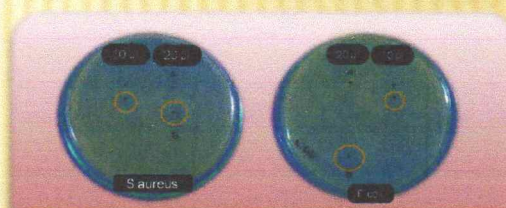


Figure 2. Bioautography of Ethyl Acetate Extracts of *Streptomyces* sp. G Against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 And *Escherichia coli* ATCC 8739 (A, spot which  $R_f$  value 0.64; B, spot which  $R_f$  value 0.53)

## Conclusion

Ethyl acetate extract of *Streptomyces* sp. G has one spot ( $R_f$  value 0.53) showed antibacterial activity.

## References:

- Hopwood, D.A., Buttner, M.J., Bibb, M.J., Kieser, T., Charter, K.F., 2000. *Antibiotic Production by Streptomyces. Practical Streptomyces Genetics*, 1, 1-42.
- Y. Ifah., Olivia, N., Setyani, D.S., Septyanto, T.D., dan Saraswati, M.D., 2010. *Laporan Akhir PKMP Pemberdayaan Tanah Rumah Kompos Bratang Surabaya sebagai Sumber Streptomyces sp. Penghasil Antibiotik*. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Yücel, S., and Yamac, M., 2010. *Selection of Streptomyces Isolates from Turkish Karstic Caves Against Antibiotic Resistant Microorganisms*, J. Pharm. Sci., Vol. 23, No.1, pp. 1-6.



Figure 3. Heat Treatment of Ethyl Acetate Extracts of *Streptomyces* sp. G (EA, Ethyl acetate; St, standard, Tetracycline; 100, 100°C; KLT, TLC plate; 0, not heat treatment; 60, 90°C)





# PROTEOLYTIC AND FIBRINOLYTIC ENZYME ACTIVITIES FROM *Streptomyces* Sp. STRAIN C ISOLATED FROM COMPOST "RUMAH KOMPOS BRATANG SURABAYA" (INDONESIA)

Achmad Toto Poernomo\*, Noor Erma NS\*, Isnaeni\*, Junda Ashri Fathi,  
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY  
FACULTY OF PHARMACY AIRLANGGA UNIVERSITY, SURABAYA

## INTRODUCTION

Fibrin is the main protein component of blood clots and is normally formed from fibrinogen by the action of thrombin (EC 3.4.21.5). Blood vessels thrombus due to fibrin accumulation may lead to myocardial infarction or other cardiovascular diseases. Under physiological conditions, fibrin is lysed by plasmin (EC 3.4.21.7) activated from plasminogen by different plasminogen activators (PAs), keeping blood flow at vascular injury sites. Fibrinolytic enzymes are able to prevent or cure thrombotic diseases by degrading fibrin clots. Typical thrombolytic agents are the tissue-type plasminogen activator (t-PA), urokinase type plasminogen activator (u-PA), and bacterial plasminogen activators such as streptokinase (SK). Fibrinolytic enzyme production was evaluated in bacterial isolated from compost of Rumah Kompos Bratang Surabaya. This research was aimed at detecting the potential fibrinolytic enzyme-production ability in bacterial isolated from compost of "Rumah Kompos Bratang Surabaya". Microbial fibrinolytic enzymes, mimicking the ability of enzymes from bacterial origin (streptokinase and staphylokinase) may have potential application in the pharmaceutical industry as thrombolytic agents.

## METHOD

### Screening for proteolytic and fibrinolytic enzyme production

Proteolytic and fibrinolytic activities were evaluated in crude enzyme extracts from each tested isolate after growth in nutrient medium agar plates (Fig. 1). For the sake of clarity, screening on skimmed-milk agar plates showed that about 62% of the isolates were capable of producing proteolytic activity, whilst only three isolates gave positive fibrinolytic activity. Skimmed milk-agar plates were used taking into account previous results on the higher activity of fibrinolytic enzymes towards casein than on albumin or other tested proteins. Fibrinolytic-positive extracts formed similar clear halos on both plasminogen-rich and plasminogen-free fibrin plates (data not shown), indicating that the enzymes were able to degrade fibrin in a direct way, and lacked the ability to convert plasminogen to plasmin. In contrast with already described t-PA, u-PA and SK (plasminogen-activator type enzymes), direct fibrinolytic and fibrinogenolytic activity would represent an advantage since undesirable side effects such as platelet activation due to plasmin (Kim et al. 2006).

### Assay of proteolytic activity

Plates containing 1% w/v skimmed milk dissolved in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) as substrate plus 1% w/v agar were used. Ten microliters of each crude enzyme extract were poured into 5-mm-diam wells previously made with a sterile cork borer. After 18 h of incubation, enzyme production was evaluated by measuring halo diameters. For screening purposes, proteolytic activity was expressed as the clear zone area (in mm<sup>2</sup>).

### Assay of fibrinolytic activity

In Petri dishes, 5 ml of 0.5% w/v fibrinogen (from bovine plasma, Sigma) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8) were mixed with 5 ml of 2% w/v agarose plus 0.1 ml of thrombin (100 NIH U/ml). Plates were allowed to stand for 30 min at room temperature to form the fibrin clot layer. Half of these plates were heated at 85 C for 30 min to deactivate plasminogen (plasminogen-free fibrin plates) and remaining ones were considered plasminogen-rich fibrin plates. After this, 10 µl of each crude enzyme extract were dropped into 5-mm-diam wells previously made with a sterile cork borer on each kind of plates. Plates were incubated at 37 C for 18 h, and fibrinolytic activity was subsequently quantified. A clear transparent region is indicative of fibrin degradation and its diameter is proportional to the potency of fibrinolytic activity. All experiments were performed in triplicate.

