

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1 HASIL PENELITIAN

5.1.1 Hasil Isolasi *Streptomyces* sp. dari Ekosistem *Mangrove* Pantai Utara Kenjeran Surabaya dan Probolinggo

Isolasi *Streptomyces* sp. dari tanah ekosistem *mangrove* dilakukan dengan metode Lempeng Agar. Metode ini dipilih karena mudah, ekonomis dan mampu menggambarkan profil produksi mikroba dalam segi jumlah dan diversitas populasi dalam sampel penelitian. Penggunaan media selektif ISP-4 (*International Streptomyces Project*) sangat mendukung untuk memperoleh *Streptomyces* sp. dan menekan pertumbuhan mikroba lain. *Streptomyces* sp. mempunyai pertumbuhan koloni yang muncul perlahan dan melekat pada agar dengan waktu 2-4 hari pada suhu kamar, berbentuk sirkuler, tidak tembus cahaya, kering, keruh, dan spora seperti butiran serbuk (Rao, 1986; Madigan *et al.*, 2002).

Hasil isolasi *Streptomyces* sp. dari tanah ekosistem *mangrove* pantai utara Kenjeran Surabaya dan Probolinggo menunjukkan bahwa koloni yang diduga *Streptomyces* sp. setelah penyimpanan pada suhu 28°C selama 2 hari mempunyai karakteristik, umumnya sebagai berikut, bau khas seperti tanah, koloni kecil, permukaan koloni yang mula-mula muncul pada hari ke 2 relatif licin, tetapi kemudian pada hari ke 4 membentuk miselium yang dapat menampakkan granularnya. Setelah koloni berumur 14 hari mempunyai ciri : koloni menjadi kering dan berbentuk butiran serbuk (Madigan *et al.*, 2002; Horinouchi, 1996).

Jenis-jenis *Streptomyces* sp. pada ekosistem *mangrove* pantai utara Kenjeran Surabaya dan Probolinggo tercantum pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Jenis-jenis *Streptomyces* sp. pada ekosistem *mangrove* pantai utara Kenjeran Surabaya dan Probolinggo

ISOLAT	LOKASI PENELITIAN		
	Pantai Utara Kenjeran Surabaya	Pantai Utara Probolinggo	
		Dalam KPH	Luar KPH
<i>Streptomyces</i> sp.-1	-	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.-2	+	+	-
<i>Streptomyces</i> sp.-3	+	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.-4	+	-	+

Keterangan gambar :

- + : ditemukan *Streptomyces* sp.
- : tidak ditemukan *Streptomyces* sp.

Menurut Burhan (1991) bahwa pencemaran air dapat memberikan pengaruh yang berbahaya kepada individu, populasi, dan ekosistem *mangrove*. Limbah pencemar dapat meningkatkan kandungan bahan organik terlarut di sepanjang pantai dan menyebabkan kondisi lingkungan kawasan pesisir menurun, sehingga dipilih lokasi penelitian ekosistem *mangrove* pantai utara Kenjeran Surabaya yang mengandung pencemaran tinggi dan pantai utara Probolinggo yang mengandung pencemaran rendah karena semakin tinggi bahan pencemar menyebabkan semakin sedikit jenis mikroba yang sanggup bertahan hidup, sehingga hanya spesies yang *survive* terhadap lingkungan ekstrim tersebut yang dapat hidup.

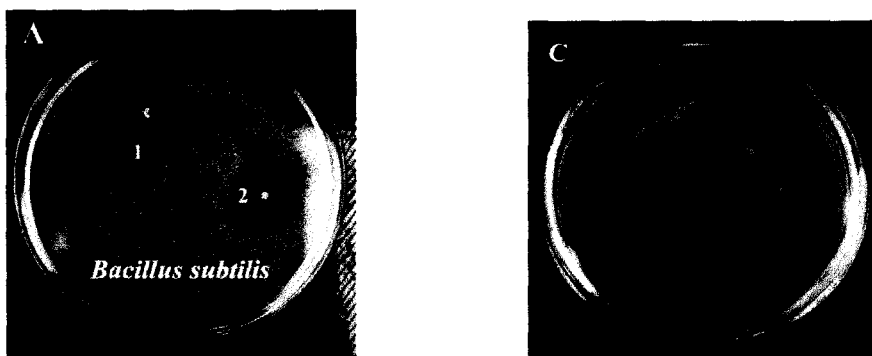
Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada pantai utara Kenjeran Surabaya yang mengandung pencemaran tinggi ditemukan 3 isolat *Streptomyces* sp. penghasil antibiotik, sedangkan pada daerah pantai utara Probolinggo yang mengandung pencemaran rendah ditemukan 4 isolat *Streptomyces* sp. penghasil antibiotik. Hal ini sesuai dengan pendapat Odum

(1993), bahwa semakin tinggi pencemaran, semakin sedikit diversitas jenis yang ditemukan pada komunitas tersebut.

5.1.1.2 Hasil Penapisan Aktivitas Antibakteri Isolat *Streptomyces* sp.

Penapisan aktivitas antibakteri isolat *Streptomyces* sp. dilakukan pada media *Nutrien Agar* menggunakan bakteri uji Gram negatif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* 25923) dan Gram positif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*).

Aktivitas antibakteri 1 Öse koloni *Streptomyces* sp. dinyatakan sebagai zona hambatan seperti tersaji pada Gambar 5.1 dan Tabel 5.4.



Gambar 5.1 A Penapisan aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp. terhadap *Bacillus subtilis* dengan metode difusi

1 : *Streptomyces* sp.-1

Zona hambatan yang terbentuk di sekitar *Streptomyces* sp.-1 merupakan petunjuk bahwa *Streptomyces* sp.-1 mampu menghasilkan antibiotik yang dapat menghambat *Bacillus subtilis*

2 : *Streptomyces* sp.-2

Zona hambatan yang terbentuk di sekitar *Streptomyces* sp.-2 merupakan petunjuk bahwa *Streptomyces* sp.-2 mampu menghasilkan antibiotik yang dapat menghambat *Bacillus subtilis*

Gambar 5.1 B Penapisan aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp. terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi

- 1 : *Streptomyces* sp.-1
Zona hambatan yang terbentuk di sekitar *Streptomyces* sp.-1 merupakan petunjuk bahwa *Streptomyces* sp.-1 mampu menghasilkan antibiotik yang dapat menghambat *Escherichia coli* ATCC 25922
- 2 : *Streptomyces* sp.-2
Zona hambatan yang terbentuk di sekitar *Streptomyces* sp.-2 merupakan petunjuk bahwa *Streptomyces* sp.-2 mampu menghasilkan antibiotik yang dapat menghambat *E. coli* ATCC 25922
- 3 : *Streptomyces* sp.-3
Zona hambatan yang terbentuk di sekitar *Streptomyces* sp.-3 merupakan petunjuk bahwa *Streptomyces* sp.-3 mampu menghasilkan antibiotik yang dapat menghambat *E. coli* ATCC 25922

