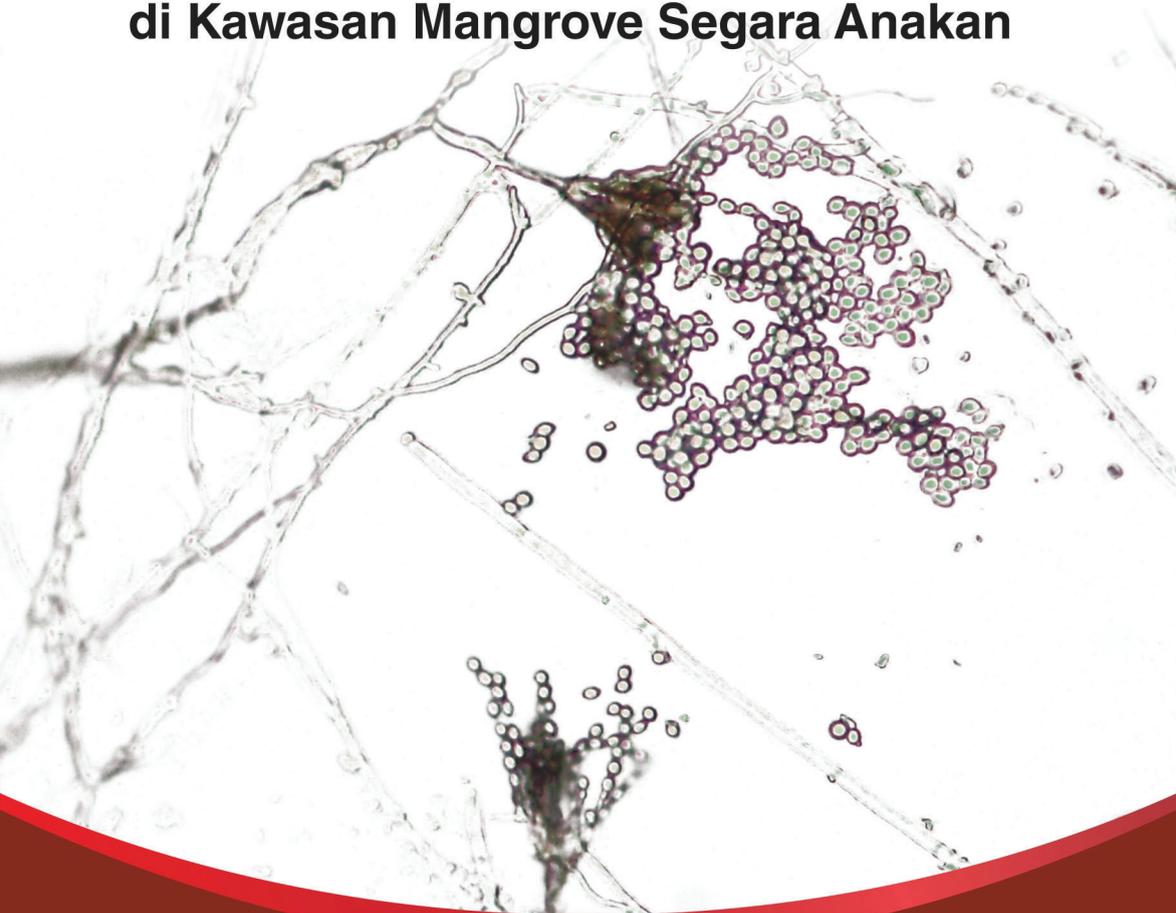




— EKSPLORASI —

# AKTINOMISETES

di Kawasan Mangrove Segara Anakan



ARI ASNANI  
OEDJIJONO

**EKSPLORASI**  
**AKTINOMISETES**

**DI KAWASAN MANGROVE SEGARA ANAKAN**

**Oleh:**

**Ari Asnani**  
**Oedjijono**



**Penerbit**  
**Universitas Jenderal Soedirman**  
**2022**

# **EKSPLORASI AKTINOMISETES DI KAWASAN MANGROVE SEGARA ANAKAN**

Copyright © 2022 Universitas Jenderal Soedirman

**Cetakan Kedua, April 2022**

Hak Cipta dilindungi Undang-undang  
*All Right Reserved*

**Penulis:**

Ari Asnani  
Oedjijono

**Editor:**

Dwi Utami Anjarwati

Foto sampul: miselium isolat aktinomisetes K-2C

**Diterbitkan oleh:**

UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN  
Gd. BPU Percetakan dan Penerbitan (UNSOED Press)  
Telp. (0281) 626070  
Email: [unsoedpress@unsoed.ac.id](mailto:unsoedpress@unsoed.ac.id)



Anggota

**Afiliasi Penerbit Perguruan Tinggi Indonesia**

Nomor : 003.082.1.02.2019

vi + 64 hal., 15,5 x 23 cm

**ISBN : 978-623-7144-57-1**

*Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku tanpa seizing penerbit atau penulis. Setiap publikasi atau referensi untuk penggunaan pribadi atau penelitian harus secara eksplisit mengidentifikasi sumber aslinya. Hal ini untuk menjamin hak cipta dan peningkatan ilmu pengetahuan*

# DAFTAR ISI

DAFTAR ISI .....	iii
DAFTAR TABEL .....	iv
DAFTAR GAMBAR.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Segara Anakan Cilacap.....	1
1.2 Aktinomisetes .....	3
1.3 Potensi Aktinomisetes.....	5
1.4 Perumusan Masalah .....	9
BAB II. ISOLASI AKTINOMISETES .....	14
2.1 Landasan Teori .....	14
2.2 Karakteristik Lokasi Pengambilan Sampel .....	17
2.3 Penerapan Perlakuan Awal .....	19
2.4 Isolasi Aktinomistes.....	22
BAB III. IDENTIFIKASI AKTINOMISETES .....	25
3.1 Landasan Teori .....	25
3.2 Karakterisasi Morfologi Koloni dan Hifa .....	28
3.3 Karakterisasi Biokimiawi Aktinomisetes .....	31
BAB IV. IDENTIFIKASI AKTINOMISETES BERBASIS GEN 16S.....	35
4.1 Landasan Teori .....	36
4.2 Isolasi dan Amplifikasi Gen 16S rRNA.....	46
4.3 Identifikasi Spesies .....	50
4.4 Konstruksi Pohon Filogenetik .....	54
BAB V. KESIMPULAN .....	56
DAFTAR PUSTAKA.....	57
LAMPIRAN .....	61

## DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Aktinomisetes penghasil antibiotik .....	5
Tabel 2.	Bioaktif pigmen yang dihasilkan mikroorganisme*) ....	7
Tabel 3.	Beberapa hasil penelitian terkait isolasi, skrining, dan seleksi Aktinomisetes dari Kawasan mangrove Segara Anakan .....	11
Tabel 4.	Karakteristik lokasi pengambilan sampel*) .....	18
Tabel 5.	Total isolat aktinomisetes hasil isolasi*) .....	20
Tabel 6.	Contoh isolat aktinomisetes dari Segara Anakan .....	23
Tabel 7.	Hasil pengamatan morfologi koloni dan hifa .....	30
Tabel 8.	Hasil karakterisasi biokimiawi isolat aktinomistes .....	31
Tabel 9.	Hasil uji nutrisi isolat aktinomisetes.....	32
Tabel 10.	Hasil uji produksi asam .....	33
Tabel 11.	Hasil isolasi DNA isolat W-1B, P-6G, dan P-7H.....	47
Tabel 12.	Migrasi produk amplifikasi DNA dan standard DNA..	49
Tabel 13.	Hasil pensejajaran spesies W-1B, P-6B, dan P-7H dengan BLAST .....	53

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Daerah penelitian di kawasan Segara Anakan Cilacap .....	1
Gambar 2.	Kromatograf sekuens DNA.....	42
Gambar 3.	Contoh BLAST nukleotida menggunakan database gen 16S .....	44
Gambar 4.	(A) Gel elektroforesis hasil PCR isolat (1) W-1B, (2) P-6G, dan (3) P-7H dengan marka DNA 1 Kb; (B) Grafik hubungan Log pasangan DNA dengan jarak migrasi dari standar DNA. ....	48
Gambar 5.	Hasil pensejajaran dengan program BioEdit dari gen 16S isolat W-1B.....	50
Gambar 6.	Pohon Filogenetik dari isolat W-1B, P-6G, dan P-7H	55

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan pada Allah Illahi Rabbi atas rahmat dan karuniaNya sehingga buku *Eksplorasi Aktinomisetes di Kawasan Mangrove Segara Anakan* dapat diselesaikan. Buku ini disusun berdasarkan hasil-hasil penelitian dengan fokus utama *marine* aktinomisetes yang merupakan mikroba *indigenous* dari area Segara Anakan Cilacap. Aktinomisetes adalah kelompok mikroorganisme yang paling berperan dalam produksi senyawa antibiotika. Pencarian strain-strain baru penghasil antibiotika serta strain-strain penghasil jenis antiobiotika baru terus dilakukan hingga kini.

Penulisan buku ini bertujuan untuk memberikan informasi teknik isolasi aktinomisetes, identifikasi secara morfologi dan berdasarkan gen 16S rRNA, serta karakterisasi nutrisi dan fisiologi aktinomisetes. Buku ini diharapkan dapat digunakan sebagai referensi isolasi dan identifikasi aktinomistes. Semoga buku ini mampu memberi kontribusi positif bagi penelitian aktinomisetes.

Terima kasih atas saran semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan buku ini. Saran dan kritik yang konstruktif sangat diperlukan untuk penyempurnaan buku ini pada masa yang akan datang.

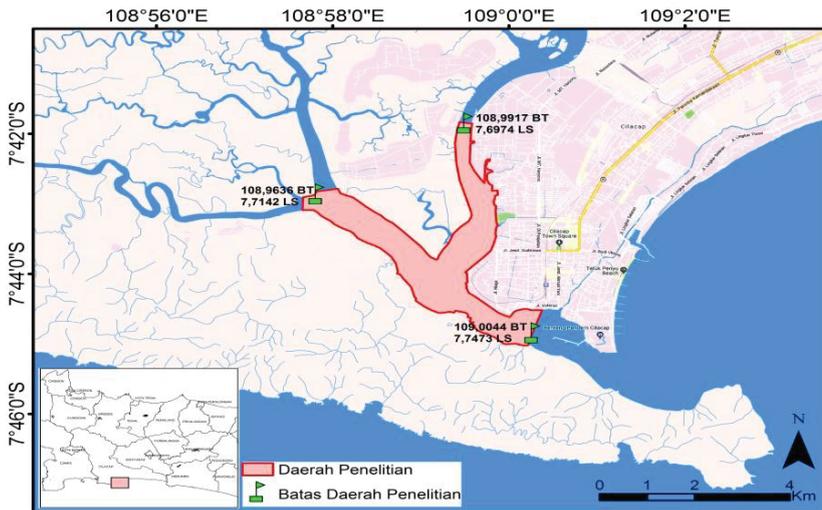
Purwokerto, April 2022  
Penulis,

Ari Asnani, S.Si.,M.Sc., Ph.D.  
Dr. Oedjjiono, M.Sc.

# BAB I. PENDAHULUAN

## 1.1 Segara Anakan Cilacap

Segara Anakan merupakan sebuah daerah muara yang luas di bagian selatan Kabupaten Cilacap, Jawa Tengah. Secara geografis Segara Anakan terletak pada koordinat  $7^{\circ}35'$  LS sampai  $7^{\circ}50'$  LS dan  $108^{\circ}45'$  BT sampai  $109^{\circ}45'$  B (Purwanto & Asriningrum, 2019). Secara administratif, Segara Anakan terletak di perbatasan antara Kabupaten Ciamis Provinsi Jawa Barat dan Kabupaten Cilacap Provinsi Jawa Tengah. Daerah Segara Anakan meliputi Kecamatan Kawunganten Kecamatan Gandrungmangu, Kecamatan Sindareja dan Kecamatan Kalipucang (Gambar 1). Daerah ini merupakan kawasan laguna dengan perairan laut-payau yang memiliki beberapa pulau atau daratan berpenduduk.



Gambar 1. Daerah penelitian di kawasan Segara Anakan Cilacap

Segara Anakan merupakan tempat bermuaranya beberapa sungai antara lain Sungai Citandui, Sungai Cibereum, Sungai Kembang Kuning, Sungai Ujung Alang dan Sungai Donan (Ardli & Wolff, 2008). Kondisi pasang surut dan kadar garamnya masih mencirikan sifat-sifat laut, tetapi gelombang dan arusnya sudah terendam sehingga menjadi perairan yang tenang. Kondisi salinitas yang payau disebabkan percampuran antara perairan laut dan air tawar dari masukan sungai, yaitu sekitar 2 - 3 permil. Kondisi payau di kawasan Segara Anakan memungkinkan vegetasi mangrove tumbuh dengan subur yang menyebabkan terbentuknya hutan mangrove.