## RESULTS

### Identification of *Streptomyces* sp C

The morphologic and culture characteristics of *Streptomyces* sp C are shown in Fig. 2 and 3. The results show a typical characteristic of the *Streptomyces samsonii*. For further confirmation of the identification results, the sequence of an internal transcriptional spacer *Streptomyces* sp C was compared with that of different strains obtained from the NCBI database using the neighbor joining method. The results showed that the internal transcriptional spacer gene sequence of *Streptomyces* sp. C had the highest similarity (99%) to that of *Streptomyces samsonii*.

### Identification of isolates

The morphologic and culture characteristics of *Streptomyces* sp C was analyzed according to the methods of Korn erup and Wanschler. The genomic DNA of the strain was extracted by the modified method of Rodrigues and Tait. An internal transcriptional spacer (ITS) fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using universal primers: forward primer (5'-TCCGTAGT-GAACCTGCGG-3') and reverse primer (5'-TCCTCCGCTATTGATATGC-3'). The PCR product was examined by electrophoresis, isolated, and then sequenced by Biology Molecular Laboratory Faculty of Applied Science University Institute Technology Mara Malaysia and sequence similarity search was performed in the National Center for Biotechnology (NCBI) database using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>).

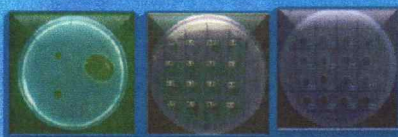


Fig 1. A. Screening for enzyme activities in crude extracts from cultures of *Streptomyces* sp on 1% w/v skimmed milk agar plates. B. Fibrinolytic activity on 0.25% w/v fibrin agar plates. Highest activities corresponded to the largest clear zones on either skimmed-milk or fibrin agar plates. Numbers correspond to *Streptomyces* isolate identification Ctrl: negative control, 10 µl of 50 mM TrisHCl buffer pH 7.3

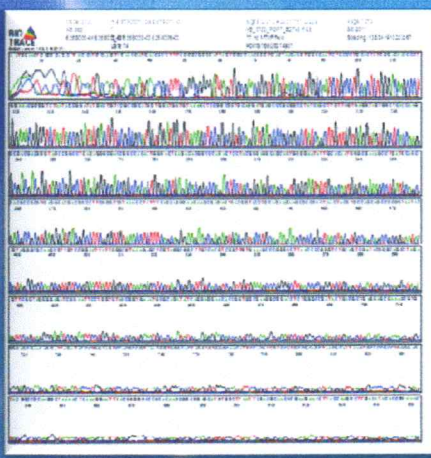


Fig3. The electropherogram of *Streptomyces samsonii*

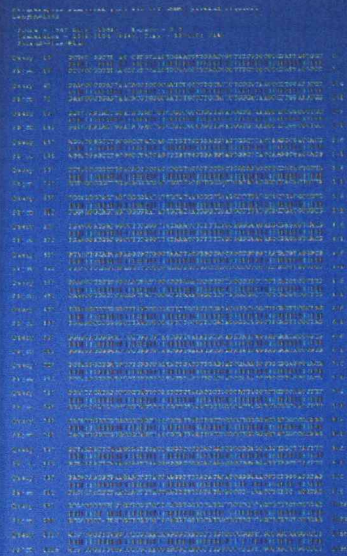


Fig 2. The gene sequences of DNA from *Streptomyces* sp C.