Hasil penapisan awal aktivitas isolat *Streptomyces* sp. terhadap bakteri uji Gram negatif dan Gram positif, tersaji pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Penapisan aktivitas isolat *Streptomyces* sp. pada media Nutrien Agar dengan metode difusi

Bakteri uji	<i>Streptomyces</i>			
	sp.- 1	sp.- 2	sp.- 3	sp.-4
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	+	+

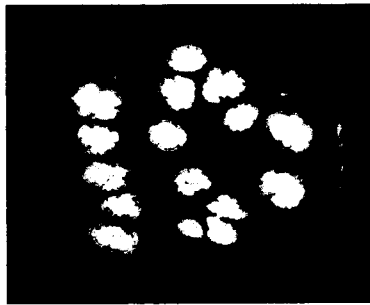
Keterangan :

- + : mampu menghambat mikroba uji
- : tidak mampu menghambat mikroba uji

Dari Tabel 5.2 diketahui bahwa isolat *Streptomyces* sp.-1, sp.-2, sp.-3, dan sp.-4, mampu menghambat *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhimurium*.

5.1.1.3 Karakteristik Morfologi *Streptomyces* sp. secara Makroskopis

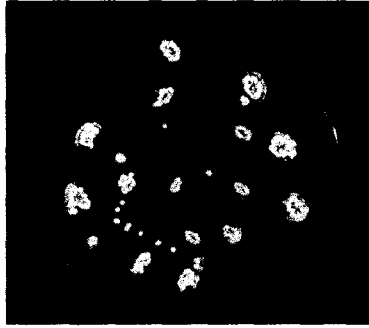
Untuk mengetahui bentuk masing-masing koloni *Streptomyces* sp., maka satu Öse *Streptomyces* sp. dari biakan agar miring ditanam ke dalam media ISP-4 yang datar di dalam cawan petri seperti tersaji pada Gambar 5.2 sampai Gambar 5.5. Koloni *Streptomyces* sp. berukuran kecil, terpisah-pisah dan seperti kulit. Permukaan koloni mula-mula relatif licin tetapi kemudian membentuk miselium udara yang dapat menampakkan granularnya, seperti bubuk, dan berbau khas seperti tanah. *Streptomyces* sp. menghasilkan berbagai macam pigmen yang menimbulkan warna pada miselium vegetatif, miselium udara dan miselium substrat.



Gambar 5.2 Koloni *Streptomyces* sp.-1
Mempunyai ciri-ciri morfologi yaitu warna koloni putih, tekstur koloni kering, keruh dan tidak tembus cahaya

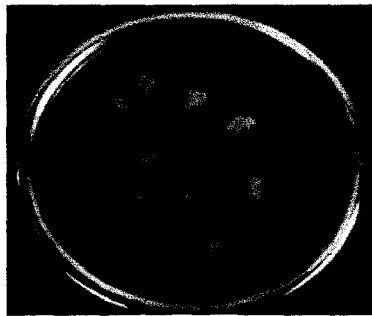


Gambar 5.3 Koloni *Streptomyces* sp.-2
Mempunyai ciri-ciri morfologi yaitu warna koloni putih kekuningan, permukaan koloni cembung, tekstur koloni kering, keruh dan tidak tembus cahaya



Gambar 5.4 Koloni *Streptomyces* sp.-3

Mempunyai ciri-ciri morfologi yaitu warna koloni putih, permukaan koloni cembung, tekstur koloni kering, keruh dan tidak tembus cahaya



Gambar 5.5 Koloni *Streptomyces* sp.-3

Mempunyai ciri-ciri morfologi yaitu warna koloni putih kekuningan, permukaan koloni cembung, tekstur koloni kering, keruh dan tidak tembus cahaya

Karakteristik dari 4 isolat *Streptomyces* sp. yang memiliki aktivitas antimikroba tersebut mempunyai karakteristik makroskopis yang berbeda-beda dalam bentuk koloni, warna koloni, tekstur koloni, tetes dan warna eksudat, serta pertumbuhan koloni yang dapat dilihat pada Tabel 5.3, sehingga dapat disimpulkan bahwa ke-6 isolat tersebut berbeda jenisnya.

Tabel 5.3 Karakteristik makroskopis *Streptomyces* sp. Isolat Tanah Ekosistem *Mangrove* Pantai Utara Kenjeran Surabaya dan Probolinggo

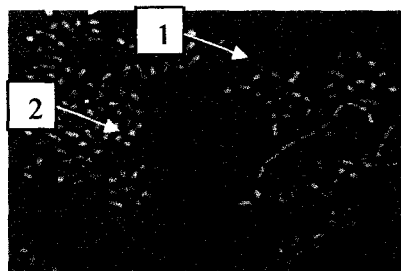
Karakterisasi	Isolat <i>Streptomyces</i>			
	sp.-1	sp.- 2	sp.- 3	sp. -4
Bentuk koloni	Sirkuler, permukaan cembung	Sirkuler, permukaan cembung	Sirkuler, permukaan cembung	Sirkuler, permukaan cembung
Warna koloni	Putih	Putih Kekuningan	Putih	Putih Kekuningan
Tekstur koloni	Tidak tembus cahaya, kering, keruh	Tidak tembus cahaya, kering, keruh	Tidak tembus cahaya, kering, keruh	Tidak tembus cahaya, kering, keruh
Tetes dan warna eksudat	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada
Pertumbuhan koloni	Pertumbuhan spora tebal dan Cepat	Pertumbuhan spora agak tebal , lambat	Pertumbuhan spora tidak tebal, agak cepat	Pertumbuhan spora tidak Tebal, lambat

5.1.1.4 Karakteristik Morfologi *Streptomyces* sp. secara Mikroskopis

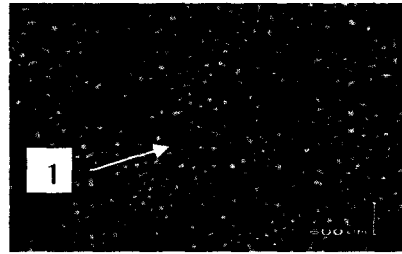
Streptomyces sp. mempunyai hifa ramping. Miselium udaranya bila dewasa membentuk rantai yang terdiri dari tiga sampai banyak spora. Gambar *Streptomyces* sp. secara mikroskopis dapat dilihat pada Gambar 5.6 sampai Gambar 5.9.



Gambar 5.6 Spora *Streptomyces* sp.-1
1. Kotak spora
Perbesaran (400 X)



Gambar 5.7 Spora *Streptomyces* sp.-2
1. hifa 2. spora
Perbesaran (400 X)



Gambar 5.8 Spora *Streptomyces* sp.-3
1. spora 2. hifa
(Perbesaran 400 X)

Gambar 5.9 Spora *Streptomyces* sp.-4
1. spora
(Perbesaran 400X)

5.1.1.5 Identifikasi dengan Pewarnaan Gram

Hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa semua isolat menunjukkan warna yang sama yaitu biru keunguan yang berarti *Streptomyces* sp. merupakan bakteri Gram positif.