Kawasan hutan mangrove di Segara Anakan sangat menguntungkan bagi perkembangan populasi dan penyebaran mikroorganisme. Luasan ekosistem mangrove di kawasan Segara Anakan mengalami fluktuasi sebagai akibat deforestasi dan tumbuhnya mangrove di area sedimentasi yang baru atau tanah timbul. Ekosistem vegetasi mangrove di sekitar laguna didominasi oleh *Rhizophora apiculata*, *R. mucronata*, *Avicennia marina*, *Sonneratia caseolaris*, *Cariops tagal*, *Aegieras corniculatum*, dan *Nypa fructican* (Hilmi, et al., 2015). Vegetasi mangrove memberikan kelembaban dan menjaga temperatur di kawasan tersebut. Area hutan mangrove juga merupakan sumber bahan organik dari pelapukan dan penguraian serasah yang sangat bermanfaat bagi mikroorganisme heterotrof semisal aktinomisetes.

Aliran sungai ke daerah laguna dan sekitarnya menyebabkan terjadinya akumulasi nutrien yang bermanfaat sebagai sumber nutrien dan bahan organik bagi mikroorganisme. Pergerakan air pasang dan surut menambah kemungkinan penyebaran nutrien dan keragaman mikroorganisme. Populasi mikroorganisme di daerah pasang surut akan tinggi, demikian pula penyebaran dan keragamannya. Faktor-faktor tersebut mendukung kawasan Segara Anakan sebagai habitat yang khas bagi mikroorganisme. Habitat yang khas dapat mengandung mikroorganisme yang spesifik pula sifat-sifatnya. Di samping itu,

mikroorganisme yang hidup di daerah perairan payau dan laut memiliki sifat toleran terhadap kadar garam atau bersifat halotoleran.

## 1.2 Aktinomisetes

Aktinomisetes merupakan mikroorganisme kelompok bakteri Gram positif yang sangat berpotensi menghasilkan antibiotik. Sekitar 70% antibiotik yang telah ditemukan dihasilkan oleh aktinomisetes terutama dari genus *Streptomyces*, sehingga sasaran penapisan mikroba penghasil antibiotik ditujukan pada kelompok tersebut. Hingga saat ini, kebutuhan antibiotik baru masih sangat diperlukan, terutama antibiotik yang efektif melawan bakteri resisten, virus, protozoa, fungi maupun tumor. Oleh karena itu, eksplorasi isolat aktinomisetes yang potensial terus menerus dilakukan untuk mendapatkan mikroba jenis baru.

Penyebaran aktinomisetes di alam sangat luas, tidak hanya di dalam tanah tetapi juga di dalam habitat lain seperti kompos, lumpur, lumpur sungai, dasar danau, atau perairan. Aktinomisetes paling banyak diisolasi dari lingkungan tanah dengan berbagai jenis tanah, baik tanah pertanian, padang pasir, hutan hujan tropis, lingkungan gua, maupun kompos dan sampah terutama aktinomisetes jenis termofilik. Faktor-faktor yang mempengaruhi jumlah dan jenis aktinomisetes di dalam tanah antara lain adalah letak geografi, temperatur tanah, pH tanah, tipe tanah, kandungan bahan organik, pengolahan tanah, aerasi, dan kelembaban. Jumlah aktinomisetes meningkat dengan adanya bahan organik yang mengalami degradasi. Populasi aktinomisetes tertinggi terdapat pada bagian atas dengan kedalaman sekitar 4 cm, di mana semakin bertambah kedalaman tanah maka populasinya semakin berkurang.

Selain lingkungan tanah, lingkungan akuatik juga merupakan habitat sesuai bagi aktinomisetes. Sebagai contoh adalah kawasan laguna Segara Anakan Cilacap yang merupakan daerah *estuarine* yang unik dengan area hutan mangrove. Penelitian awal mengenai keragaman aktinomisetes di Segara Anakan Cilacap memberikan hasil positif

keberadaan aktinomisetes (Asnani & Ryandini, 2011). Luasnya kawasan hutan mangrove di Segara Anakan sangat menguntungkan bagi perkembangan populasi mikroba karena memberikan lingkungan biotik dan abiotik yang lebih lembab, terlindung dari sinar matahari, dan bersuhu lebih stabil sehingga cocok bagi kehidupan aktinomisetes.

Aktinomisetes merupakan mikroorganisme kelompok bakteri Gram positif yang membentuk miselium uniseluler sehingga memiliki kenampakan morfologi seperti kapang. Koloni aktinomisetes tumbuh perlahan, melekat pada substrat dan memiliki kemampuan memproduksi spora. Aktinomisetes melakukan reproduksi melalui pembelahan sel. Kondisi lingkungan yang sesuai akan menstimulasi pertumbuhan spora yang selanjutnya akan berkembang menjadi miselium yang terdiri dari hifa bercabang-cabang dengan diameter hifa 0,5-0,8  $\mu\text{m}$ . Aktinomisetes memiliki dua tipe hifa yaitu hifa vegetatif dan hifa aerial. Hifa vegetatif atau substrat merupakan hifa yang tumbuh di dalam medium, sedangkan hifa aerial adalah hifa yang tumbuh menjulang ke udara. Pertumbuhan koloni pada awalnya berkembang sebagai hifa vegetatif yang kemudian diikuti oleh perkembangan hifa aerial. Pada pengamatan dengan mikroskop cahaya pada kaca preparat, hifa aerial bersifat refraktif dan terang, sedangkan hifa substrat bersifat transparan dan gelap. Hifa aerial dapat berwarna karena pigmentasi.

Secara keseluruhan anggota aktinomisetes dimasukkan ke dalam Ordo Actinomycetales yang dibagi ke dalam empat Famili, yaitu Streptomycetaceae, Actinoplanaceae, Actinomycetaceae dan Mycobacteriaceae. Famili Streptomycetaceae dan Actinoplanaceae membentuk konidia atau spora, sedangkan anggota Famili Actinomycetaceae dan Mycobacteriaceae tidak membentuk konidia atau spora. Genus aktinomisetes dibedakan berdasarkan morfologi dan komponen kimia marker pada dinding sel, membran, dan hidrolisat seluruh sel. Kriteria kimia didasarkan pada tipe asam amino *diabasic* pada dinding sel dan tipe gula yang ada pada hidrolisat seluruh sel.

### 1.3 Potensi Aktinomisetes

Aktinomisetes dikenal sebagai kelompok mikroorganisme yang paling berperan dalam produksi senyawa antibiotik (Tabel 1). Potensi aktinomisetes sebagai bakteri penghasil senyawa antibiotik telah membuat kelompok mikroba ini menjadi sangat penting. Senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh aktinomisetes tidak terbatas efeknya terhadap bakteri saja namun juga beragam efek, yaitu sebagai agensia anti-fungi, anti-kanker dan beberapa diantaranya bersifat sebagai anti-virus. Potensi tersebut terdapat pada tingkat strain, dan hingga kini terus dilakukan pencarian strain-strain baru penghasil antibiotika serta strain-strain penghasil jenis antibiotika baru (Genilloud, 2017).

Tabel 1. Aktinomisetes penghasil antibiotik

Genus	Jumlah Jenis Antibiotik
<i>Streptomyces</i>	981
<u>Rare aktinomisetes</u>	
<i>Actinomadura</i>	91
<i>Actinoplanetes</i>	36
<i>Amycolatopsis</i>	20
<i>Dactylosporangium</i>	14
<i>Kibdelosporangium</i>	13
<i>Micromonospora</i>	49
<i>Nocardia</i>	27
<i>Nocardiosis</i>	15
<i>Saccharopolyspora</i>	23
<i>Saccharothrix</i>	5
<i>Streptosporangium</i>	5

Aktinomisetes diketahui mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen pada manusia seperti *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, dan *Candida utilis* ((Khucharoenphaisan, et al., 2012). Naorungrote, et al. (2011) melaporkan bahwa *Streptomyces* sp. CFJ2, *Streptomyces antibioticus* strain 1022-257, *Streptomyces flaveolus* strain NRRL B-

1334, *Streptomyces psammoticus* strain NBRC 13971, dan *Streptomyces* sp. b26 mampu menghambat 10 isolat klinis MRSA. Saraswathi, et al. (2015) berhasil mengisolasi aktinomisetes dari sedimen laut yang menghasilkan senyawa antibakteri dan menunjukkan aktivitas antagonis terhadap bakteri *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, dan *Bacillus subtilis*. Devi, et al. (2006) menyatakan bahwa *Actinopolyspora*, *Nocardia*, dan *Streptomyces* sp. yang diisolasi dari air laut Dhanushkodi mampu melawan bakteri dan jamur patogen *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S.typhi*, dan *Aspergillus niger*. *Streptomyces* sp. yang diisolasi dari tanah pesisir laut mampu menghambat *Multi Drug Resistant Staphylococcus aureus* (MDRSA) (Sathish & Kokati, 2012).

Asnani & Ryandini, (2011) telah melaporkan 26 isolat aktinomisetes dari kawasan Mangrove Segara Anakan Cilacap yang berpotensi sebagai sumber senyawa anti-bakteri. Berdasarkan pengamatan morfologi koloni dan sel, isolat aktinomisetes tersebut memiliki sifat morfologi genera *Nocardia*, *Kibdelosporangium*, *Streptomyces*, *Actinosynnema*, *Promicromonospora*, *Thermomonospora*, *Saccharopolyspora*, dan *Streptoverticilium*. Pemanfaatan hasil penelitian ini secara berkelanjutan akan dilakukan melalui pengembangan berbagai potensi aktinomisetes sebagai antibakteri.

Selain mampu memproduksi antibiotik, aktinomisetes juga mampu menghasilkan pigmen (zat warna) yang meliputi semua warna pelangi. Soliev, et al. (2011) telah mengulas bioaktif pigmen yang dihasilkan oleh mikroorganisme halotoleran. Pigmen tersebut memiliki warna tertentu serta mempunyai aktivitas, seperti antikanker, antibakteri, antiinflamasi, antioksidan, serta antibiotik. Contoh bioaktif pigmen serta mikroba yang menghasilkan pigmen tersebut tercantum pada Tabel 2.

Tabel 2. Bioaktif pigmen yang dihasilkan mikroorganisme<sup>\*)</sup>

Pigmen	Warna	Aktivitas	Spesies Mikroba
<i>Undecylprodigiosin</i>	Merah	Antikanker	<i>Streptomyces rubber</i>
<i>Cycloprodigiosin</i>	Merah	Immunosuppressant; Antikanker; Antimalaria	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>
<i>Heptyl prodigiosin</i>	Merah	Antiplasmodial	<i>α-Proteobacteria</i>
<i>Prodigiosin</i>	Merah	Antibakteri; antikanker; <i>algicidal</i>	<i>Pseudoalteromonas rubra</i> ,
<i>Astaxanthin (carotene)</i>	Oranye	Antioksidan	<i>Agrobacterium aurantiacum</i>
<i>Violacein</i>	Ungu	Antibiotik; Antiprotozoan; Antikanker	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> ; <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 520P1; <i>Collimonas</i> CT
<i>Methyl saphenate (phenazine derivative)</i>	Kuning	Antibiotik	<i>Pseudonocardia</i> sp. B6273
<i>Indigoidine</i>	Biru	Pewarna makanan	<i>Alteromonas nigrifaciens</i>
<i>Tambjamines (BE-18591, pyrrole and their analogs)</i>	Kuning	Antibiotik ; antianker	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i>
<i>Melanins</i>	Kuning	<i>Protection from UV irradiation</i>	<i>Shewanella colwelliana</i> ; <i>Alteromonas nigrifaciens</i> ; <i>Cellulophaga tyrosinoxydans</i>
<i>Scytonemin</i>	Kuning-hijau	<i>Protection from UV irradiation</i> Antiinflamasi, Antiproliferative	<i>Cyanobacteria</i>
<i>Tryptanthrin</i>	Kuning	Antibiotik	<i>Cytophaga/Flexibacteria</i> AM13,1 strain

\*) Sumber: Soliev et al. (2011)

Asnani, et al. (2016) telah melaporkan aktinomisetes yang diisolasi dari Segara Anakan Cilacap. Aktinomisetes K-2C, K-3E, dan K-4B, dan U3-3B mampu menghasilkan pigmen yang berpotensi antibakteri. Pigmen alami yang dihasilkan adalah warna merah (K-2C), kuning (K-3E), dan merah keunguan (K-4B). Ketiga pigmen tersebut mengalami perubahan warna sesuai dengan pH media. Identifikasi morfologi mengindikasikan isolat K-2C, K-3E, dan K-4B, dan U3-3B sebagai spesies anggota genus *Streptomyces*. Aplikasi pigmen dari aktinomisetes K-4B sebagai pewarna sabun gliserin juga telah dilaporkan oleh Herlina, et al. (2017).