## CONCLUSION

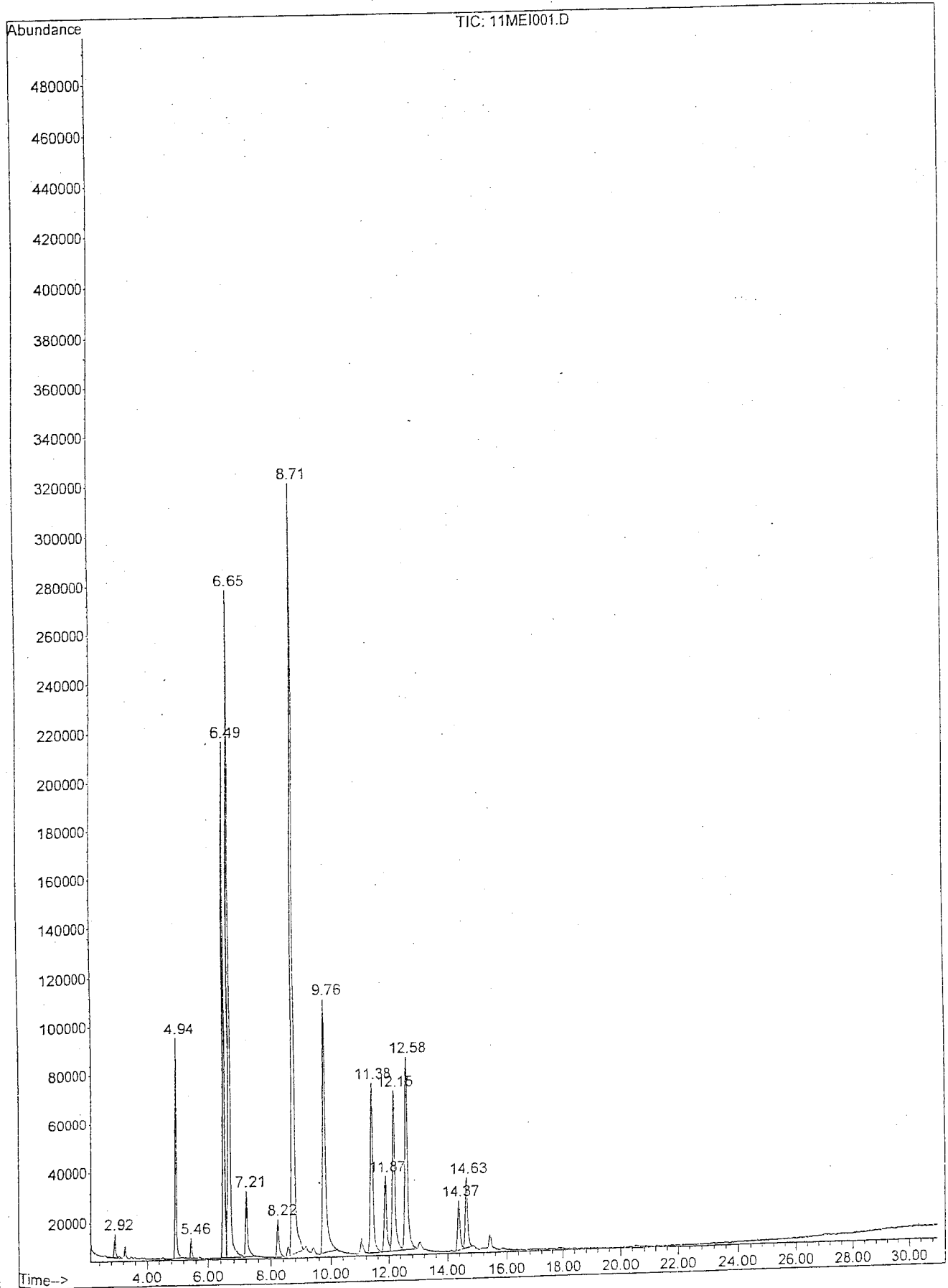
The proteolytic and fibrinolytic enzymes obtained from the *Streptomyces* sp strain C, and *Streptomyces* sp strain C has been identified as *Streptomyces samsonii*

### References

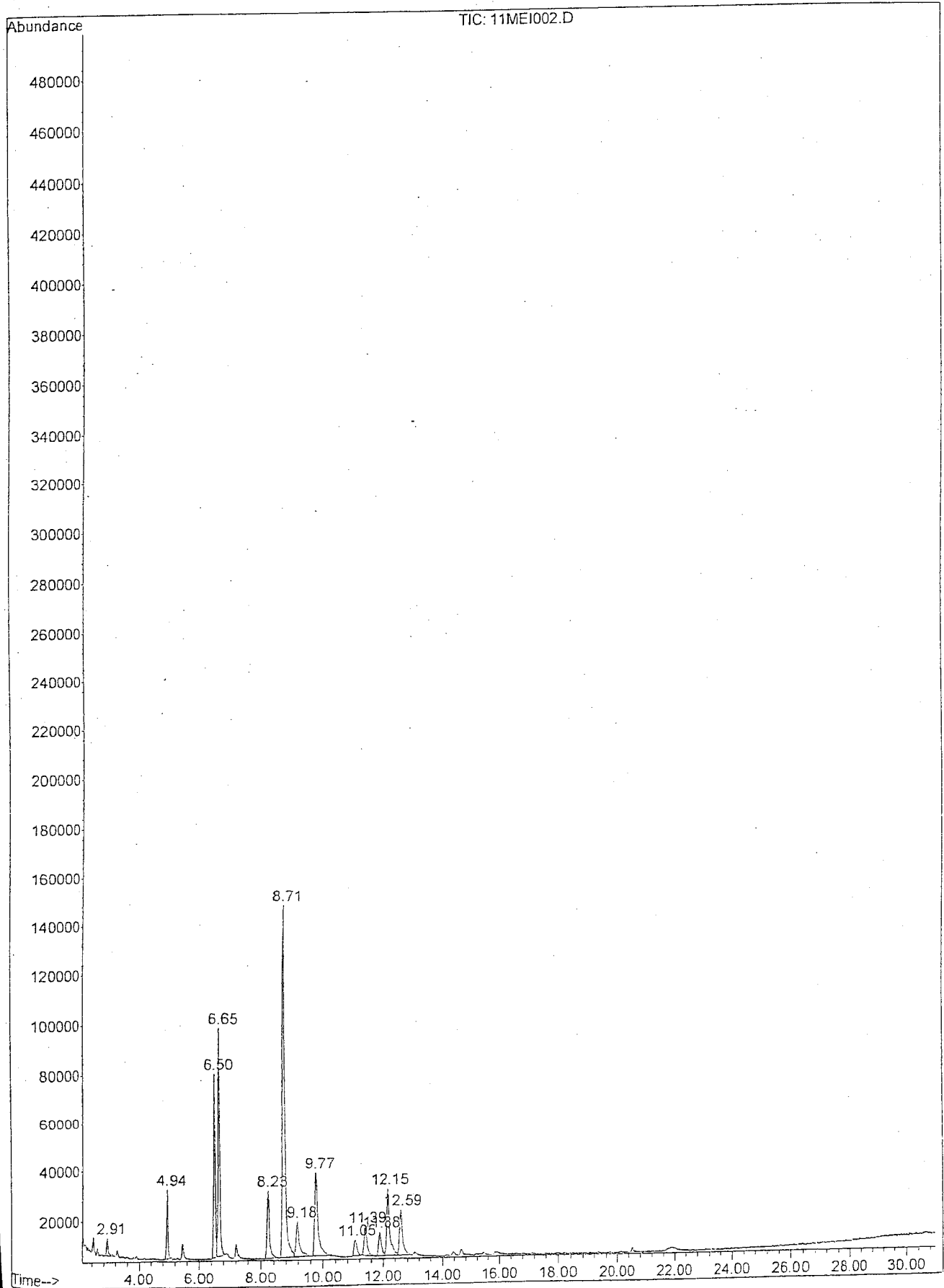
- Jeong YK, Park JU, Baek H, Park SH, Kong IS, Kim DW, Joo WH (2001) Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17. *World J Microbiol Biotechnol* 17:89-92
- Kim J-S, Sapkota K, Park S-E, Choi B-S, Kim S, Hlep NT, Kim C-S, Choi H-S, Kim M-K, Chun H-S, Park Y, Kim S-J (2006) A fibrinolytic enzyme from the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *J Microbiol* 44:622-631
- Jaya Ram Simkhada, Poonam Mander, Seung Sik Cho, Jin Cheol Yoo, (2010) A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. CS684. *Process Biochemistry* 45 : 88-93
- Si-Kyung Lee, Joo-Yeon Hwang, Seung Hwa Choi, and Sang Moo Kim, (2010) Purification and Characterization of *Aspergillus oryzae* LK-101 Salt-tolerant Acid Protease Isolated from Soybean Paste. *Food Sci Biotechnol* 19 (2) : 327 -334