5.1.1.6 Pengaruh sumber karbohidrat terhadap pertumbuhan dan identifikasi *Streptomyces* sp.

Isolat *Streptomyces* sp. dapat tumbuh pada beberapa media karbohidrat seperti tercantum pada Tabel 5.4. Karbohidrat yang digunakan antara lain arabinosa, xilosa, manitol, laktosa, sakarosa, amilum dengan konsentrasi masing-masing 2% dalam media yang mengandung agar 2%.

Tabel 5.4 Pengaruh sumber karbohidrat terhadap pertumbuhan isolat *Streptomyces* sp.

Spesies	Macam Sakarida					
	Arabinosa	Xilosa	Manitol	Laktosa	Sakarosa	Amilum
<i>Streptomyces</i> sp.-1	-	-	-	-	-	+
<i>Streptomyces</i> sp.-2	+	-	+	-	+	+
<i>Streptomyces</i> sp.-4	-	-	+	+	-	+
<i>Streptomyces</i> sp.-3	+	+	+	+	+	+

Keterangan :

+ = tumbuh

- = tidak dapat tumbuh

Dari 6 karbohidrat yang digunakan diketahui bahwa masing-masing *Streptomyces* sp. dapat tumbuh pada media karbohidrat yang berbeda-beda, karena sumber karbon yang dipergunakan juga berbeda. *Streptomyces* sp. yang dapat tumbuh pada arabinosa adalah *Streptomyces* sp.-2 dan sp.-3; yang tumbuh pada xilosa hanya *Streptomyces* sp.-3; yang tumbuh pada manitol adalah *Streptomyces* sp.-2, sp.-3, dan sp.-4; yang tumbuh pada laktosa adalah *Streptomyces* sp.-3 dan sp.-4; yang tumbuh pada sakarosa adalah *Streptomyces* sp.-2, dan sp.-3; dan semua *Streptomyces* sp.-1, sp.-2, sp.-3, sp.-4 dapat tumbuh pada amilum.

Data ini mengindikasikan bahwa ke-4 spesies tersebut tidak sama atau berbeda satu sama lain.

5.1.1.7 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri *Streptomyces* sp.

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Bacillus subtilis* mewakili bakteri Gram positif, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, dan *Salmonella typhimurium* mewakili bakteri Gram negatif. Pemilihan bakteri uji tersebut didasarkan atas pertimbangan karena mempunyai aktivitas yang sangat kuat dan sering menimbulkan penyakit serta masing-masing mewakili Gram positif dan Gram negatif untuk mengetahui antibiotik berspektrum luas.

Metode difusi modifikasi cetak Agar digunakan untuk mengetahui secara kualitatif produksi antibiotik isolat *Streptomyces* sp. terhadap bakteri uji dengan terbentuknya diameter zona hambatan di sekitar koloni (Schlegel, 1994). Metode difusi merupakan metode alternatif terbaik untuk penapisan isolat *Streptomyces* sp., karena mudah dilakukan dan ekonomis, walaupun

mempunyai kekurangan yaitu pertumbuhan *Streptomyces* sp. di media pembiakan ISP-4 bersifat fluktuatif, sehingga jumlah *Streptomyces* sp. yang terambil dalam cetakan Agar setiap perlakuan berbeda dan diameter zona hambatan yang terbentuk tidak dapat terukur secara kuantitatif, sehingga diperlukan replikasi yang banyak.

Penelitian ini menggunakan standar streptomisin sulfat sebagai salah satu turunan aminoglikosida untuk mengetahui apakah bakteri uji yang digunakan dapat menunjukkan respon terhadap antibiotik tersebut, sehingga layak digunakan sebagai bakteri uji.

Pada uji aktivitas antibakteri, terlebih dahulu dilakukan proses fermentasi antibiotik *Streptomyces* sp. Pada prinsipnya alur fermentasi untuk proses uji aktivitas antibakteri digunakan *Nutrient Agar* sebagai media non selektif untuk pertumbuhan bakteri uji yang digunakan. Ketebalan media uji aktivitas yang mengandung bakteri uji harus sama dan homogen untuk menghindari agar tidak terjadi fluktuasi diameter zona hambatan yang dihasilkan. Bakteri uji yang digunakan harus mempunyai transmittan 25%, karena pada transmittan 25% jumlah sel mikroba uji sesuai untuk uji dan berada pada fase logaritmik, sehingga berada pada kondisi paling peka terhadap antibiotik.

Data yang diperoleh pada Tabel 5.5 sampai Tabel 5.8 dan Gambar 5.10 sampai Gambar 5.14 menunjukkan awal aktivitas, lamanya aktivitas antibakteri selama periode pengamatan, dan diameter zona hambatan yang terbentuk.

Dari uji kualitatif aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa *Streptomyces* sp. penghasil antibiotik yang ditemukan pada ekosistem *mangrove* pantai timur Surabaya merupakan spesies yang sangat potensial, karena mempunyai daya

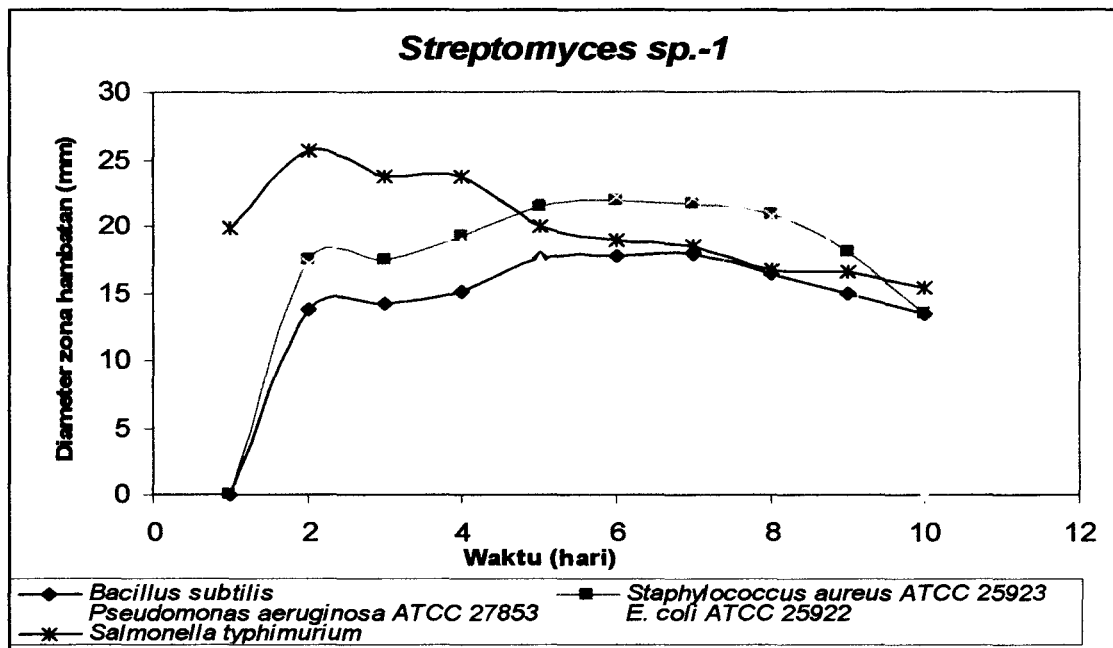
hambat yang lebih besar dari kontrol positif streptomisin 250 ppm terhadap bakteri uji. Besarnya aktivitas antibakteri isolat *Streptomyces* sp. tersebut dalam menghambat bakteri patogen merupakan peluang untuk dikembangkan sebagai alternatif obat penyakit infeksi yang lebih efektif sebagai antibiotik berspektrum luas.