Selain kemampuan aktinomisetes menghasilkan pigmen yang meliputi semua warna pelangi, aktinomisetes juga mampu membentuk asam-asam organik. Medium pertumbuhan kultur aktinomisetes menjadi bersifat asam karena produksi asam-asam organik, terutama ketika medium pertumbuhan mengandung prosentase karbohidrat atau senyawa organik non-nitrogen lain yang tinggi.

Potensi lain dari aktinomisetes adalah kemampuan menghasilkan enzim protease, amilase, invertase, pektinase dan oksidase. Aktinomisetes laut yang mampu menggunakan bahan organik menjadi dasar analisis potensi aktinomisetes dalam memproduksi beragam enzim. Asnani, et al. (2014) telah melaporkan isolat aktinomisetes laut K-2C, K-3E, K-4B, K-10A, U2-7A, dan U3-3B yang mampu menghidrolisis pati dan CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*). Potensi tersebut menjadikan isolat aktinomisetes laut tersebut sebagai mikroba potensial untuk memproduksi enzim amilase dan selulase.

Wardana, et al. (2017) berhasil mengisolasi sebanyak 16 isolat *Streptomyces* dari rhizosfer *Avecennia marina* yang tumbuh di kawasan mangrove Segara Anakan. Filtrat kultur dari ke-16 isolat tersebut mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli*, dan *Streptomyces* isolat 404 menunjukkan kemampuan tertinggi dengan diameter zona hambat berturut-turut 13 mm dan 12,5 mm. Ryandini, et al. (2018) menunjukkan

bahwa *Streptomyces* sp. SA32 asal sedimen mangrove (rizosfer *Rhizophora* sp.) Segara Anakan Cilacap menghasilkan senyawa antibakteri yang menghambat bakteri MDR *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *E. Cloacae*, dan *Enterobacter* sp.

Larasati, et al. (2019) melaporkan bahwa *Streptomyces* sp. SA404 yang diisolasi dari rhizosfer mangrove Segara Anakan mampu menghasilkan senyawa antibakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Produksi senyawa metabolit sekunder bakteri tersebut dipengaruhi oleh komposisi medium dan waktu inkubasi. Ryandini, et al. (2021) menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. SA32 asal sedimen mangrove Segara Anakan mampu menghambat pertumbuhan bakteri MDR *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, dan *Enterococcus* sp.

Asnani, et al. (2020) mendapatkan tiga isolat aktinomisetes (isolat W-5B, W-5A, dan P-7D) dari sedimen mangrove Segara Anakan Cilacap yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri Methycillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Hasil identifikasi secara molekuler (filogenetik) menunjukkan bahwa isolat W-5A dan W-5B termasuk spesies anggota *Streptomyces* dan isolat P-7D adalah anggota spesies *Streptomyces clavuligerus*. Dinda, et al. (2020) menyatakan bahwa senyawa aktif isolat W-5A mampu menghambat pertumbuhan bakteri MRSA 2983.

#### **1.4 Perumusan Masalah**

Segara Anakan merupakan suatu Kawasan tempat bermuaranya beberapa sungai dan ekosistem hutan mangrove. Kawasan laguna ini diketahui sebagai lingkungan spesifik yang memiliki kesuburan tinggi untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan makro dan mikroorganisme. Kawasan Segara Anakan Cilacap merupakan suatu ekosistem yang unik dan ekstrim karena di lingkungan tersebut terjadi pencampuran antara air tawar dan air asin, sedimentasi berbagai material

organik dan anorganik, habitat organisme yang memiliki kisaran toleransi luas terhadap salinitas. Organisme yang menghuni lingkungan dengan karakteristik seperti itu tentu memiliki jenis, jumlah, kebutuhan nutrisi, maupun aktivitas fisiologis yang bervariasi.

Mikroorganisme merupakan dekomposer dan produser utama di suatu lingkungan. Aktivitas dekomposisi bahan organik dari sisa vegetasi dan material sedimen di lingkungan mangrove seperti Kawasan Segara Anakan menyebabkan tingginya keanekaragaman organisme termasuk ikan dan mikroorganisme seperti Aktinomisetes.

Kawasan mangrove Segara Anakan Cilacap merupakan habitat potensial Aktinomisetes penghasil metabolit sekunder penghambat pertumbuhan mikroba patogen (Ryandini et al., 2018). Spesies bakteri anggota Aktinomisetes dikenal sebagai produser utama antibiotik komersial, sementara itu masalah resistensi bakteri patogen terhadap berbagai jenis antibiotik umum menjadi perhatian yang serius di bidang kesehatan. Eksplorasi mikroba penghasil antibiotik yang dapat membunuh berbagai mikroba patogen termasuk kelompok bakteri patogen resisten sangat dibutuhkan. Kawasan mangrove Segara Anakan Cilacap yang unik dan ekstrim dipandang potensial sebagai sumber isolat Aktinomisetes penghasil senyawa antimikroba baru.

Beberapa penelitian terkait isolat Aktinomisetes asal ekosistem mangrove dan marine yang berpotensi sebagai penghasil senyawa antimikroba penghambat bakteri *multidrug resistant* (MDR) disajikan pada Tabel 3. Hal ini menunjukkan bahwa Kawasan mangrove Segara Anakan Cilacap memiliki potensi sebagai sumber antibio Aktinomisetes yang dapat menghasilkan berbagai senyawa antimikroba yang menghambat dan membunuh pertumbuhan berbagai bakteri antibiotik termasuk beberapa spesies yang resisten terhadap antibiotik.

Tabel 3. Beberapa hasil penelitian terkait isolasi, skrining, dan seleksi Aktinomisetes dari Kawasan mangrove Segara Anakan

Penulis	Judul	Sumber	Kesimpulan
Asnani & Ryandini	Screening of marine actinomycetes from Segara Anakan Indonesia for antimicrobial activity.	Proceeding of the International Conference on Natural Sciences (ICONS). Germany, 2011: 64-69.	Sebanyak 26 isolat Aktinomisetes berpotensi sebagai penghasil senyawa antibakteri.
Asnani, Ryandini, Suwandri	Screening of marine actinomycetes from Segara Anakan for natural pigment and hydrolytic activities.	IOP Conf. Series: Material Sciences and Engineering 107 (2016) 012056.	Isolat Aktinomisetes K-2C mampu menghasilkan pigmen ekstraseluler dan intraseluler, serta menghasilkan enzim hidrolitik amilase, selulase, protease, lipase, urease, dan nitrat reductase.
Wardana, Ryandini, Oedjijono	Antibacterial capacity Streptomyces isolate from a mangrove plant rhizosphere <i>Avicennia marina</i> .	Scripta Biologica 4(2): 131-134. 2017.	Sebanyak 16 isolat Streptomyces dapat diisolasi dan Streptomyces isolat 404 mampu menghambat <i>E. coli</i> dan <i>S. aureus</i> . Dua senyawa antibakteri memiliki karakteristik nilai Rf 0,47 dan 0,72.

Tabel 3. Lanjutan

Penulis	Judul	Sumber	Kesimpulan
Ryandini, Radjasa, Oedjijono	Isolate Actinomycetes SA32 origin of Segara Anakan mangrove rhizosphere and its capability in inhibiting multi-drugs resistant bacteria growth.	Journal of Microbial & Biochemical Technology 2018, 10(1):1-7.	<i>Streptomyces</i> sp. SA32 asal sedimen mangrove Segara Anakan menghasilkan senyawa antibakteri dengan Rf 0,7-0,9 yang mampu menghambat bakteri MDR <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. cloacae</i> dan <i>Enterobacter</i> sp.
Larasati, Ryandini, Oedjijono, Kusharyati	Optimization of medium and incubation time in the production of antibacterial compounds by <i>Streptomyces</i> sp. SA404	Advances in Biological Sciences Research, 2019, Vol. 15: 37-43.	Optimum produksi senyawa bioaktif <i>Streptomyces</i> sp. 404 menggunakan medium A (glukosa 0,5%; starch 1%; yeast extract 0,2%) dan waktu inkubasi 21 hari.
Asnani, Luviriani, Oedjijono	Activity of Actinomycetes isolated from Mangrove Segara Anakan Cilacap toward Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi 23(1) (2020): 1-7.	Tiga isolat aktinomisetes W-5B, W-5A, dan P-7D mampu menghambat pertumbuhan MRSA. Hasil identifikasi molekuler, W-5B: <i>Streptomyces</i> sp., W-5A: <i>Arthrobacter</i> sp., dan P-7D: <i>Streptomyces clavuligerus</i> .

Tabel 3. Lanjutan

Penulis	Judul	Sumber	Kesimpulan
Dinda, Asnani, Anjarwati	The activities of <i>Streptomyces</i> W-5A as antibacterial and antibiofilm towards Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> 2983.	Proceeding of the 1 <sup>st</sup> Jenderal Soedirman International Medical Conference in conjunction with the 5 <sup>th</sup> Annual Meeting (Temilnas) Consortium of Biochemical Science Indonesia (JIMC 2020), pages 109-115.	Penghambatan MRSA oleh senyawa antibakteri <i>Streptomyces</i> W-5A optimum pada waktu inkubasi 9 hr dan terhadap penghambatan dan degradasi biofilm dicapai setelah waktu inkubasi 12 hr.
Ryandini, Radjasa, Oedjijono	Bioactive compounds derived from <i>Streptomyces</i> sp. SA32: antibacterial activity, chemical profile, and their related genes.	IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 948 (2021) 012062.	Senyawa bioaktif <i>Streptomyces</i> sp. SA32 dengan nilai Rf 0,63 dan 0,68 termasuk senyawa polyketide, dan Rf 0,74 termasuk flavonoid. Kedua senyawa tersebut dikode oleh gen NRPS dan PKS.

Berdasarkan penelitian terdahulu, permasalahan penting yang dapat diungkap terkait potensi Aktinomisetes yang diisolasi dari Kawasan mangrove Segara Anakan Cilacap, antara lain:

- a. Bagaimana metode isolasi Aktinomisetes dari Kawasan mangrove Segara Anakan,
- b. Bagaimana metode karakterisasi dan identifikasi isolat Aktinomisetes dari Kawasan mangrove Segara Anakan.

## BAB II. ISOLASI AKTINOMISETES

### 2.1 Landasan Teori

Isolasi mikroorganisme dari alam merupakan tahap awal dalam penapisan metabolit aktif yang dihasilkan mikroba. Sebagai contoh, untuk menjangkau isolat aktinomisetes selalu diawali dengan tahapan kerja isolasi dari berbagai habitat yang kemudian dilanjutkan dengan identifikasi dan pengujian potensi. Pada prinsipnya tujuan isolasi mikroba adalah untuk mendapatkan mikroba yang dikehendaki sebanyak-banyaknya. Metode umum yang digunakan untuk isolasi mikroba terdiri atas metode tabur (*spread plate*), metode membran filter (*filter membrane method*), metode sedimen kering (*dry sediment method*), metode SDS-YE (*Sodium Dodecyl Sulfida-Yeast Extract Method*), dan metode klorin.

Metode paling umum digunakan untuk isolasi adalah pengenceran dilanjutkan dengan metode tabur (*spread plate*). Sampel tanah atau air diencerkan sedemikian rupa sehingga diharapkan pertumbuhan koloni tidak lebih 200 koloni per *plate*. Suspensi tersebut diinokulasikan dengan metode taburan *spread plate* pada cawan petri yang mengandung media pertumbuhan. Setelah diinkubasi, akan terlihat koloni-koloni pada cawan tersebut dan siap untuk dimurnikan lebih lanjut.