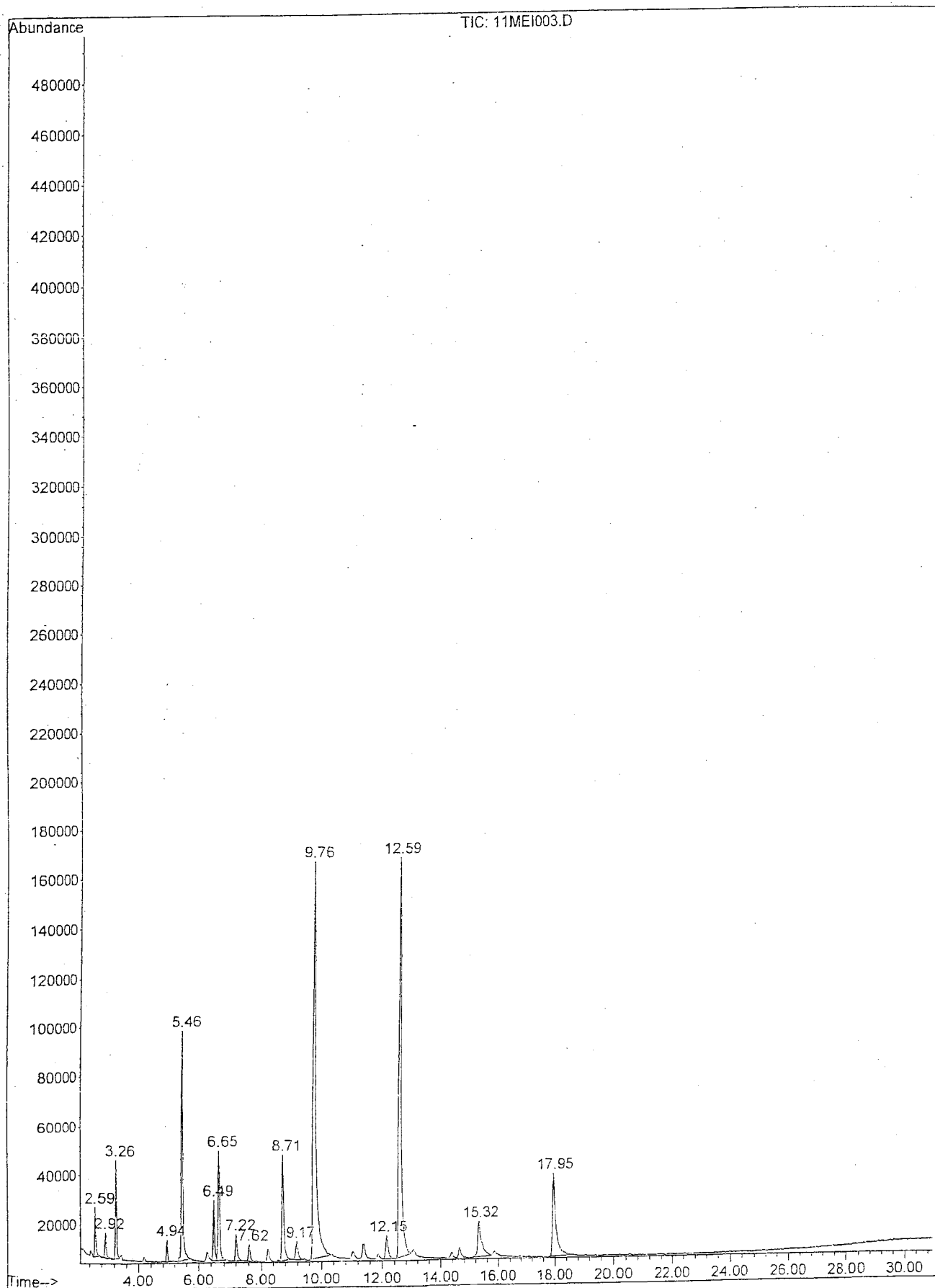
File : C:\MSDCHEM\1\DATA\bakteri\11MEI001.D  
Operator :  
Acquired : 11 May 2011 13:32 using AcqMethod FAME SPLITLESS.M  
Instrument : Instrument #1  
Sample Name: A-2  
Misc Info :  
Vial Number: 2