5.1.1.7.1 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri *Streptomyces* sp.-1

Aktivitas isolat *Streptomyces* sp.-1 dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji yang dinyatakan sebagai zona hambatan ditunjukkan pada Tabel 5.5 dan Gambar profil aktivitas pada Gambar 5.10.

Tabel 5.5 Diameter zona hambatan yang terbentuk dari hasil uji aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp.-1 terhadap bakteri uji dengan metode difusi modifikasi cetak Agar

Bakteri uji	Diameter zona hambatan terhadap bakteri uji (mm)										
	Streptomisin	hari ke -									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Bacillus subtilis</i>	20,6	0	13,7	14,2	15,1	17,6	17,8	17,9	16,4	15,0	13,4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	14,4	0	17,4	17,5	19,3	21,5	21,9	21,6	20,9	18,0	13,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	16,0	12,9	24,9	20,5	18,7	17,4	15,7	14,3	22,5	16,2	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,9	15,1	17,1	20,9	21,3	22,4	22,2	22,1	20,8	19,4	17,3
<i>Salmonella typhimurium</i>	13,4	19,8	25,7	23,7	23,7	20,0	18,9	18,5	16,7	16,5	15,3



Gambar 5.10 Profil aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp.-1

Isolat *Streptomyces* sp.-1 ternyata mempunyai aktivitas terhadap bakteri uji Gram positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), dan Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*) yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambatan. Aktivitas yang dihasilkan terhadap bakteri uji berbeda-beda dalam hal awal waktu terdeteksinya, besarnya diameter zona hambatan, lamanya aktivitas untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji, dan waktu yang diperlukan untuk mencapai puncak produksi antibiotik.

Isolat *Streptomyces* sp.-1 menunjukkan aktivitas terhadap *Bacillus subtilis* mulai hari ke-2 yang ditunjukkan diameter zona hambatan sebesar 13,7 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-7 dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 17,9 mm. Pada hari ke-8 sampai ke-10 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil.

Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, isolat *Streptomyces* sp.-1 menunjukkan aktivitas mulai pada hari ke-2 yang ditunjukkan diameter zona hambatan sebesar 17,4 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-6 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 21,9 mm. Pada hari ke-7 sampai ke-10 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil.

Isolat *Streptomyces* sp.-1 menunjukkan aktivitas terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mulai hari ke-1 yang ditunjukkan diameter zona hambatan sebesar 12,9 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-2 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambat paling besar yaitu 24,9 mm. Pada hari ke-3 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil dan pada hari ke -10 aktivitas mulai berhenti.

Terhadap *E. coli* ATCC 25922, isolat *Streptomyces* sp.-1 menunjukkan aktivitas mulai hari ke-1 yang ditunjukkan diameter zona hambatan sebesar 15,1 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-5 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 22,4 mm. Pada hari ke-6 sampai ke-10 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil.

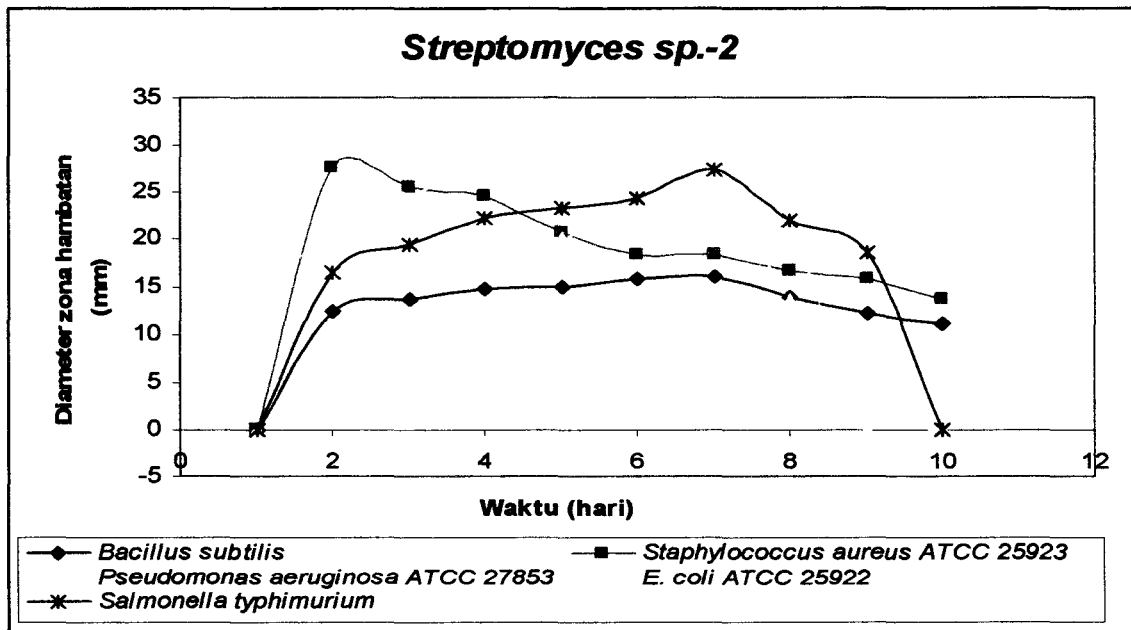
Isolat *Streptomyces* sp.-1 menunjukkan aktivitas terhadap *Salmonella typhimurium* mulai hari ke-1 yang ditunjukkan diameter zona hambatan sebesar 19,8 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-2 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 25,7 mm. Pada hari ke-3 sampai ke-10 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil.

5.1.1.7.2 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri *Streptomyces* sp.-2

Aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp.-2 dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji yang dinyatakan sebagai zona hambatan ditunjukkan pada Tabel 5.6 dan Gambar profil aktivitas pada Gambar 5.11.