Metode *spread plate* pada prakteknya kurang efisien karena harus mengisolasi banyak mikroba yang potensinya belum jelas. Oleh sebab itu penerapan perlakuan awal sampel perlu dilakukan untuk mengeliminasi mikroba yang tidak diinginkan. Perlakuan awal pada sampel dapat dilakukan dengan metode pemanasan kering (*Dry Heating*), metode umpan (*Baiting Method*), metode rehidrasi sentrifugasi (*Rehydration Centrifugation Method*), germisida kimia (Fenol 1,5%’ *Chlorhexidine Gluconat* 0,01%; *Benzethonium Chloride* 0,01%), pemisahan minyak (*Oil*

*Separation*), metode radiasi frekuensi tinggi, metode radiasi frekuensi ekstra tinggi, dan metode phaga aktinomisetes.

### **2.1.1 Pengambilan sampel**

Pengambilan sampel dilakukan secara *simple random sampling*. Sampel yang diambil secara *random* adalah sedimen dari ekosistem mangrove di area Kalipanas (P) dan Kutawaru (W), Kecamatan Cilacap Tengah. Masing-masing area diambil 10 titik pengambilan sampel yang berbeda (nomor sampel) sehingga diperoleh 20 titik pengambilan sampel. Suhu dan pH lingkungan sekitar tempat pengambilan sampel diukur menggunakan termometer dan pH meter. Pengambilan sampel sedimen dilakukan pada kedalaman sekitar 6-10 cm dari permukaan, setelah itu sedimen dimasukkan ke dalam botol kaca steril serta diberi label lokasi dan waktu pengambilan sampel. Botol ditutup dan segera dibawa ke laboratorium Biokimia, Program Studi Kimia, UNSOED untuk dilakukan isolasi aktinomisetes.

### **2.1.2 Penerapan perlakuan awal**

Sampel sedimen dikeringkan terlebih dahulu pada suhu 30°C selama 32-36 jam dan setelah itu diberikan prosedur perlakuan awal, yaitu pemanasan kering (*Dry-Heating*), germisida kimia fenol, dan OS (*Oil Separation*).

Metode Pemanasan Kering (*Dry-Heating*). Sampel sedimen dipanaskan pada suhu 90°C selama 15 menit di dalam oven. Sampel kering sebanyak 1 g dilarutkan ke dalam 9 mL 0,85% NaCl fisiologis steril dan dihomogenisasi menggunakan vortex selama 10-15 menit. Sebanyak 1 mL larutan sampel diambil dan dilakukan pengenceran untuk *plating*.

Metode Germisida Kimia Fenol. Sampel sedimen kering sebanyak 1 g dilarutkan dalam akuades steril (9 mL) di dalam tabung reaksi dan dihomogenisasi menggunakan vortex, kemudian dibiarkan tegak selama 1

menit. Sebanyak 1 mL supernatan dipindahkan ke dalam 9 mL larutan fenol 1,5% dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 30 menit. Sebanyak 1 mL larutan sampel yang sudah ditambahkan fenol 1,5% diambil dan dilakukan pengenceran untuk *plating* (Istianto, et al. 2012).

Metode Pemisahan Minyak (*Oil Separation*). Sampel sedimen kering sebanyak 1 g dilarutkan dalam 4,5 mL minyak zaitun, kemudian di *vortex* selama 10 menit. Larutan ditambah dengan 4,5 mL akuades steril, di *vortex* lagi selama 10 menit. Larutan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Bagian minyak diambil sebanyak 0,1 mL untuk *plating*.

### 2.1.3 Isolasi aktinomisetes

Isolasi diawali dengan pembuatan suspensi sampel melalui seri pengenceran dan kultivasi dilakukan dengan metode tuang. Sebanyak 1 mL sampel yang telah diberi perlakuan awal ditambahkan ke dalam 9 mL 0,85% NaCl fisiologis steril dan dikocok hingga homogen menjadi suspensi dengan tingkat pengenceran  $10^{-1}$ . Hasil pengenceran  $10^{-1}$  dilakukan pengenceran bertingkat hingga diperoleh suspensi dengan tingkat pengenceran  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , dan  $10^{-4}$ . Suspensi pengenceran  $10^{-3}$ , dan  $10^{-4}$  dipipet masing-masing 1 mL untuk dibiakkan pada medium SCN agar dengan komposisi 10 g *starch*, 1 g casein; 1 g  $\text{KNO}_3$ ; 0,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g NaCl; 0,01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; dan 20 g Bacto agar (A Asnani & Ryandini, 2011). Kultivasi dilakukan dengan metode tuang (*pour plate*). Inkubasi dilakukan pada suhu 28°C selama 7-9 hari, atau sampai koloni aktinomisetes tumbuh.

Pengamatan morfologi koloni isolat yang diduga aktinomisetes dilakukan secara makroskopis meliputi bentuk koloni, ukuran, permukaan, elevasi, margin, miselium udara, miselium substrat, pigmentasi medium, dan zona hambat aktinomisetes pada medium SCN agar. Aktinomisetes memiliki morfologi koloni berbentuk bulat kecil hingga besar, pertumbuhan lambat, permukaan koloni berhifa, keras

seperti berdebu atau berbeludru, biasanya terdapat titik pusat pada tengah koloni dan koloni berwarna tipikal. Koloni yang tumbuh pada medium SCN agar yang menunjukkan morfologi aktinomisetes digoreskan pada medium SCN baru untuk pemurnian. Apabila biakan belum murni, pemurnian biakan diulang kembali hingga mendapatkan isolat yang betul-betul murni. Bila isolat sudah murni maka dilakukan pengujian lebih lanjut, atau isolat disimpan pada medium miring SCN.

## **2.2 Karakteristik Lokasi Pengambilan Sampel**

Sampel diambil dari tanah di serasah bervegetasi mangrove dan sedimen berair di area Segara Anakan Cilacap. Sedimen diambil dari serasah mangrove spesies *Rhizophora mucronata*, *Avicennia marina*, *Rhizophora apiculata*, *Bruguiera gymnorrhiza*, *Xylocarpus moluccensis*, *Sonneratia alba*, dan *Rhizophora* sp (Tabel 4). Sampel merupakan serasah mangrove karena hasil pelapukan dan penguraian mangrove merupakan sumber bahan organik yang sangat bermanfaat bagi mikroba sehingga diharapkan dapat ditemukan populasi aktinomisetes.

Area sampling bervariasi dari segi kedalaman pengambilan sampel, suhu sampel, dan pH lingkungan. Hal ini dimungkinkan karena area sampling merupakan daerah *estuarine* yang luas sebagai tempat bermuaranya berbagai sungai serta aktivitas masyarakat yang beragam. Faktor-faktor tersebut mendukung area sampling sebagai habitat yang khas bagi mikroorganisme spesifik, semisal aktinomisetes.

Tabel 4. Karakteristik lokasi pengambilan sampel<sup>\*)</sup>

No Sampling	Area	No. Sampel	Karakteristik Lokasi Pengambilan Sampel	Suhu	pH	
1	<b>Kalipanas</b>	1	Galian sedimen dekat mangrove kalipanas	36°C	8,0	
2		2	Sedimen akar mangrove sekitar kalipanas	36°C	8,4	
3		3	Sedimen dasar air kalipanas	36°C	7,6	
4		4	Sedimen pinggiran galian sekitar mangrove kalipanas	36°C	8,0	
7		5	Sedimen mangrove <i>Rhizophora mucronata</i> dekat pertamina	33°C	7,5	
8		6	Sedimen mangrove <i>Avicennia marina</i> dekat pertamina	31°C	7,3	
9		7	Sedimen mangrove <i>Rhizophora apiculata</i> dekat pertamina	29°C	7,7	
10		8	Sedimen mangrove <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> dekat pertamina	35°C	8,3	
12		9	Sedimen mangrove <i>Xylocarpus moluccensis</i> dekat pertamina	35°C	8,1	
13		10	Sedimen mangrove <i>Xylocarpus moluccensis</i> dekat pertamina	35°C	8,1	
14		<b>Kutawaru</b>	1	Sedimen mangrove <i>Sonneratia alba</i> dekat pemukiman warga Kutawaru	30°C	7,0
15			2	Sedimen mangrove <i>Sonneratia sp</i> dekat tambak ikan Kutawaru	29°C	7,6
16			3	Sedimen mangrove <i>Sonneratia sp</i> dekat ternak warga	27°C	7,3
17	4		Sedimen mangrove <i>Xylocarpus moluccensis</i> dekat pembuangan limbah warga	31°C	7,4	
18	5		Sedimen mangrove <i>Rhizophora apiculata</i> dekat tambak ikan Kutawaru	31°C	7,9	
19	6		Sedimen mangrove <i>Xylocarpus moluccensis</i> dekat tambak ikan Kutawaru	30°C	7,2	
20	7		Sedimen dasar Nipah pinggiran Kutawaru	30°C	8,3	
21	8		Sedimen akar Nipah pinggiran Kutawaru	30°C	8,3	
22	9		Sedimen mangrove <i>Rhizophora sp.</i> dasar perairan Kutawaru	39°C	8,1	
23	10		Sedimen mangrove <i>Rhizophora sp.</i> darat Kutawaru	38°C	8,8	

<sup>\*)</sup>Sumber: Luviriani (2017)

Sampel diambil pada kedalaman 6-10 cm dari permukaan karena sebagian besar populasi mikroba terpusat pada lapisan atas tanah yang juga merupakan pusat terjadinya aktivitas mikroba. Semakin bertambah kedalaman tanah maka populasi semakin berkurang. Lokasi pengambilan sampel memiliki temperatur 27°C hingga 39°C, dan pH sekitar 7,0 hingga 8,8. Suhu yang cocok untuk pertumbuhan aktinomisetes adalah 25-30°C, tetapi pada suhu 55-65°C aktinomisetes masih dapat tumbuh dalam jumlah cukup besar, khususnya genus *Streptosporangium* (40°C) dan *Thermoactinomyces* (50–55°C).

Beberapa spesies aktinomisetes telah diisolasi dari ekosistem mangrove. Aktinomisetes dari ekosistem mangrove di Laut Arabia India dengan aktivitas anti-MRSA telah dilaporkan oleh Kannan, et al. (2011). Sathish & Kokati (2012) melaporkan bahwa *Streptomyces* sp. diisolasi dari tanah pesisir laut mampu menghambat *Multi Drug Resistant Staphylococcus aureus*.

### 2.3 Penerapan Perlakuan Awal

Total isolat aktinomisetes yang diperoleh dari sedimen mangrove sebanyak 29 isolat dengan rincian 26 isolat dari metode perlakuan awal fenol, 1 isolat dari metode *dry heating*, dan 2 isolat dari metode *oil separation* (Tabel 5). Banyaknya isolat yang mampu tumbuh pada medium yang mengandung fenol 1,5% dimungkinkan karena lokasi sampling merupakan area kilang minyak Pertamina sehingga dimungkinkan isolat aktinomisetes lebih mampu tumbuh pada medium fenolik.

Tabel 5. Total isolat aktinomisetes hasil isolasi<sup>\*)</sup>

Nomor Sampling	Area	No. Sampel	Perlakuan Awal			Jumlah	
			<i>Dry Heating</i>	Fenol	<i>Oil Separation</i>		
1	Kalipanas	1	0	0	0	0	
2		2	0	0	0	0	
3		3	0	P-3A	0	1	
4		4	0	0	0	0	
7		5	0	0	0	0	
8		6	P-6A	0	P-6B	0	7
					P-6C		
					P-6D		
					P-6E		
					P-6F		
					P-6G		
					P-7A		
9		7	0	0	P-7B	0	10
	P-7C						
	P-7D						
	P-7E						
	P-7F						
10	8	0	0	P-7G	0	0	
				P-7H			
				P-7I			
12	9	0	0	0	0		
13	10	0	0	0	0		
14	Kutawaru	1	0	W-1A	0	3	
				W-1B			
				W-1C			
15	2	0	0	0	0		
16	3	0	0	W-3A	1		
17	4	0	0	0	0		
18	5	0	0	W-5A	0	2	
				W-5B			
19	6	0	0	W-6A	0	2	
				W-6B			
20	7	0	0	W-7A	0	1	
21	8	0	0	W-8A	0	1	
22	9	0	0	0	W-9A	1	
23	10	0	0	0	0	0	
<b>Jumlah</b>			<b>1</b>	<b>26</b>	<b>2</b>	<b>29</b>	

<sup>\*)</sup>Sumber: Luviriani (2017)

Metode perlakuan awal sangat efektif dalam membantu proses isolasi karena dapat mengurangi bakteri lain selain aktinomisetes yang tidak tahan terhadap metode perlakuan awal yang diterapkan terutama

bakteri Gram negatif. Sebagai contoh, untuk memperbesar kemungkinan isolasi aktinomisetes dari sampel air, misalnya *Rhodococcus* dan *Micromonospora*, dilakukan pemanasan sampel pada suhu 55°C. Temperatur inkubasi memang dapat meningkatkan isolasi aktinomisetes yang dikehendaki.