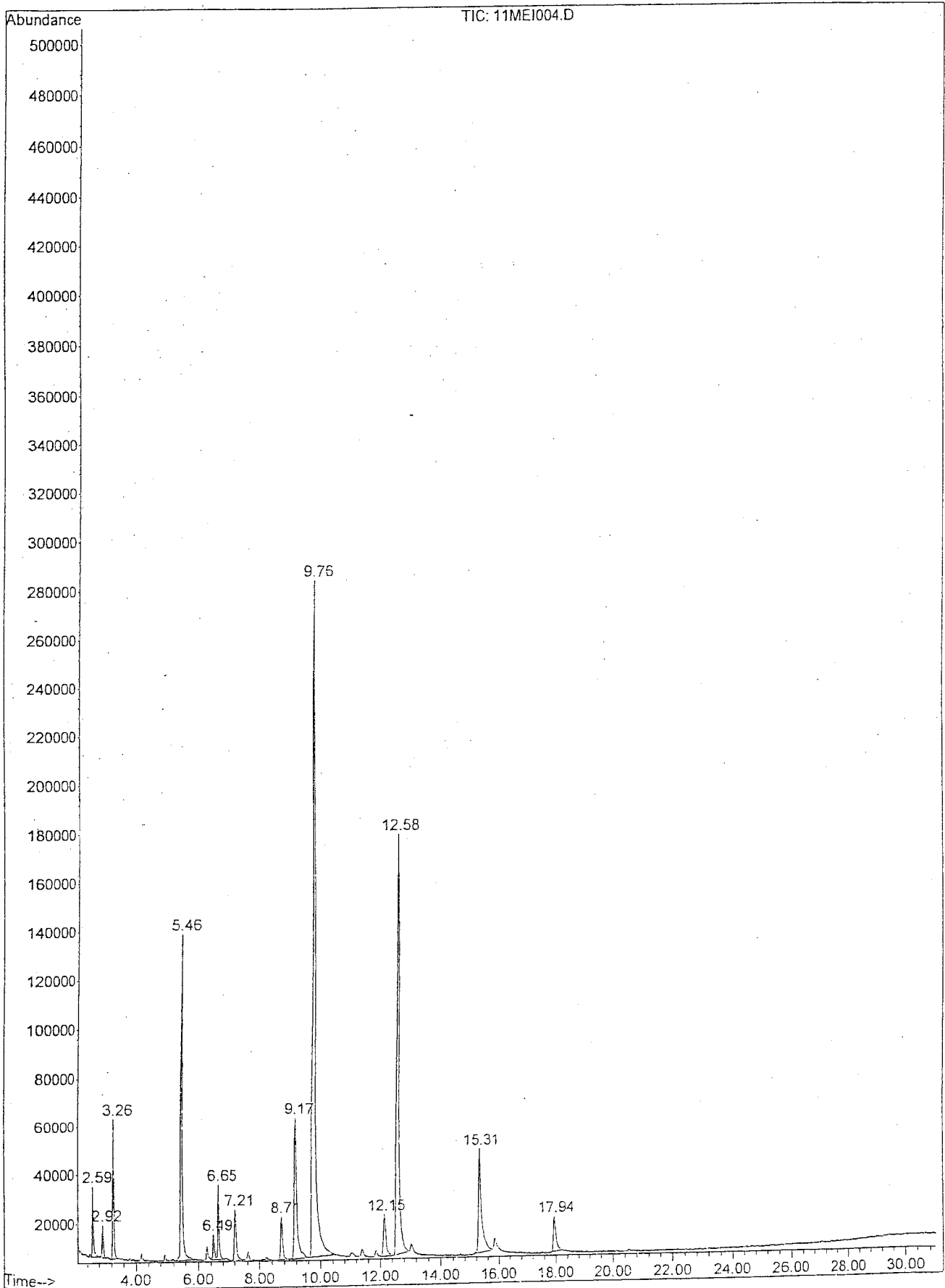
File : C:\MSDCHEM\1\DATA\bakteri\11MEI002.D  
Operator :  
Acquired : 11 May 2011 14:06 using AcqMethod FAME SPLITLESS.M  
Instrument : Instrument #1  
Sample Name: C-2  
Misc Info :  
Vial Number: 3