Tabel 5.6 Diameter zona hambatan yang terbentuk dari hasil uji aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp.-2 terhadap bakteri ji dengan metode difusi modifikasi cetak Agar

Bakteri uji	Diameter zona hambatan terhadap bakteri uji (mm)										
	Streptomisin	hari ke -									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Bacillus subtilis</i>	21,4	0	12,2	13,7	14,7	14,9	15,8	15,9	13,9	12,1	11
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	14,0	0	27,6	25,5	24,7	20,8	18,3	18,3	16,7	15,8	13,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	16,2	0	13,8	15,2	16,3	20	21,9	24,3	13,6	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,0	14,3	20,8	24,4	28,9	29,2	24,5	21,8	20,7	0	0
<i>Salmonella Typhimurium</i>	12,5	0	16,5	19,4	22,3	23,3	24,5	27,5	22	18,6	0



Gambar 5.11 Profil uji aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp.-2

Isolat *Streptomyces* sp.-2 ternyata mempunyai aktivitas terhadap bakteri uji Gram positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), dan Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*) yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambatan. Aktivitas yang dihasilkan terhadap bakteri uji berbeda-beda dalam hal awal waktu terdeteksinya, besarnya diameter zona hambatan, lamanya aktivitas untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji, dan waktu yang diperlukan untuk mencapai puncak produksi antibiotik.

Isolat *Streptomyces* sp.-2 menunjukkan aktivitas terhadap *Bacillus subtilis* mulai hari ke-2 yang ditunjukkan diameter zona hambatan sebesar 12,2 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-7 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 15,9 mm. Pada hari ke-8 sampai hari ke-10 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil.

Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, isolat *Streptomyces* sp.-2 menunjukkan aktivitas dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-2 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 27,6 mm. Pada hari ke-3 sampai hari ke-10 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil.

Isolat *Streptomyces* sp.-2 menunjukkan aktivitas terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mulai hari ke-2 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan sebesar 13,8 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-7 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 24,3 mm. Pada hari ke-8 mengalami penurunan aktivitas

yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil dan pada hari ke -9 aktivitas mulai berhenti.

Terhadap *E. coli* ATCC 25922, isolat *Streptomyces* sp.-2 menunjukkan aktivitas mulai pada hari ke-1 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan sebesar 12,0 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-5 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 29,2 mm. Pada hari ke-6 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil dan pada hari ke -9 aktivitas mulai berhenti.

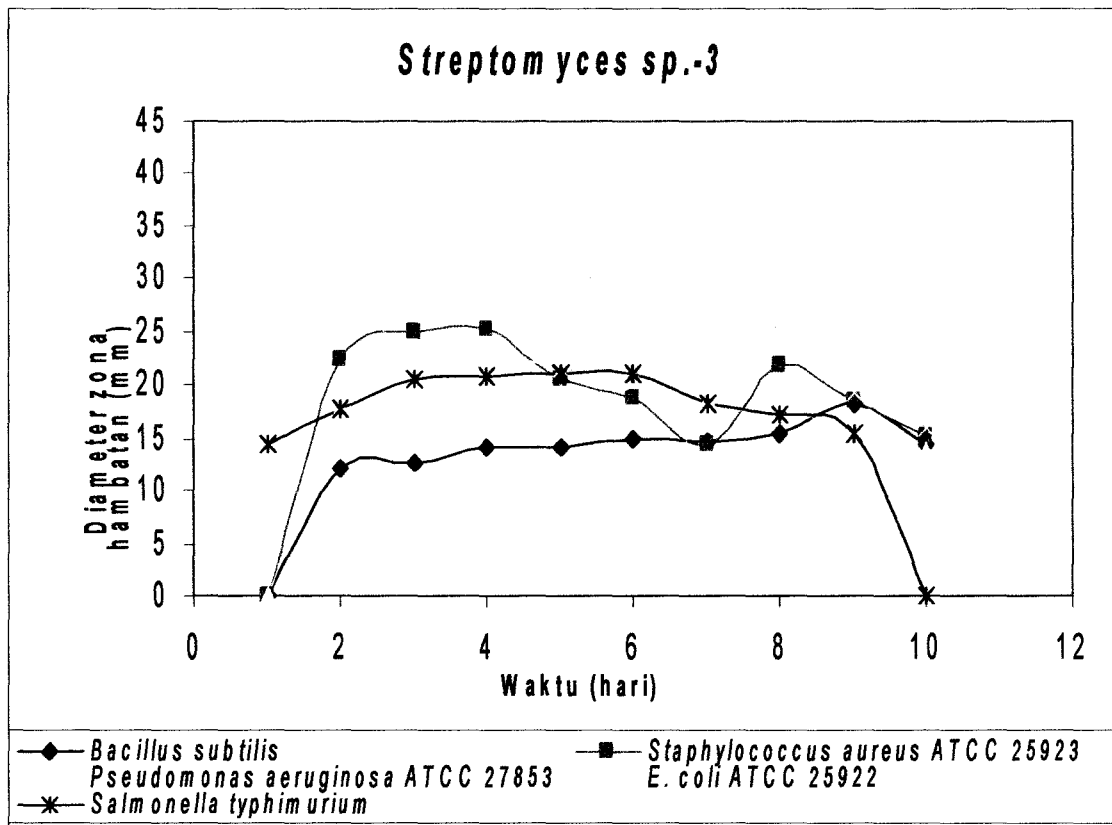
Isolat *Streptomyces* sp.-2 menunjukkan aktivitas terhadap *Salmonella typhimurium* mulai hari ke-2 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan sebesar 16,5 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-7 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 27,5 mm. Pada hari ke-7 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil dan pada hari ke -10 aktivitas mulai berhenti.

5.1.1.7.3 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri *Streptomyces* sp.-3

Aktivitas isolat *Streptomyces* sp.-3 dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji yang dinyatakan sebagai zona hambatan ditunjukkan pada Tabel 5.7 dan Gambar profil aktivitas pada Gambar 5. 12.

Tabel 5.7 Diameter zona hambatan yang terbentuk dari hasil uji aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp.-3 terhadap bakteri uji dengan metode difusi modifikasi cetak Agar

Bakteri uji	Diameter zona hambatan terhadap bakteri uji (mm)										
	Streptomisin	hari ke -									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Bacillus subtilis</i>	21,0	0	12,1	12,6	14,2	14,2	14,8	14,7	15,5	18,3	14,4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	14,2	0	22,3	24,9	25,3	20,6	18,8	14,3	21,8	18,4	15,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15,8	0	17,9	18,5	18,9	19,3	42,4	18,9	18,7	14,5	14,0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	13,3	16,2	27,3	22,8	22,8	21,6	20,3	16,3	24,9	19,4	16
<i>Salmonella typhimurium</i>	12,7	14,5	17,7	20,6	20,8	21	21,2	18,3	17,2	15,5	0



Gambar 5.12 Profil uji aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp.-3

Isolat *Streptomyces* sp.-3 ternyata mempunyai aktivitas terhadap bakteri uji Gram positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), dan Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*) yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambatan. Aktivitas yang dihasilkan terhadap bakteri uji berbeda-beda dalam hal awal waktu terdeteksinya, besarnya diameter zona hambatan, lamanya aktivitas untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji, dan waktu yang diperlukan untuk mencapai puncak produksi antibiotik.