Perlakuan awal pada sampel dapat menggunakan germisida kimia, contohnya fenol (1,5%), *chlorhexidine gluconat* 0,01%), atau *benzethonium chloride* (0,01%). Penambahan germisida akan mematikan spora *Streptomyces* dan sel vegetatif dari *Bacillus* dan *Pseudomonas*. Spora yang dapat diisolasi dari perlakuan germisida yaitu aktinomisetes dari beberapa genera seperti *Microbiospora*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Dactyloporangium*, *Streptosporangium*, dan *Microtetraspora*. Istianto, et al. (2012) telah berhasil mengisolasi *rare* Aktinomisetes yaitu *Micromonospora* (49,18%), *Streptomyces* (24,59%), *Actinomadura* (13,11%), *Microbiospora* (9,83%), dan *Polymorphospora* (3,27%) dari tanah di Indonesia dengan menggunakan perlakuan awal germisida fenol 1,5%.

Penggunaan kombinasi antibiotik sintetik pada media isolasi juga dilaporkan mampu meningkatkan selektivitas terhadap aktinomisetes. Kombinasi *cycloheximide*, *chlorotetracycline*, dan *nalidixic acid* dapat digunakan untuk mengisolasi *Nocardia* spp. dengan sangat baik. Hampir serupa, Mangamuri, et al. (2012) menggunakan kombinasi *nalidixic acid* dan *secnidazole* untuk meningkatkan selektivitas aktinomisetes dari ekosistem mangrove Nizampatnam di Malaysia.

Spora aerial dari kebanyakan kelompok aktinomisetes tahan terhadap pengeringan pemanasan basah maupun pemanasan kering kecuali untuk hifa vegetatif dapat rentan terhadap pengeringan. Pemanasan dengan suhu rendah tidak mempengaruhi jumlah aktinomisetes namun dapat mengurangi jumlah bakteri Gram negatif yang mengganggu saat skrining. Perlakuan awal pemanasan basah (*wet heating*) dilakukan pada suhu 70°C di dalam *waterbath* selama 1 jam,

sedangkan untuk pemanasan kering (*dry heating*) dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 jam (Sharma, et al., 2011)

## 2.4 Isolasi Aktinomistes

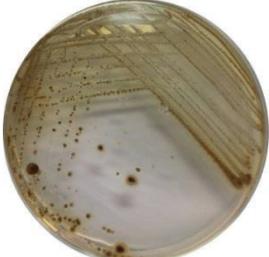
Isolasi aktinomistes menggunakan medium *starch-casein nitrat* (SCN) agar yang disuplementasi dengan 25 µg *nystatin* untuk menghambat pertumbuhan jamur. *Starch-casein* agar merupakan medium yang spesifik dan sensitif untuk pertumbuhan aktinomistes. Usha, et al. (2010) berhasil mengisolasi 15 isolat aktinomistes asal tanah dengan menggunakan medium *Starch-casein*. Khan, et al. (2011) juga berhasil mengisolasi dua isolat aktinomistes yang berasal dari *sponge* dengan menggunakan medium *Starch-casein* yang ditambahkan antifungi dan antibakteri. Pertumbuhan fungi dapat dieliminasi dengan menambahkan antifungi seperti nistatin atau sikloheksamid ke dalam media, sedangkan pertumbuhan bakteri dapat dieliminasi dengan menambahkan antibiotik ke dalam media.

Aktinomistes sangat lambat tumbuh pada cawan agar. Koloni baru terlihat pada media pertumbuhan setelah 4 – 20 hari inkubasi, bahkan ada beberapa strain yang baru muncul setelah 1 bulan atau lebih. Karena pertumbuhan aktinomistes relatif lama, maka penggunaan media khusus akan sangat berguna, demikian juga penambahan antibiotik dan antifungi ke dalam media. Untuk mengisolasi *Streptomyces*, misalnya telah digunakan media khusus yaitu media *International Streptomyces Project* (ISP). Atas dasar kemampuan aktinomistes yang jarang dijumpai pada mikroba lain, maka telah dikembangkan media isolasi *Arginine-glycerol salt*, *Benedict*, *Collodial chitin* dan *Starch-casein* yang hanya menguntungkan pertumbuhan aktinomistes dibandingkan mikroba yang lain.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa populasi aktinomistes umumnya diperoleh dari serasah di bawah vegetasi mangrove. Hal ini menunjukkan bahwa serasah vegetasi mangrove merupakan tanah yang

kaya akan bahan organik hasil pelapukan daun atau karena eksudat perakaran. Kawasan Segara Anakan sebagai daerah estuarin, mengalami pergerakan air pasang dan surut yang menyebabkan suatu kondisi yang tipikal. Hanya mikroorganisme dengan toleransi tinggi terhadap kebutuhan oksigen, temperatur, salinitas dan kelembaban yang selalu berubah yang mampu tetap menjaga survivalnya. Contoh empat isolat aktinomistes dari Segara Anakan Cilacap tersaji pada Tabel 6.

Tabel 6. Contoh isolat aktinomisetes dari Segara Anakan

Kode Isolat	Gambar	
	Tampak Atas	Tampak Bawah
W-1B		
P-6G		
P-7H		

Kode isolat diberikan berdasarkan nama daerah pengambilan sampel, nomor titik sampling, dan keanekaragaman aktinomisetes pada titik sampling tertentu. Contohnya, kode P berarti isolat dari daerah Kalipanas dan kode W isolat dari daerah Kutawaru. Angka setelah huruf merupakan nomor titik sampling, dan huruf terakhir menunjukkan keanekaragaman aktinomisetes yang didapatkan pada titik sampling tertentu. Sebagai contoh isolat W-1B, artinya bahwa isolat berasal dari Kutawaru pada titik sampling ke-1 dengan jenis aktinomisetes kedua (B).

## **BAB III. IDENTIFIKASI AKTINOMISETES**

### **3.1 Landasan Teori**

Aktinomisetes merupakan bakteri yang bersifat Gram positif. Dinding sel aktinomisetes mengandung lipid lebih rendah daripada bakteri Gram negatif, sehingga dalam pewarnaan terdehidrasi akibat pencucian oleh alkohol. Sebagai hasilnya permeabilitas berkurang dan kompleks kristal violet dan iodine tidak dapat melalui sel, maka sel akan tercat ungu.

Identifikasi aktinomistes dapat dilakukan pada tingkat morfologi koloni dan hifa. Pengamatan morfologi koloni dapat dilakukan menggunakan mikroskop stereo. Spora yang dihasilkan aktinomistes dapat diamati melalui pembuatan preparat *Henrici's Slide Culture* (HSC). Pengamatan dilakukan untuk mengamati bentuk, ukuran spora, dan rantai spora. Pada umumnya, morfologi rantai spora aktinomisetes memiliki ciri-ciri lurus, lentur, atau spiral.

Aktinomisetes diketahui memiliki sifat fisiologis yang beragam. Hal tersebut terlihat dari kemampuan aktinomisetes dalam memproduksi berbagai senyawa bioaktif yang bernilai penting. Untuk mengetahui potensi aktinomisetes maka sifat fisiologi dapat dilakukan dengan uji biokimia, karakterisasi nutrisi, serta karakterisasi fisiologi.

#### **3.1.1 Pengamatan morfologi koloni**

Pengamatan morfologi koloni diamati menggunakan mikroskop stereo meliputi pengamatan pertumbuhan radier dan pertumbuhan konsentris dari koloni, bentuk, ukuran, permukaan, elevasi, margin, miselium udara, miselium substrat, dan pigmentasi ke medium. Struktur

koloni yang diamati kemudian dibandingkan dengan referensi *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Parte, 2012).

### **3.1.2 Pengamatan morfologi hifa dengan pembuatan preparat HSC**

Pengamatan morfologi hifa menggunakan mikroskop binokular untuk mengamati keberadaan miselium udara (aerial) dan miselium substrat, penampakan miselium udara dan miselium substrat, keberadaan spora, serta susunan spora. Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan pembuatan preparat *Henrici's Slide Culture* (HSC).

*Object glass* dan *cover glass* dibersihkan dengan alkohol 70% dan didekatkan pada nyala api lampu spiritus. Pada bagian tengah *object glass* ditetesi medium SCN agar. Setelah medium memadat, isolat aktinomistes diulas dengan jarum ose kemudian ditutup dengan *cover glass*. Bagian tepi *cover glass* diberi lilin cair pada dua sisi berlawanan. Preparat diinkubasi dalam cawan petri steril berisi kapas yang telah dibasahi dengan aquades steril. Inkubasi dilakukan selama tujuh hari atau sampai ada pertumbuhan lebih lanjut. Hasil pengamatan dibandingkan dengan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Parte, 2012).

### **3.1.3 Pewarnaan Gram**

Pewarnaan Gram ditujukan untuk mengetahui sifat Gram dari isolat aktinomisetes serta untuk melihat bentuk sel. Isolat aktinomisetes diulas pada *object glass* lalu dilakukan fiksasi dengan melewati ulasan di atas nyala api sehingga sel melekat pada permukaan *object glass*. Kemudian diberi pewarna kristal violet (Gram A) sebagai pewarna pembuka. Dibiarkan beberapa saat kemudian dicuci dengan air mengalir. Setelah itu ditetesi larutan iodine (Gram B). Setelah dicuci dengan air mengalir diberi zat peluntur alkobol (Gram C). Akhirnya ulasan diberi zat warna penutup safranin (Gram D). Setelah dibiarkan beberapa saat kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Kemudian preparat dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x.

### 3.1.4 Karakterisasi Biokimiawi

Karakterisasi biokimiawi meliputi uji oksidase, uji katalase, uji oksidatif fermentatif, uji IMViC (*Indole, Methyl Red, Voges Proskauer, Citrate*), karakterisasi nutrisi, dan uji produksi asam. Pengujian oksidase dilakukan dengan cara mengambil isolat aktinomisetes menggunakan jarum ose, kemudian diulas pada kertas saring. Reagen oksidase (*Tetramethyl P-phenylenediamine dihydrochloride*) diteteskan pada ulasan dan ditunggu sampai 60 detik. Interpretasi positif akan berwarna biru tua yang kontras dengan kertas saring.

Pengujian katalase dilakukan dengan cara mengambil isolat aktinomisetes menggunakan jarum ose, kemudian diulas pada *object glass*. Reagen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diteteskan pada ulasan. Hasil uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas pada ulasan isolat.

Pengujian oksidatif-fermentatif dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat aktinomisetes pada dua tabung medium OF. Salah satu tabung ditambahkan dengan parafin cair untuk menciptakan kondisi anaerob (fermentatif), dan diinkubasi 7 hari pada suhu ruang. Hasil uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya perubahan warna medium dari hijau menjadi kuning.

Uji *Indole* dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat aktinomisetes pada 5 mL medium *Tryptone Broth* lalu diinkubasi 7 hari pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 2-3 tetes reagen *Kovack indole*. Hasil uji positif *Indole* ditunjukkan dengan terbentuknya cincin merah di atas medium.

Uji *Methyl Red* dilakukan dengan cara menginokulasikan aktinomisetes pada medium MR-VP 5 ml, dan diinkubasi 7 hari pada suhu ruang. Setelah inkubasi ditambahkan 2-3 tetes reagen *methyl red*. Hasil uji positif *methyl red* ditunjukkan dengan perubahan warna medium dari kuning menjadi merah.

Uji *Voges Proskauer* dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat aktinomisetes pada 5 mL medium MR-VP 5 dan diinkubasi 7 hari

pada suhu ruang. Setelah inkubasi ditambahkan 1 tetes  $\alpha$ -naftol dan 3 tetes KOH 40%. Hasil uji positif *methyl red* ditunjukkan dengan perubahan warna medium dari kuning menjadi merah.

Uji *Simmon's Citrate* dilakukan dengan cara menginokulasikan isolat aktinomisetes seara *streak* kontinu pada media *Simmon's citrate* agar miring, dan diinkubasi 7 hari pada suhu ruang. Hasil uji positif ditunjukkan dengan perubahan warna medium dari hijau menjadi biru.