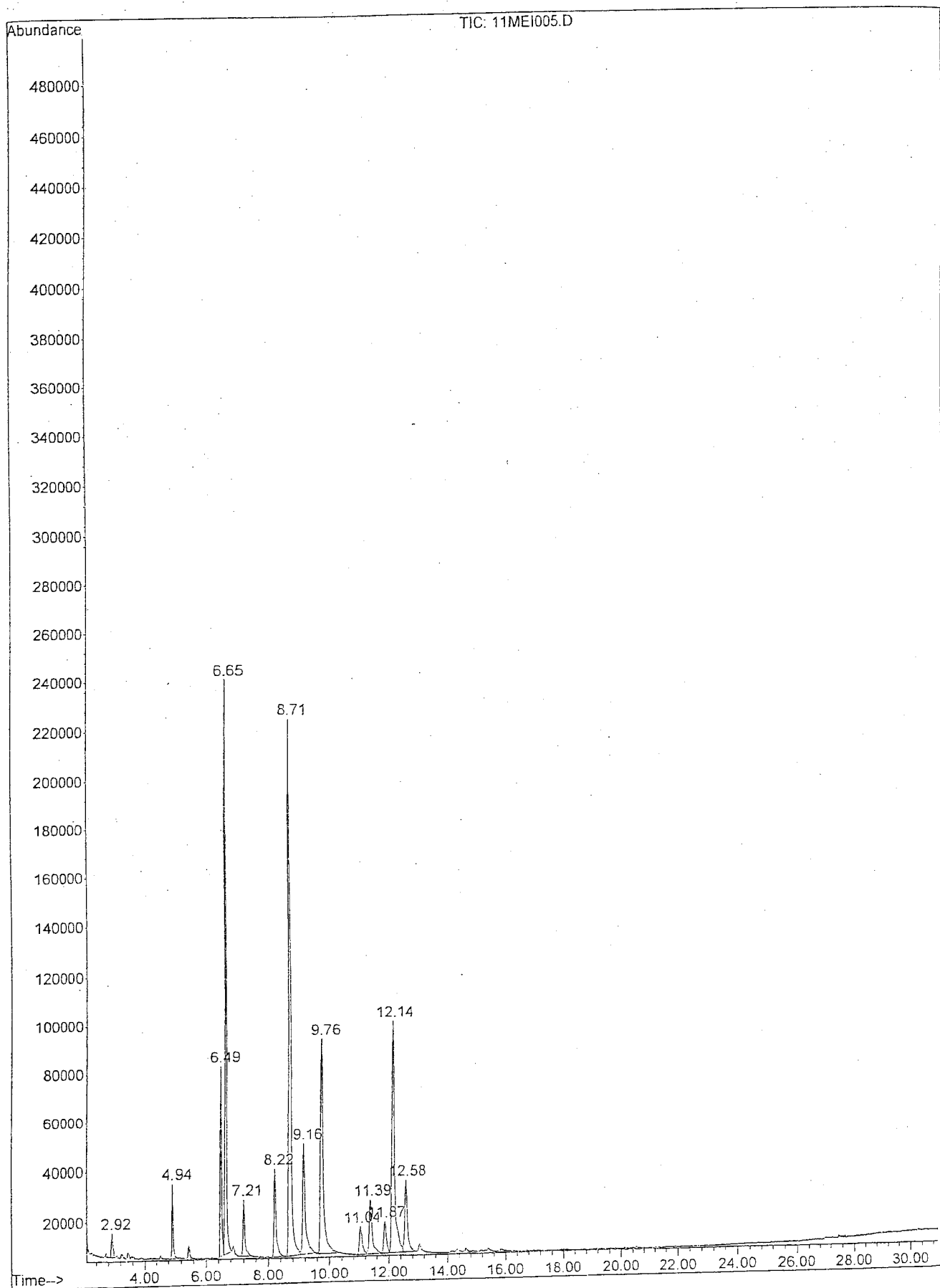
File : C:\MSDChem\1\DATA\bakteri\11MEI003.D  
 Operator :  
 Acquired : 11 May 2011 14:40 using AcqMethod FAME SPLITLESS.M  
 Instrument : Instrument #1  
 Sample Name: D-2  
 Misc Info :  
 Vial Number: 4



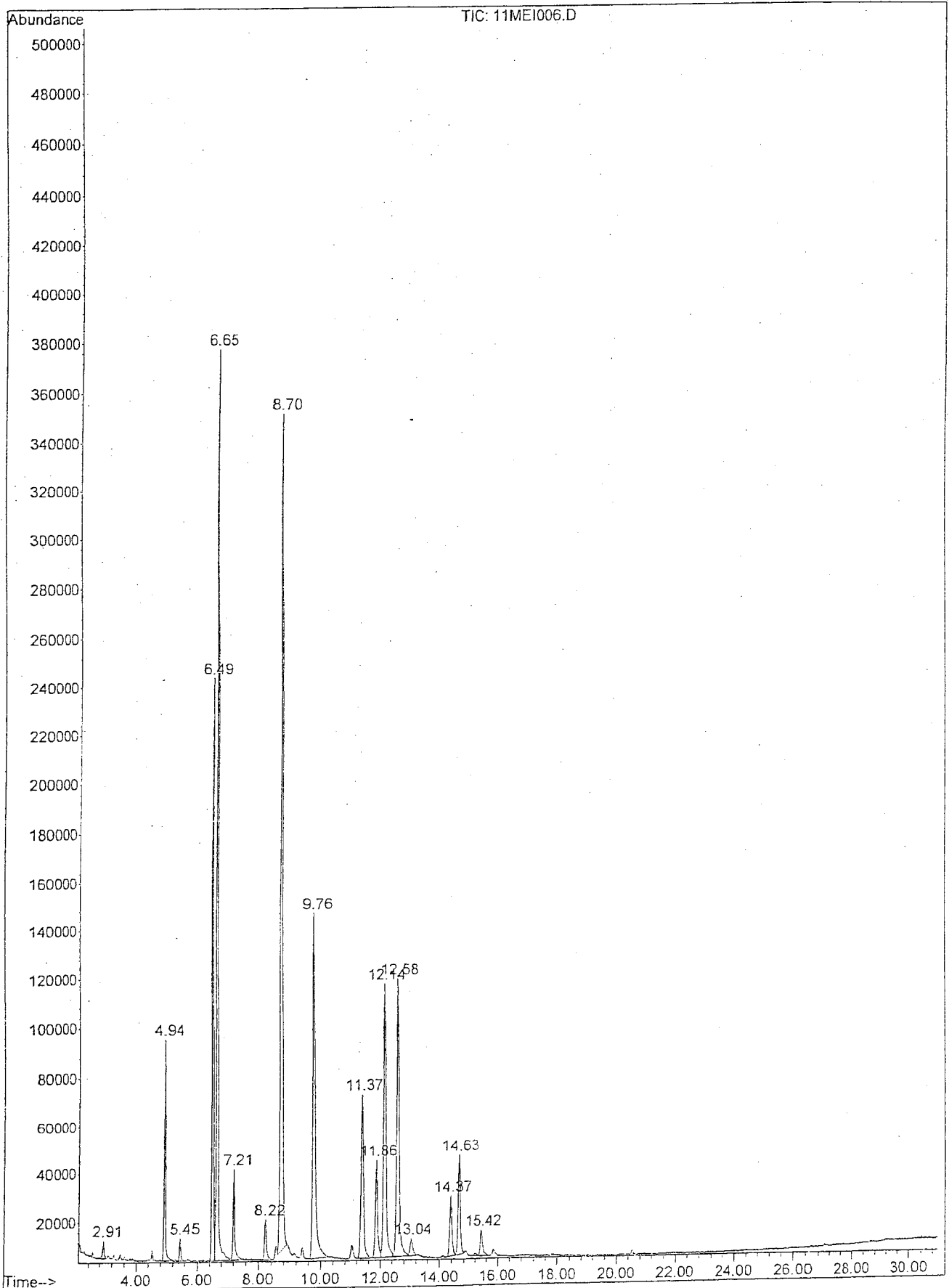
File : C:\MSDCHEM\1\DATA\bakteri\11MEI004.D  
 Operator :  
 Acquired : 11 May 2011 15:15 using AcqMethod FAME SPLITLESS.M  
 Instrument : Instrument #1  
 Sample Name: Ea-2  
 Misc Info :  
 Vial Number: 5