Isolat *Streptomyces* sp.-3 menunjukkan aktivitas terhadap *Bacillus subtilis* mulai hari ke-2 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan sebesar yaitu 12,1 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-9 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 18,3 mm. Pada hari ke-10 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil.

Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, isolat *Streptomyces* sp.-3 menunjukkan aktivitas mulai hari ke-2 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan sebesar 22,3 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-4 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 25,3 mm. Pada hari ke-5 hingga hari ke-10 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil.

Isolat *Streptomyces* sp.-3 menunjukkan aktivitas terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mulai hari ke-2 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan sebesar 17,9 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-6 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 42,4

mm. Pada hari ke-7 hingga hari ke-10 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil.

Terhadap *E. coli* ATCC 25922, isolat *Streptomyces* sp.-3 menunjukkan aktivitas mulai hari ke-1 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan sebesar 16,2 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-2 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 27,3 mm. Pada hari ke-3 hingga hari ke-10 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil.

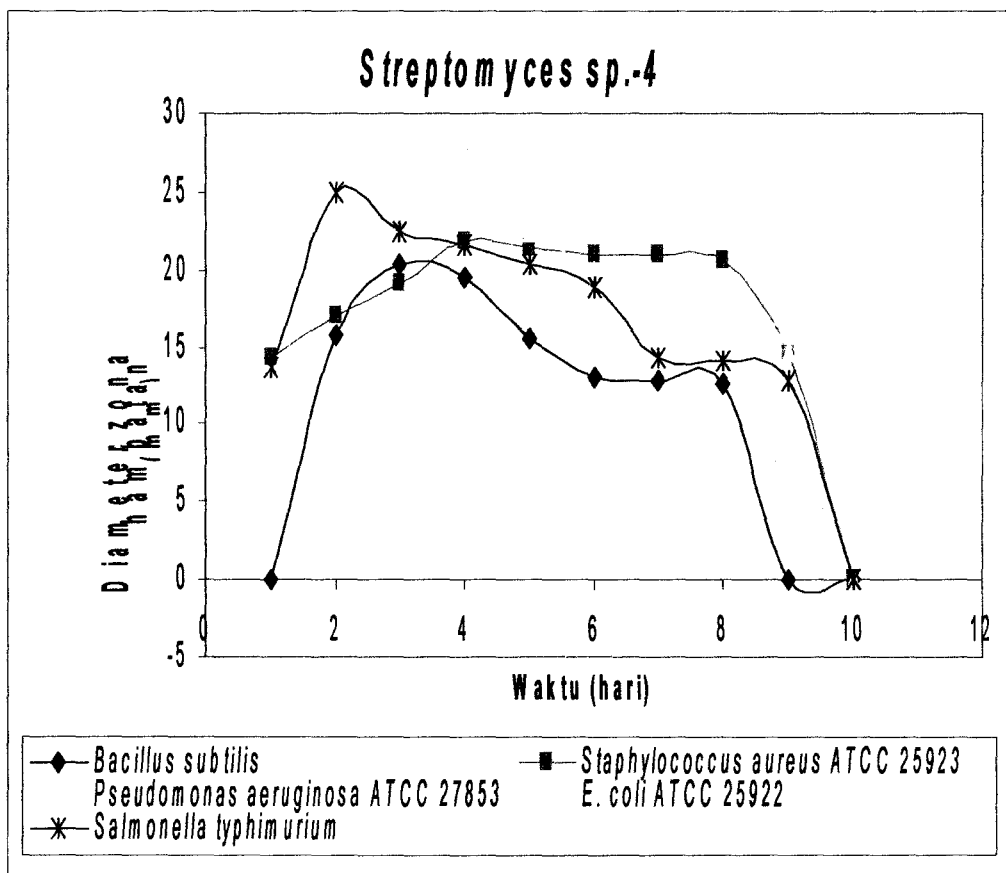
Isolat *Streptomyces* sp.-3 menunjukkan aktivitas terhadap *Salmonella typhimurium* mulai hari ke-1 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan sebesar 14,5 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-4 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 20,8 mm. Pada hari ke-5 hingga hari ke-9 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil dan aktivitas mulai berhenti pada hari ke-10.

5.1.1.7.4 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri *Streptomyces* sp.- 4

Aktivitas isolat *Streptomyces* sp.-4 dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji yang dinyatakan sebagai zona hambatan ditunjukkan pada Tabel 5.8 dan Gambar profil aktivitas pada Gambar 5.13.

Tabel 5.8 Diameter zona hambatan yang terbentuk dari hasil uji aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp.-4 terhadap bakteri uji dengan metode difusi modifikasi cetak Agar

Bakteri uji	Diameter zona hambatan terhadap bakteri uji (mm)										
	Streptomisin	hari ke -									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Bacillus subtilis</i>	20,0	0	15,7	20,4	19,6	15,5	13,1	12,8	12,6	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13,9	14,3	17,1	19,2	21,8	21,5	20,9	20,9	20,6	14,4	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	16,0	17,8	27,9	26,6	23,7	22,5	20,0	18,6	18,3	14,7	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	12,9	12,9	20,6	23,1	27,8	19,5	19,5	18,9	17,2	15,3	0
<i>Salmonella Typhimurium</i>	13,4	13,6	25,0	22,5	21,6	20,3	18,8	14,2	14,1	12,8	0



Gambar 5.13 Profil uji aktivitas antibakteri *Streptomyces* sp.-4

Isolat *Streptomyces* sp.-4 ternyata mempunyai aktivitas terhadap bakteri uji Gram positif (*Bacillus subtilis* *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), dan Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium*) yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambatan. Aktivitas yang dihasilkan terhadap bakteri uji berbeda-beda dalam hal awal waktu terdeteksinya, besarnya diameter zona hambatan, lamanya aktivitas untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji, dan waktu yang diperlukan untuk mencapai puncak produksi antibiotik.

Isolat *Streptomyces* sp.-4 menunjukkan aktivitas terhadap *Bacillus subtilis* mulai hari ke-2 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan sebesar 15,7 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-3 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 20,4 mm. Pada hari ke-4 hingga hari ke-8 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil dan pada hari ke-9 aktivitas mulai terhenti.

Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, isolat *Streptomyces* sp.-4 menunjukkan aktivitas mulai pada hari ke-1 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan sebesar 14,3 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-4 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 21,8 mm. Pada hari ke-5 hingga hari ke-9 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil dan pada hari ke-10 aktivitas mulai terhenti.