Karakterisasi Nutrisional. Pengujian nutrisi dilakukan dengan menginokulasikan isolat aktinomistes pada medium uji nutrisi yang telah ditambahkan delapan jenis gula yang berbeda dengan konsentrasi 1%. Jenis gula yang digunakan adalah glukosa, rafinosa, manosa, laktosa, arabinosa, sukrosa, fruktosa, atau xylosa. Inkubasi dilakukan selama 7 hari pada suhu 30°C. Setelah masa inkubasi diamati adanya pertumbuhan kultur pada medium. Hasil uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya kekeruhan pada medium.

Karakterisasi fisiologis dilakukan dengan uji produksi asam. Isolat aktinomisetes diinokulasikan pada medium uji produksi asam yang telah ditambahkan indikator *phenol red* dan delapan jenis gula yang berbeda dengan konsentrasi 1%. Jenis gula yang digunakan adalah glukosa, rafinosa, manosa, laktosa, arabinosa, sukrosa, fruktosa, atau xylosa. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 7 – 14 hari. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya perubahan medium dari merah menjadi kuning dan gelembung udara terbentuk pada tabung Durham.

### **3.2 Karakterisasi Morfologi Koloni dan Hifa**

Pertumbuhan koloni aktinomistes mulai dapat diamati setelah inkubasi hari ke-2 menggunakan mikroskop stereo. Pertumbuhan koloni aktinomisetes pada medium padat diawali oleh spora tunggal, sporangium atau fragmen dari hifa atau miselium. Perkembangan koloni dapat bersifat *massa* yang kompak, pertumbuhan zona yang berbeda-beda dalam bentuk cincin konsentris dengan orientasi radial, atau merupakan

kombinasi keduanya. Ukuran koloni tergantung pada spesies, umur dan kondisi pertumbuhannya, dengan diameter koloni bervariasi dari medium hingga ukuran besar. Tipe koloni dapat timbul (*raised*) atau tumbuh rata, kadang-kadang ditutup dengan permukaan yang kasar berbeludru atau berbuk. Konsistensi koloni bervariasi dari sangat lembut sampai dengan yang amat keras.

Contoh hasil pengamatan pertumbuhan koloni W-1B, P-6G, dan P-7H tercantum pada Tabel 7. Isolat W-1B memiliki karakteristik bentuk koloni tidak beraturan (*irregular*) dengan ukuran  $\pm 6,6$  mm. Permukaan koloni *concentric*, elevasi koloni *umbonate*, dan tepi koloni *filiform*. Miselium substrat berwarna coklat muda dan miselium aerial berwarna putih, dan terdapat pigmentasi ke medium. Isolat P-6G memiliki karakteristik koloni *circular* dengan ukuran  $\pm 3,7$  mm. Permukaan koloni *convex*, elevasi koloni *raised*, dan tepi koloni rata. Miselium substrat berwarna coklat dan miselium aerial berwarna putih. Isolat P-7H memiliki karakteristik koloni *circular* dengan ukuran  $\pm 7,4$  mm. Permukaan koloni *cottony*, elevasi koloni *umbonate*, dan tepi koloni *filiform*. Miselium substrat berwarna coklat muda, miselium aerial berwarna putih.

Pengamatan miselium ditujukan terhadap penampakan hifa substrat dan hifa aerial, keberadaan spora dan susunannya, warna spora, serta adanya pigmen yang terdifusi ke dalam medium. Bakteri aktinomisetes tidak membentuk endospora seperti yang terdapat pada bakteri pembentuk endospora. Namun aktinomisetes membentuk konidia seperti pada fungi (atau konidiospora) yang terdapat pada konidiofor (atau sporofor). Konidia ini dapat dijadikan alat untuk identifikasi karena merupakan spesifikasi masing-masing spesies aktinomisetes.

Tabel 7. Hasil pengamatan morfologi koloni dan hifa

Kode Isolat	Gambar		Karakteristik koloni
	Koloni	Miselium	
W-1B			<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bentuk: <i>irregular</i></li> <li>2. Ukuran: <math>\pm 6,6</math> mm</li> <li>3. Permukaan: <i>concentric</i></li> <li>4. Elevasi: <i>umbonate</i></li> <li>5. Margin: <i>filiform</i></li> <li>6. Miselium udara: Putih</li> <li>7. Miselium Substrat: Coklat muda</li> <li>8. Pigmentasi: Ada</li> </ol>
P-6G			<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bentuk: <i>Circular</i></li> <li>2. Ukuran: <math>\pm 3,7</math> mm</li> <li>3. Permukaan: <i>convex</i></li> <li>4. Elevasi: <i>raised</i></li> <li>5. Margin: rata</li> <li>6. Miselium udara: Putih</li> <li>7. Miselium Substrat : Coklat</li> <li>8. Pigmentasi: Ada</li> </ol>
P-7H			<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Bentuk: <i>circular</i></li> <li>2. Ukuran: <math>\pm 7,4</math> mm</li> <li>3. Permukaan: <i>cottony</i></li> <li>4. Elevasi: <i>umbonate</i></li> <li>5. Margin: <i>filiform</i></li> <li>6. Miselium udara: Putih</li> <li>7. Miselium Substrat: Coklat gelap</li> <li>8. Pigmentasi : Ada</li> </ol>

Spora terletak pada ujung sporofor. Susunan dan jumlah spora memberikan bentuk hifa/miselium secara keseluruhan sehingga dikenal konidia yang lurus, spiral atau lengkung. Spora dihasilkan kelompok sporoaktinomisetes. Aktinomisetes yang tidak membentuk spora, disebut juga sebagai bakteri nocardioform, di mana hifa mengalami fragmentasi menjadi bentuk coccoid atau seperti batang yang dapat tumbuh menjadi miselium baru. Fungsi dari spora sejati dan spora hasil fragmentasi adalah sama, sehingga pada banyak kasus hal tersebut sering menyulitkan pengamatan.

Contoh hasil pengamatan miselium isolat W-1B, P-6G, dan P-7H tercantum pada Tabel 7. Isolat W-1B memiliki hifa substrat yang halus

dan bercabang. Hifa substrat dibentuk dari percabangan miselium yang terpecah-pecah. Setiap hifa aerial terdiri banyak rantai spora yang membentuk struktur seperti spiral dan percabangan hifa bersepat. Pengamatan morfologi tersebut mengindikasikan bahwa isolat W-1B, P-6G, dan P-7H merupakan genus *Streptomyces*.

### 3.3 Karakterisasi Biokimiawi Aktinomisetes

Uji biokimiawi memberikan karakteristik dari isolat aktinomisetes. Contoh hasil karakterisasi biokimiawi Isolat W-1B, P-6G, dan P-7H, tersaji pada Tabel 8. Isolat W-1B, P-6G, dan P-7H mempunyai sifat oksidatif dan fermentatif. Isolat yang positif uji oksidatif menunjukkan sifat aerob sedangkan yang menunjukkan hasil positif uji fermentatif menunjukkan sifat anaerob atau dapat juga positif keduanya disebut dengan sifat fakultatif. Hasil uji IMViC menunjukkan bahwa semua isolat negatif pada uji *indole*, *methyl red* sedangkan uji *Voges Proskauer* menunjukkan isolat P-7H dan P-6G hasil positif dan W-1B negatif. Uji *citrate* menunjukkan hasil yang positif untuk ketiga isolat. Hasil uji oksidase dan katalase juga menunjukkan hasil yang positif untuk ketiga isolat (Tabel 8).

Tabel 8. Hasil karakterisasi biokimiawi isolat aktinomistes

Karakteristik	W-1B	P-6G	P-7H
Pewarnaan Gram	+	+	+
Oksidase	+	+	+
Katalase	+	+	+
Oksidatif	+	+	+
Fermentatif	+	+	+
<i>Indole</i>	-	-	-
<i>Methyl red</i>	-	-	-
<i>Voges Proskauer</i>	-	+	+
<i>Citrate</i>	+	+	+

Keterangan: (+) = positif; (-) = negatif

Ketiga isolat aktinomisetes mampu menggunakan semua jenis gula sebagai satu-satunya sumber karbon. Penggunaan jenis gula sebagai sumber karbon dipengaruhi oleh aktivitas enzimatis di dalam sel. Tidak semua mikroorganisme dapat menggunakan semua jenis gula sebagai sumber karbon, karena keterbatasan aktivitas enzim. Keterbatasan dalam menggunakan jenis gula tertentu sebagai sumber karbon dapat digunakan sebagai kunci melakukan identifikasi terhadap jenis tertentu. Hasil uji sumber karbon menunjukkan ketiga isolat dapat menggunakan sumber karbon glukosa, raffinosa, mannosa, laktosa, arabinosa, sukrosa, fruktosa dan xylosa (Tabel 9).

Tabel 9. Hasil uji nutrisi isolat aktinomisetes

Sumber karbon	Isolat aktinomisetes		
	W-1B	P-6G	P-7H
Glukosa	+	+	+
Raffinosa	+	+	+
Mannosa	+	+	+
Laktosa	+	+	+
Arabinosa	+	+	+
Sukrosa	+	+	+
Fruktosa	+	+	+
Xylosa	+	+	+

Keterangan: (+) = positif; (-) = negatif

Penggunaan jenis gula sebagai produksi asam setiap isolat menunjukkan hasil yang negatif. Hasil pengujian menunjukkan semua isolat aktinomisetes tidak menghasilkan asam dari gula (Tabel 10). Hasil positif uji produksi asam adalah terdapat perubahan warna dari merah menjadi kuning dan menghasilkan gelembung gas. Perubahan warna dapat menunjukkan isolat tersebut dapat mendegradasi sumber karbon sehingga menyebabkan pH medium menjadi turun. Gelembung gas terbentuk dikarenakan hasil metabolisme sempurna mikroorganisme. Setiap isolat menghasilkan asam berbeda, isolat aktinomisetes W-1B dan P-7H dapat menghasilkan asam pada sumber karbon glukosa tetapi belum

menghasilkan gelembung gas. Isolat P-6G dapat menghasilkan asam pada karbon glukosa, mannososa dan laktosa tetapi belum menghasilkan gelembung gas.

Tabel 10. Hasil uji produksi asam

Sumber karbon	Isolat aktinomisetes		
	W-1B	P-6G	P-7H
Glukosa	+	+	+
Raffinosa	-	-	-
Mannosa	-	+	-
Laktosa	-	+	-
Arabinosa	-	-	-
Sukrosa	-	-	-
Fruktosa	-	-	-
Xylosa	-	-	-

Keterangan: (+) = positif; (-) = negatif

Berdasarkan hasil karakterisasi secara morfologi dan biokimiawi isolat aktinomisetes W-1B, P-6B, dan P-7H memiliki kemiripan karakter dengan genus *Streptomyces*. Salah satu ciri khas spesies anggota genus *Streptomyces* yaitu koloni diselimuti oleh miselium udara (aerial) yang bebas dan hifa dikelilingi oleh selubung inti (*sheath*), bersifat hidrofobik, miselium mengarah dari permukaan koloni ke atas. *Streptomyces* memiliki rantai spora pada hifa aerial dan memiliki miselium yang tinggi dan rantai sporanya panjang. Spora tersusun dalam bentuk kumparan yang menggulung atau berpilin, dan ada juga yang berbentuk untaian panjang melengkung. Menurut Tyagi, et al. (2014), semua isolat *Streptomyces* hasil isolasi dari tanah tidak memiliki hasil uji positif pada uji indole dan hanya ada beberapa isolat yang mampu menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Isolat *Streptomyces* perakaran mangrove Segara Anakan menggunakan sumber karbon di antaranya fruktosa, xylosa, maltose, laktosa, mannososa, arabinosa, dan glukosa (Akbar, et al., 2017).

Augustine, et al. (2013) melaporkan bahwa isolat aktinomisetes khususnya genus *Streptomyces* dan *Nocardiopsis* yang diisolasi dari sampel sedimen laut Arabian dan Bay dari Bengal mempunyai aktivitas penggunaan sumber karbon dan menghasilkan asam dari berbagai jenis gula, di antaranya gula arabinosa, rhamnosa, xylosa, glukosa, galaktosa, laktosa, trehalosa, mannitol, sorbitol, dan inositol. Parte, (2012) dalam *Bergey's Manual Determinative of Bacteriology* mendeskripsikan bahwa dari 150 isolat *Streptomyces* memiliki beberapa karakter kunci yang dapat dijadikan acuan dalam penentuan genus dan spesies. Karakter kunci tersebut meliputi ciri-ciri bentuk miselium secara mikroskopis (*rectus, flexibilis, open loops, spiral, monoverticillus, monoverticillus-spira, biverticillus dan biverticillus-spira*), positif terhadap sebagian besar uji nutrisi baik monosakarida, disakarida dan polisakarida, mampu memanfaatkan kasein sebagai sumber N, mampu mereduksi nitrat, positif terhadap uji katalase dan mampu hidup dalam suspensi gelatin.