File : C:\MSDCHEM\1\DATA\bakteri\11MEI005.D  
Operator :  
Acquired : 11 May 2011 15:49 using AcqMethod FAME SPLITLESS.M  
Instrument : Instrument #1  
Sample Name: Ep-2  
Misc Info :  
Vial Number: 6

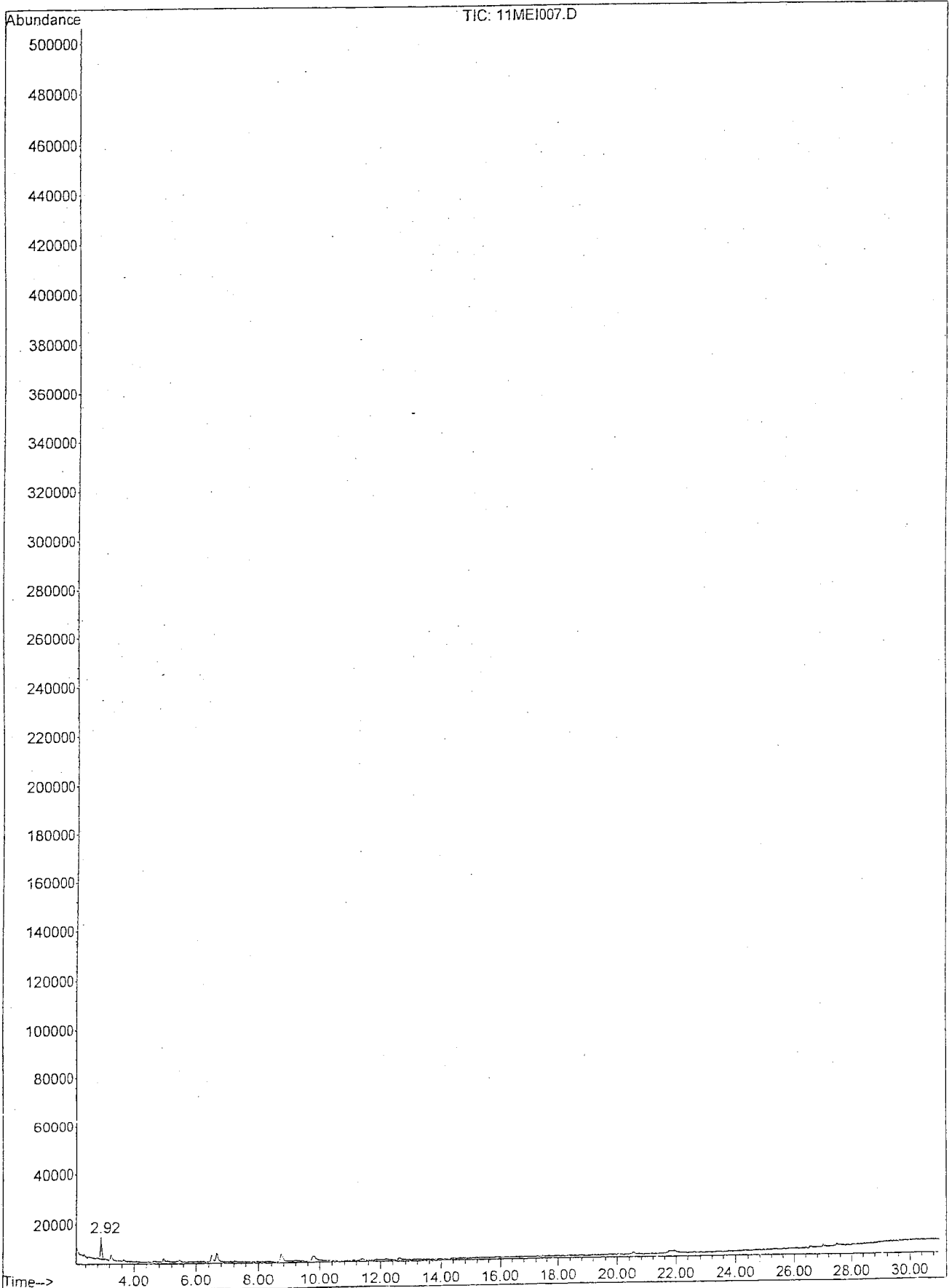


File : C:\MSDChem\1\DATA\bakteri\11MEI006.D  
Operator :  
Acquired : 11 May 2011 16:23 using AcqMethod FAME SPLITLESS.M  
Instrument : Instrument #1  
Sample Name: F-2  
Misc Info :  
Vial Number: 7