Isolat *Streptomyces* sp.-4 menunjukkan aktivitas terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mulai pada hari ke-1 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan sebesar 17,8 mm dan mencapai puncak aktivitas

pada hari ke-2 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 27,9 mm. Pada hari ke-3 hingga hari ke-9 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil dan pada hari ke-10 aktivitas mulai terhenti.

Terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, isolat *Streptomyces* sp.-4 menunjukkan aktivitas mulai hari ke-1 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan sebesar 12,9 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-4 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 27,8 mm. Pada hari ke-5 hingga hari ke-9 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil dan pada hari ke-10 aktivitas mulai terhenti.

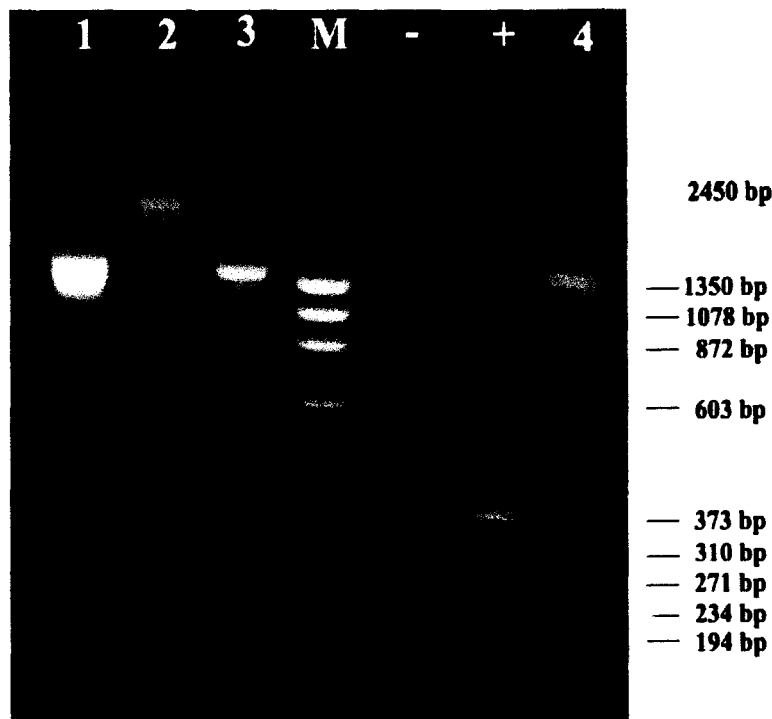
Isolat *Streptomyces* sp.-4 menunjukkan aktivitas terhadap *Salmonella typhimurium* mulai hari ke-1 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan sebesar 13,6 mm dan mencapai puncak aktivitas pada hari ke-2 yang ditunjukkan dengan diameter zona hambatan paling besar yaitu 25,0 mm. Pada hari ke-3 hingga hari ke-9 mengalami penurunan aktivitas yang ditunjukkan dengan besar diameter zona hambatan yang semakin kecil dan pada hari ke-10 aktivitas mulai terhenti.

Pada uji aktivitas terhadap 4 isolat *Streptomyces* sp. ternyata masing-masing isolat memiliki aktivitas yang berbeda-beda terhadap bakteri uji dalam hal memberikan aktivitas, lama aktivitas, dan besarnya zona hambatan, yang berarti bahwa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh ke-4 isolat *Streptomyces* sp. tersebut memiliki kekuatan yang berbeda terhadap *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhimurium*.

5.1.1.8 Hasil PCR isolat *Streptomyces* sp.

Metode PCR digunakan untuk memperbanyak segmen untai DNA target dengan cepat, namun untuk memperoleh hasil yang baik diperlukan suhu dan waktu *annealing* tertentu. Kondisi PCR yang tidak optimal menyebabkan timbulnya pita yang tidak spesifik atau jumlah produk yang rendah (Broker, 1999). Pada tahap PCR, dipilih isolat *Streptomyces* sp. yang mempunyai nukleotida sekitar 1500 (Zhang *et al.*, 2003) karena primer yang digunakan pada penelitian (5'-AG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' dan 5'-AA GGA GGT GAT CCA GCC GC-3') mempunyai target 12-34 bp dan 1508-1529 bp (Pfister, *et al.*, 2003). Urutan primer 16S rRNA universal dapat dipergunakan untuk identifikasi *Streptomyces* sp. karena sekuen 16S RNA yang mempunyai panjang 1500 bp merupakan daerah konservatif (tidak banyak berubah dari organisme satu ke organisme lain) sehingga sekuen yang diperoleh dipergunakan untuk identifikasi mikroba.

Hasil PCR isolat *Streptomyces* sp.-1 sampai *Streptomyces* sp.-4 dengan formulasi PCR yaitu PCR mix kit 25 μ L, akuabides steril 10 μ L, pA (*forward*) 10 pmol 5 μ L, pH (*reverse*) 10 pmol 5 μ L, DNA 5 μ L dan optimasi PCR dengan denaturasi awal 95⁰C selama 5 menit, amplifikasi sebanyak 35 daur : denaturasi 95⁰C selama 1 menit, *annealing* 60⁰C selama 1 menit, elongasi 72⁰C selama 1 menit dan pada putaran ke 35 *post* elongasi 72⁰C selama 10 menit dapat dilihat pada Gambar 5.14.



Gambar 5.14 Hasil PCR isolat *Streptomyces* sp.

Keterangan gambar :

- 1 : *Streptomyces* sp.-1
- 2 : *Streptomyces* sp.-2
- 3 : *Streptomyces* sp.-3
- 4 : *Streptomyces* sp.-4
- : Kontrol negatif
- + : Kontrol positif (*Streptomyces griseus*)
- M : Marker