## **BAB IV. IDENTIFIKASI AKTINOMISETES BERBASIS GEN 16S**

Analisis gen penyandi 16S rRNA telah menjadi prosedur baku untuk menentukan hubungan filogenetik dan menganalisis suatu ekosistem. Gen 16S rRNA dapat digunakan sebagai penanda molekuler karena molekul ini bersifat ubikuitus dengan fungsi yang identik pada seluruh organisme. Molekul ini juga dapat berubah sesuai jarak evolusinya, sehingga dapat digunakan sebagai kronometer evolusi yang baik. Pada prokaryota terdapat tiga jenis RNA ribosomal, yaitu 5S, 16S, dan 23S rRNA. Di antara ketiganya, 16S rRNA yang paling sering digunakan. Molekul 5S rRNA memiliki urutan basa terlalu pendek, sehingga tidak ideal dari segi analisis statistika, sementara molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang sehingga menyulitkan analisis.

Identifikasi spesies aktinomisetes dapat dilakukan berdasarkan data sekuen gen 16S rRNA. Gen 16S rRNA dengan panjang fragmen sekitar 1.500 bp mempunyai beberapa daerah sekuen konservatif dan juga daerah dengan sekuen sangat bervariasi (*hypervariable*). Oleh karena itu, gen 16S rRNA biasa digunakan untuk menentukan identitas dan filogeni aktinomisetes. Tahapan yang dilakukan untuk mengidentifikasi spesies aktinomisetes berbasis gen 16S rRNA adalah (1) isolasi DNA genom, (2) amplifikasi gen 16S rDNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), (3) elektroforesis ampikon DNA dan visualisasi, (4) sekuensing dengan metode Sanger, (5) editing sekuen DNA dengan program BioEdit, (6) pensejajaran sekuens (*Multiple Sequence Alignment*), (7) identifikasi spesies dengan program BLAST, dan (8) konstruksi pohon filogenetik dengan program MEGA.

## 4.1 Landasan Teori

DNA (*Deoxyribonucleic acid*) adalah asam nukleat yang mengandung materi genetik dan berfungsi untuk mengatur perkembangan biologis seluruh bentuk kehidupan. Bakteri sebagai makhluk hidup memiliki informasi genetik berupa DNA, tetapi tidak terlokalisasi dalam tempat khusus (nukleus) dan tidak memiliki membran inti. DNA bakteri terdapat di nukleus, mitokondria, dan kloroplas. Keseluruhan DNA dalam suatu sel akan membentuk genom yang fungsional maupun non-fungsional dalam sel organisme.

Larutan DNA hasil isolasi dapat diukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. DNA/RNA (*double-helical/single-stranded*) mempunyai puncak absorpsi pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 260 nm. DNA murni dapat menyerap cahaya UV karena keberadaan basa-basa purin dan pirimidin. Kandungan protein dapat diukur pada  $\lambda$ 280 nm karena protein atau phenol akan menyerap cahaya pada  $\lambda$ 280 nm.

Penggandaan DNA dapat dilakukan secara *in vitro* melalui reaksi enzimatik polimerasi berantai atau dikenal sebagai *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Metoda PCR memungkinkan adanya perbanyakan DNA antara dua primer, hanya di dalam tabung reaksi, tanpa perlu memasukkannya ke dalam sel (*in vivo*). Pada setiap siklus PCR akan diperoleh  $2^n$  kali banyaknya DNA target. Pada proses PCR dibutuhkan DNA untai ganda yang berfungsi sebagai cetakan (*template*) yang mengandung DNA-target (yang akan diamplifikasi) untuk pembentukan molekul DNA baru, enzim DNA polimerase, deoksinukleosida trifosfat (dNTP), dan sepasang primer oligonukleotida. Tiga tahapan utama dalam proses PCR, yaitu denaturasi DNA untai ganda, pelekatan primer (*annealing*) dan pemanjangan primer (elongasi). Kunci utama pengembangan PCR adalah menemukan bagaimana cara amplifikasi hanya pada urutan DNA target dan meminimalkan amplifikasi urutan non-target.

Elektroforesis adalah metode pemisahan molekul DNA berdasarkan muatan, ukuran, dan bentuk. Prinsip elektroforesis adalah migrasi molekul yang bermuatan dalam suatu medan listrik. Molekul-molekul yang bermuatan negatif (anion) akan bergerak menuju kutub positif (anoda), sedangkan molekul yang bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (katoda). Teknik ini sederhana, cepat terbentuk, dan mampu memisahkan campuran potongan DNA sesuai dengan ukurannya secara akurat.

Sekuensing DNA merupakan metode yang digunakan untuk menentukan urutan nukleotida Arginine (A), Sitosin (C), Guanine (G), Timin (T) pada molekul DNA. Saat dilakukan sekuensing terhadap gen yang telah diisolasi akan didapatkan hasil sekuensing dalam bentuk file dengan ekstensi .ab1. File ini merupakan hasil dari mesin sekuensing. Keterbatasan kemampuan mesin sekuensing menyebabkan tidak semua bagian DNA dapat diketahui urutan basanya (maksimal 1000 bp). Untuk mengatasi hal tersebut dapat dilakukan sekuensing menggunakan primer dua arah (*Forward and Reverse primers*) untuk meminimalisasi kemungkinan kesalahan dalam proses sekuensing. Primer tersebut menentukan titik awal sintesis dan arah reaksi sekuensing DNA. Kedua hasil sekuensing tersebut selanjutnya dapat digabungkan untuk mendapatkan sebuah gen utuh menggunakan program BioEdit.

Identifikasi spesies dapat dilakukan dengan membandingkan antara sekuen DNA sampel dan data sekuen DNA yang telah dipublikasikan sebelumnya di *Gene Bank*. Program yang digunakan adalah BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*). Prinsip cara kerja program BLAST serupa dengan mesin pencari (*search engine*) pada umumnya. Hanya saja, input yang dimasukkan di BLAST adalah urutan basa DNA. Program BLAST dapat diakses melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

Untuk mempelajari evolusi sekuen-sekuen dari leluhur yang sama (*common ancestor*) dapat dilakukan analisis *sequence alignment*.

Metode ini memberikan hipotesis atas proses evolusi yang terjadi dalam sekuens-sekuens. Untuk menemukan urutan basa yang konservatif dalam banyak sekuens dapat menggunakan teknik *Multiple Sequence Alignment* (MSA). Teknik ini sangat penting untuk identifikasi *single nucleotide polymorphism* (SNP), konstruksi pohon filogenetik, dan *metagenome fragments binning*. Algoritma sederhana untuk MSA adalah Algoritma Star. Algoritma ini terdiri atas tiga tahap, yaitu menjajarkan semua kemungkinan pasangan sekuens, menentukan sekuens star yang dipilih dari sekuens yang memiliki nilai penjajaran maksimum, dan menjajarkan semua sekuens terhadap sekuens star. MSA dapat dilakukan dengan program Clustal.

Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena urutan basa tersebut mengalami perubahan relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Pohon filogenetik dibuat untuk memvisualisasikan hubungan evolusi di antara berbagai spesies. Pohon filogenetik yang berupa diagram bercabang-cabang ini dapat dikonstruksi berdasarkan kesamaan atau perbedaan sifat fisik atau genetik seperti sekuens DNA, sekuens asam amino (protein), pola pemotongan enzim restriksi, atau ukuran alel pada analisa *microsatellite*.

#### **4.1.1 Isolasi DNA**

Isolasi DNA menggunakan Presto™ Mini gDNA *Bacteria Kit Geneaid*. Sebanyak 1,5 mL kultur cair mikroba disentrifus dalam tabung mikro sentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 14000-16000 x g. Kemudian supernatan yang diperoleh dibuang, sedangkan endapannya dicuci dengan akuades, dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14000-16000 x g, supernatan dibuang, endapan diresuspensi dengan menambahkan lisozim yang dilarutkan dalam buffer gram (+) sebanyak 200 µL. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex hingga homogen, setelah homogen, larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit,

setelah diinkubasi larutan ditambahkan 20  $\mu\text{L}$  Proteinase K ke dalam larutan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$ . Ketika inkubasi berjalan, tabung mikrosentrifus dibolak-balik tiap 3 menit.

Setelah diinkubasi, ke dalam tabung ependorf ditambahkan 200  $\mu\text{L}$  GB Buffer dan kemudian sampel dihomogenkan dengan di vortex selama 10 detik, selanjutnya sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$ . Selama inkubasi berjalan tabung ependorf diketuk-ketuk selama 3 menit. Sampel ditambahkan 200  $\mu\text{L}$  Elution Buffer. Selanjutnya setelah diinkubasi pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$ , sampel ditambahkan 5  $\mu\text{L}$  RNase kemudian dikocok dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit.

Sebanyak 200  $\mu\text{L}$  etanol absolut ditambahkan ke dalam larutan, dan kemudian dikocok. Selanjutnya larutan dipindahkan ke dalam *collection tube* dan disentrifugasi dengan kecepatan 14000-16000 x g hingga terbentuk matriks pada kolom selama 2 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang dan endapan diresuspensi dengan *Wash Buffer* sebanyak 400  $\mu\text{L}$  kemudian disentrifus dengan kecepatan 14000-16000 x g selama 30 detik kemudian supernatan dibuang. Endapan diresuspensi lagi dengan *Wash Buffer* sebanyak 600  $\mu\text{L}$ , kemudian disentrifus dengan kecepatan 14000-16000 x g selama 3 menit, kemudian aliran yang melewati *collection tube* dibuang. Bagian GD Coloumn dikembalikan ke *collection tube*. Disentrifugasi kembali selama 3 menit dengan kecepatan 14000-16000 x g hingga terbentuk matriks pada kolom.

Bagian bawah *collection tube* diganti dengan *microcentrifuge tube*. Selanjutnya memasukan *Elution Buffer* di tengah-tengah matriks kolom. Setelah ditambahkan *Elution Buffer* kemudian dibiarkan sampai kurang lebih 3 menit dan setelah selesai disentrifus selama 30 detik hingga didapatkan DNA murni.

Larutan DNA yang dihasilkan diukur konsentrasi dan kemurniannya menggunakan UV Spektrofotometer. Kuvet diisi dengan 3 mL akuades lalu ditambahkan 30  $\mu\text{L}$  larutan DNA dan diaduk perlahan hingga homogen. Konsentrasi DNA diukur pada  $\lambda 260\text{ nm}$ , sedangkan

kemurnian DNA diukur pada  $\lambda 280$  nm. Apabila absorbansi pada  $\lambda 260$  nm sama dengan 1 menunjukkan bahwa konsentrasi DNA adalah 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Kemurnian DNA diukur berdasarkan indeks kemurnian DNA. DNA hasil isolasi dengan kemurnian  $\geq 1,75$  selanjutnya digunakan untuk amplifikasi DNA.

- Nilai absorbansi 1,0 pada  $\lambda 260$  nm sebanding dengan 50  $\mu\text{g}$  DNA/mL.
- Konsentrasi DNA  $\mu\text{g}/\text{mL} = (A \text{ pada } \lambda 260 \times 50 \mu\text{g}/\text{mL}) \times \text{faktor pengenceran}$
- Indeks kemurnian DNA =  $\lambda 260 / \lambda 280$
- DNA dikatakan murni jika indeks kemurnian minimal 1,75.

#### 4.1.2 Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA menggunakan PCR kit KAPA *Taq Extra HotStart ReadyMix with dye*. Komposisi reagen untuk proses PCR sampel DNA adalah sebagai berikut. 19  $\mu\text{L}$  PCR grade water, 25 $\mu\text{L}$  2X KAPA *Taq Extra HotStart ReadyMix with dye*, 2 $\mu\text{L}$  primer 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTC AG) konsentrasi 0.5  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{L}$  primer 1492R (TACGGYTACCTT GTTTACGACTT) konsentrasi 0.5  $\mu\text{M}$ , dan 2  $\mu\text{L}$  DNA template konsentrasi 0.5  $\mu\text{M}$  untuk satu prosedur. Kondisi PCR adalah sebagai berikut. Pemanasan pertama 95°C selama 3 menit, kemudian dilanjutkan dengan denaturasi 15 detik pada suhu 94°C, *annealing* 15 detik pada suhu 50°C, ekstensi 1 menit pada suhu 68°C, pendinginan (*cooling*) pada suhu 4°C dan menggunakan 30 siklus (A. Asnani et al., 2016). Pengecekan hasil PCR dilakukan dengan elektroforesis agarosa 1%. Produk PCR yang dimasukkan ke dalam sumuran tanpa ditambahkan *loading dye*.