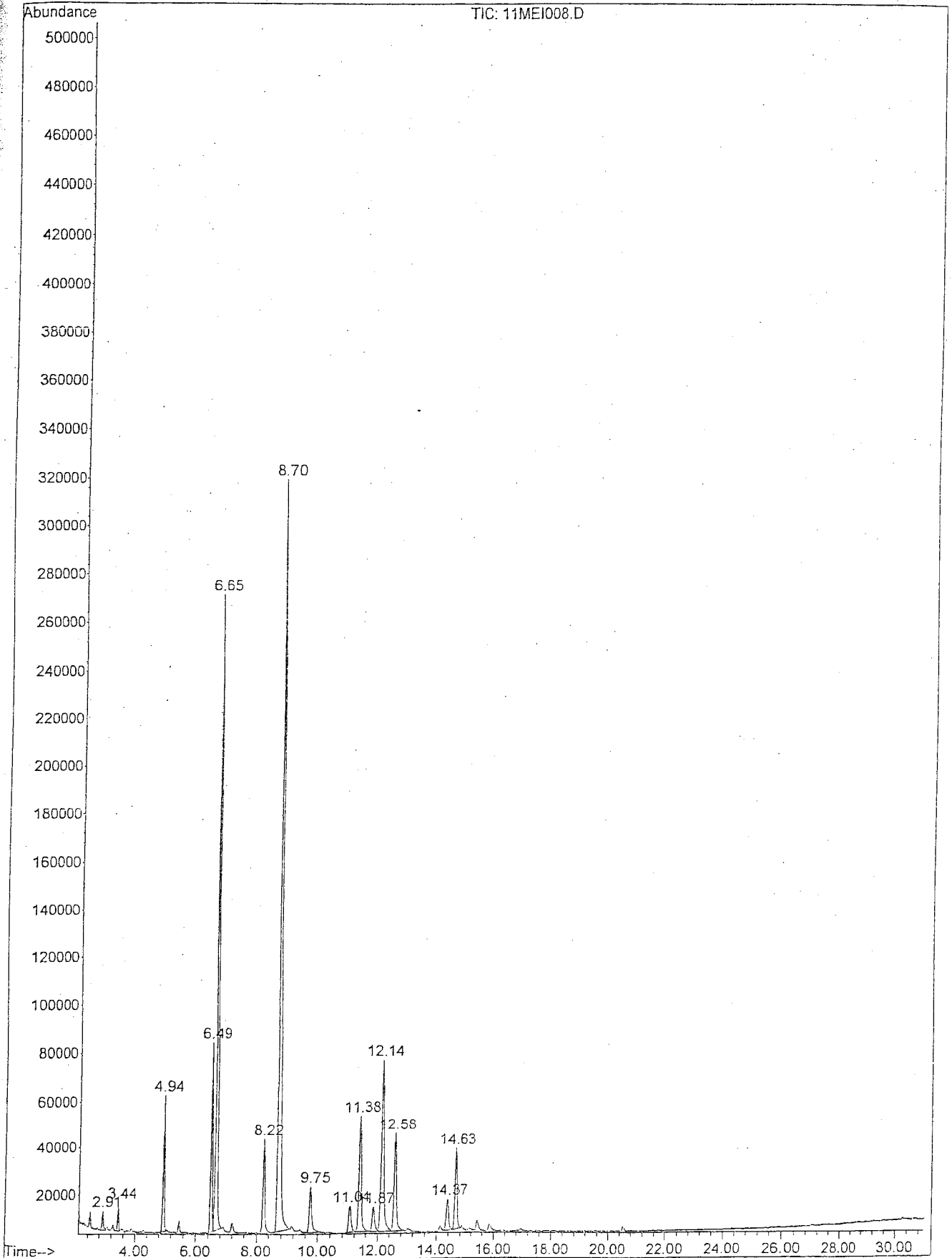




File : C:\MSDCHEM\1\DATA\bakteri\11MEI007.D  
Operator :  
Acquired : 11 May 2011 16:57 using AcqMethod FAME SPLITLESS.M  
Instrument : Instrument #1  
Sample Name: G-2  
Misc Info :  
Vial Number: 8



File : C:\MSDCHEM\1\DATA\bakteri\11MEI008.D  
Operator :  
Acquired : 11 May 2011 17:31 using AcqMethod FAME SPLITLESS.M  
Instrument : Instrument #1  
Sample Name: I-2  
Misc Info :  
Vial Number: 9



File : C:\MSDChem\1\DATA\bakteri\25041115.D  
Operator : C001  
Acquired : 25 Apr 2011 23:56 using AcqMethod FAME SPLITLESS.M  
Instrument : Instrument #1  
Sample Name: I-1  
Misc Info :  
Vial Number: 16