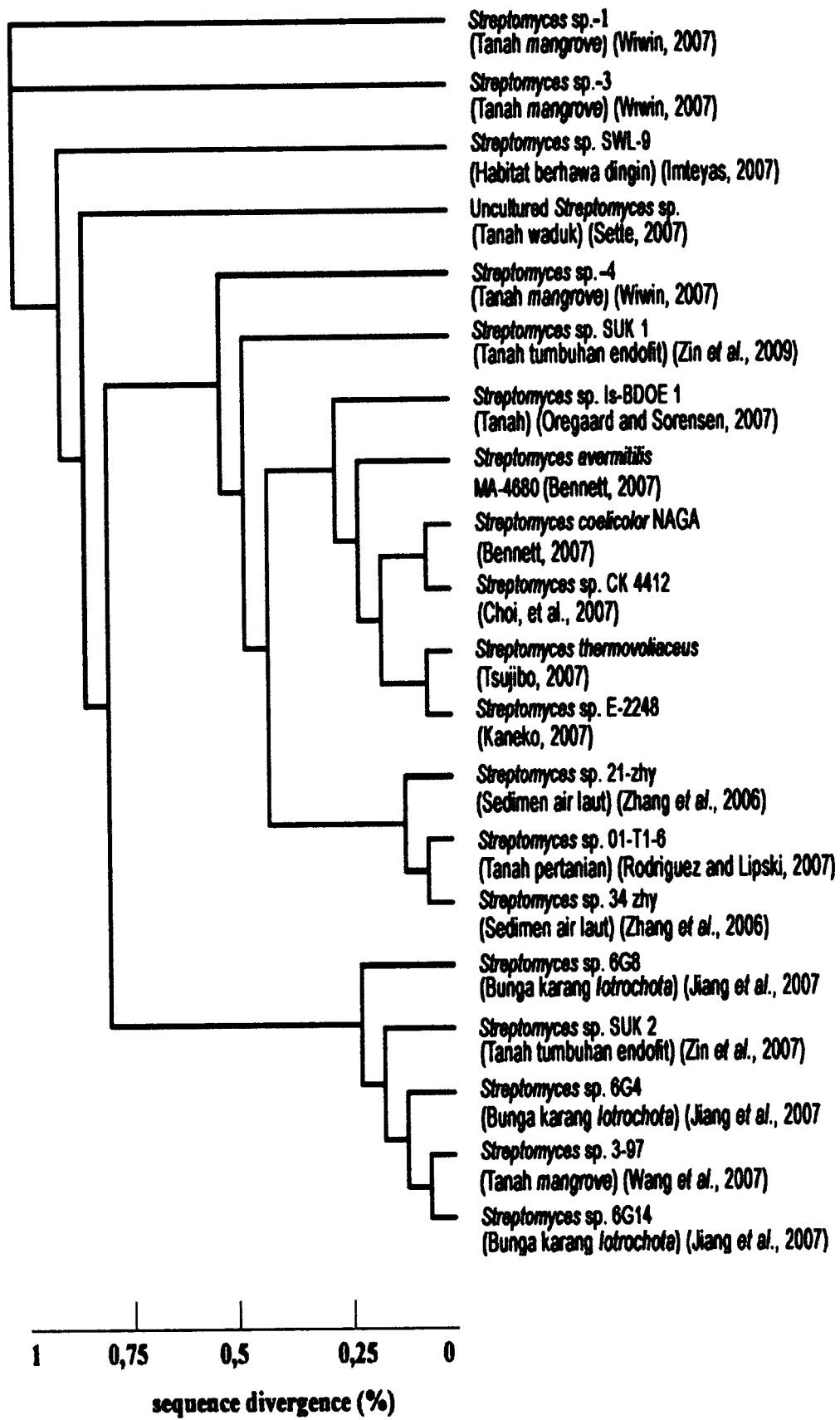
Dari Gambar 5.14 terlihat bahwa *Streptomyces* sp.-1, sp.-2, sp.-3, dan sp.-4, menghasilkan 1 pita dan selanjutnya dilakukan sekuensing dengan metode ABI Prism 310. Hasil sekuensing dapat dilihat pada Lampiran 1 sampai Lampiran 7.

Ketiga isolat yang disekuensing, ternyata memberikan panjang sekuen yang berbeda (Lampiran 8). Pada *Streptomyces* sp.-1 diperoleh 1.420 bp, *Streptomyces* sp.-3 diperoleh sekuen 1.416 bp, pada *Streptomyces* sp.-4 diperoleh sekuen 478 bp. Sekuen ketiga isolat lokal *Streptomyces* sp. penghasil antibiotik yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan isolat *Streptomyces* referensi *gene bank* dalam bentuk diagram pohon filogenetik.

5.1.1.9 Diagram Pohon Filogenetik *Streptomyces* sp.

Dari urutan gen 16S rRNA *Streptomyces* sp. yang telah diketahui, dibuat diagram pohon filogenetik menggunakan program *Sci Ed Central, Clone Manager Profesional Suite, Scientific and Educational Software* 1994-2000. Ketiga isolat *Streptomyces* sp. hasil isolasi pada ekosistem *mangrove* pantai utara Surabaya dan Probolinggo dibandingkan dengan isolat *Streptomyces* sp. dari *Gene Bank*.

Diperoleh hasil bahwa *Streptomyces* sp-1, sp.-3, dan sp.-4 ternyata mempunyai kekerabatan lebih dekat dengan *Streptomyces* sp. SWL-9, Uncultured *Streptomyces* sp., *Streptomyces* sp. SUK 1, *Streptomyces* sp. Is BDOE 1, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor* NAGA, *Streptomyces* sp. CK 4412, *Streptomyces thermovoliaceus*, *Streptomyces* sp. E-2248, *Streptomyces* sp. 21-zhy, *Streptomyces* sp. 01-T1-6, *Streptomyces* sp. 34-zhy, *Streptomyces* sp. 6G8, *Streptomyces* sp. SUK 2, *Streptomyces* sp. 6G4, *Streptomyces* sp. 3-97, dan *Streptomyces* sp. 6G14, yang dapat dilihat pada Gambar 5.15 dan besarnya persentase perbedaan dari 20 spesies *Streptomyces* tersebut dapat dilihat pada Lampiran 9.



Gambar 5.154 Diagram pohon filogenetik *Streptomyces* sp. pada 1500 pb

Hasil diagram pohon filogenetik menunjukkan bahwa *Streptomyces* sp.-1, sp.-3, sp.-4 penghasil antibiotik yang ditemukan pada ekosistem *mangrove* pantai utara Kenjeran Surabaya dan Probolinggo ternyata merupakan isolat baru. Berdasarkan Lampiran 5 diketahui bahwa (1) *Streptomyces* sp.-1 mempunyai persamaan dengan *Streptomyces* sp. SWL-9 sebesar 85,16%, *Streptomyces* sp.-3 sebesar 85%, *Streptomyces* sp. 6G4 sebesar 85,39%, *Streptomyces* sp. 6G8 sebesar 83,4%, (2) *Streptomyces* sp.-3 mempunyai persamaan dengan *Streptomyces* sp. 6G4 sebesar 87,37%, dan *Streptomyces* sp. 6G8 sebesar 85,84%, *Streptomyces* sp. SWL-9 sebesar 86,85%, *Uncultured Streptomyces* sp. sebesar 80,3%, dan (3) *Streptomyces* sp.-4 mempunyai persamaan dengan *Streptomyces* sp. SWL-9 sebesar 37,11%, *Streptomyces* sp. 6G8 sebesar 33,67%, dan *Streptomyces* sp. 6G4 sebesar 33,18%, *Uncultured Streptomyces* sp. sebesar 30,47%.

Menurut Yulin (2006), Zhang (2003), dan Ueda ((1999) bahwa *Streptomyces* sp. dinyatakan sebagai spesies baru jika mempunyai ciri-ciri makroskopis, mikroskopis, dan fisiologis yang berbeda dengan *Streptomyces* sp. yang telah diketahui meskipun spesies tersebut mempunyai persamaan sebesar 99% dengan *Streptomyces* sp. lain.