#### 4.1.3 Elektroforesis dan visualisasi

DNA hasil amplifikasi PCR dianalisis dengan elektroforesis pada agarosa 1%. Sebanyak 0,4 g agarosa ditambah 40 mL buffer TAE 1x lalu

campuran diaduk sambil dipanaskan hingga homogen. Setelah larutan agarosa mulai hangat (57°C) ditambahkan EtBr 1 µL (konsentrasi akhir 0,5 µg/mL). Larutan lalu dituang dalam pencetak gel dengan sisir yang sudah terpasang kurang lebih 1 cm dari ujung pencetak gel. Jika ada gelembung udara, maka gelembung tersebut dihilangkan atau disingkirkan menggunakan ujung tip pipet mikro. Gel didiamkan selama 15 menit sampai membeku. Setelah gel padat, sisir dilepaskan secara hati-hati.

Gel dimasukkan ke dalam instrumen elektroforesis yang telah diisi buffer TAE 1x. Sebanyak 10 µL sampel DNA hasil PCR dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa. Elektroforesis dilakukan dalam buffer TAE 1x selama 1 jam pada 100 V, 500 mA. Hasil elektroforesis divisualisasi pada *Gel Doc Printgraph* (Bioinstrument, ATTO) menggunakan UV transiluminator untuk mengetahui hasil dan ukuran pita DNA. DNA ampikon yang menunjukkan kemurnian dan ketepatan ukuran pita DNA selanjutnya dilakukan sekuensing DNA.

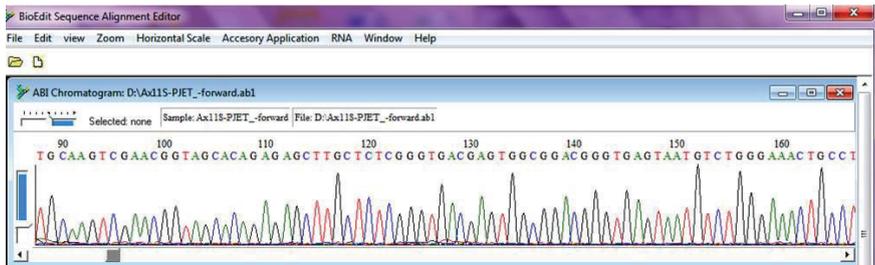
#### **4.1.4 Sekuensing DNA hasil PCR**

Sekuensing fragmen gen 16S rRNA mikroba dilakukan menggunakan primer forward 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) dan primer reverse 1492R (TACGGYTACCTTGTTTACGACTT) yang digunakan pada proses amplifikasi fragmen 16S rRNA. Sampel DNA hasil PCR dikirim ke 1<sup>st</sup> BASE Singapore. Sekuensing dilakukan dengan metode Sanger. Hasil sekuensing DNA selanjutnya dianalisis menggunakan program BioEdit.

#### **4.1.5 Editing sekuens DNA**

Hasil sekuensing DNA adalah file dengan ekstensi .ab1 yang merupakan hasil dari mesin sekuensing. Selain itu, juga akan ada file dengan ekstensi .fas dan .pdf yang masing-masing berisi sekuens DNA hasil sekuensing dalam format FASTA dan grafik elektrograf. Langkah pertama yang harus dilakukan setelah menerima file hasil sekuensing

adalah melakukan pemeriksaan visual terhadap hasil sekuensing. Langkah yang dilakukan sebagai berikut. File yang berekstensi .ab1 dibuka dengan program BioEdit spade window elektrograf (Gambar 2).



Gambar 2. Kromatograf sekuens DNA

Urutan nukleotida divisualisasikan sebagai puncak dengan empat warna yang berbeda. Seluruh grafik diperiksa dengan menggulung (*scroll*) sampai ujung urutan nukleotida. Hasil sekuensing yang baik ditunjukkan oleh grafik yang puncaknya tinggi dan terpisah satu sama lain. Sedangkan hasil sekuensing yang buruk ditunjukkan oleh grafik yang puncaknya landai atau tidak terpisah satu sama lain. Jika hasil sekuensing baik, langkah selanjutnya adalah menyimpan hasil sekuensing tersebut ke dalam format FASTA untuk analisis selanjutnya. Namun, jika hasil sekuensing tidak begitu baik maka ada dua pilihan yang dapat dilakukan yaitu sekuensing ulang atau dilakukan analisis *contig* dengan membuang daerah yang bukan merupakan hasil konsensus dari kedua sekuens.

*Contig* (berasal dari kata *contiguous*) dapat didefinisikan sebagai rekonstruksi dari serangkaian bagian DNA yang saling tumpang tindih. Analisis *contig* dapat dilakukan sebagai berikut.

- a. Buka “*New Alignment*” pada program BioEdit.
- b. Klik menu: *File | Import | Sequence alignment file*.
- c. Pilih kedua file yang akan dianalisis *contig* (tekan dan tahan tombol *Ctrl*).

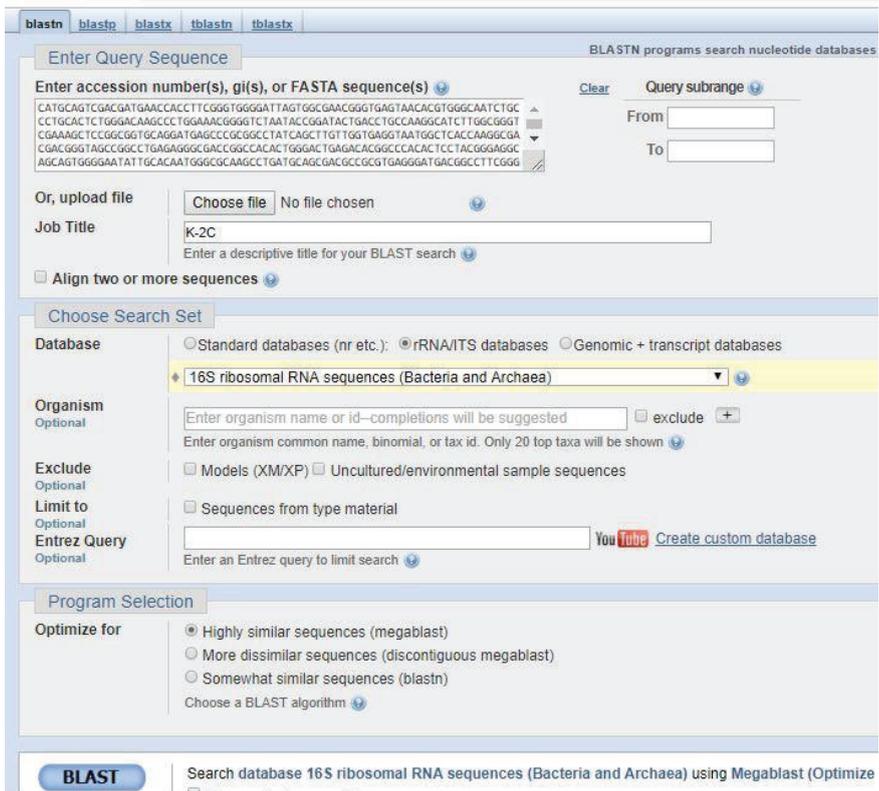
- d. Simpan file dengan nama baru dalam format FASTA. Sebaiknya setiap proses pengeditan, file disimpan dengan nama berbeda untuk menghindari hilangnya jejak data jika salah mengedit.
- e. Pilih *sekuen reverse* dengan mengklik nama sekuen tersebut.
- f. Lakukan “*Reverse Complement*” melalui menu: *Sequence | Nucleic Acid | Reverse Complement*.
- g. Lakukan “*Pairwise Alignment*” melalui menu: *Sequence | Pairwise alignment | Align two sequence (allow ends to slide)*.
- h. Hasil dari *pairwise alignment* adalah daerah yang saling tumpang tindih dari kedua sekuen tersebut. Dari hasil ini dapat diketahui apakah kedua sekuen tersebut dapat *dicontig*, dan dapat dihasilkan sekuen DNA utuh.
- i. Tampilkan sekuen konsensus dari hasil *contig* dengan menu: *Alignment | Create consensus sequence*.
- j. Hasil dari *consensus sequence* merupakan hasil dari penggabungan kedua hasil sekuensing dengan arah yang berbeda. Sekuen inilah yang digunakan untuk proses kerja lanjutan.
- k. Klik sekuen konsensus kemudian pilih menu: *Edit | Copy Sequences to Clipboard* (fasta format).
- l. Buka file teks baru dari menu: *File | New text*. *Paste* sekuen konsensus.
- m. Agar memudahkan dalam analisis selanjutnya, sekuen dapat diubah menjadi format FASTA dengan menambahkan tanda “lebih besar dari” ( > ) diikuti dengan nama sekuen dan sekuen DNA pada baris kedua

#### 4.1.6 Identifikasi spesies

Urutan sekuen fragmen gen hasil editing selanjutnya di *up-load* ke GenBank melalui program *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) pada website *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) untuk mengetahui kemiripan spesies dari

urutan sekuen fragmen yang dianalisis. BLAST akan membandingkan sekuen nukleotida sampel dengan database sekuen nukleotida. Cara identifikasi sekuens pada program BLAST adalah sebagai berikut.

- Buka laman [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
- Pilih menu BLAST, pilih menu *nucleotida blast*,
- Sekuen DNA dengan format FASTA dimasukan pada menu *enter query sequence* dengan cara *copy/paste*.
- Pilih database 16S ribosomal RNA *sequences (Bacteria and Archaea)*,
- Setelah semua menu dilengkapi klik BLAST (Gambar 3),
- Tunggu beberapa saat, dan hasil identifikasi sekuen bisa diperoleh,
- Catat hasilnya.



Gambar 3. Contoh BLAST nukleotida menggunakan database gen 16S

Hasil dari proses BLAST menunjukkan beberapa sekuen spesies atau strain bakteri dengan berbagai presentase kemiripan, selanjutnya dipilih satu sekuen dengan presentase kemiripan tertinggi. Pengunduhan sekuen lain yang memiliki presentase kemiripan tinggi dan panjang basa hampir sama atau *out-group* juga dilakukan untuk sekuens pembandingan.

#### 4.1.7 Konstruksi pohon filogenetik

Konstruksi pohon filogenik dilakukan dengan program MEGA melalui dua tahap yaitu pensejajaran sekuens dan konstruksi pohon filogenetik (Tamura, et al., 2013). Prosedur pensejajaran dengan MEGA adalah sebagai berikut.

- a. Pilih menu: *Align | Edit | Build New Alignment | Create New Alignment | Ok | DNA*.
- b. Pada jendela *M7 Alignment explorer*, sekuen DNA sampel dan DNA spesies pembandingan dibuka dengan menu: *Edit | Insert sequence from file*.
- c. Pensejajaran dilakukan pada menu: *Edit | Select All | Alignment | Align with ClustalW | Ok*.
- d. Sekuen yang tidak menunjukkan informasi homolog dibersihkan dengan cara menghapus ujung kiri dan kanan sampai terlihat rata atau homolog melalui menu: *Edit | Cut*.
- e. Hasil pembersihan yang disimpan melalui menu: *Data | Export Alignment | MEGA Format*.

Sekuens yang telah disejajarkan kemudian dianalisis lebih lanjut untuk konstruksi pohon filogenetik. Tahapannya adalah sebagai berikut.

- a. Sekuen DNA yang telah di sejajarkan dibuka dengan program MEGA melalui menu: *Align | Edit | Build Alignment | Retrieve sequences from a File | Ok*.
- b. Lalu pilih file yang akan dikonstruksi pohon filogenetik.

- c. Konfirmasi pembuatan pohon filogenetik dilakukan pada jendela M7 *Alignment explorer* melalui menu: *Data | Phylogenetic Analysis | Yes*.
- d. Konstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan metode statistik *Maximum Likelihood* pada jendela MEGA7 melalui menu: *Analysis | Phylogeny | Construct | Test Maximum Likelihood Tree | Pilih File yang dikehendaki*.
- e. Pada jendela M7 *Analysis Preferences: Test of phylogeny* dipilih *Bootstrap method | Compute*.
- f. Tes filogeni yang digunakan berupa metode *bootstrap* (jumlah replikasi sebanyak 1000x) dan model substitusi *p-distance*.
- g. Pohon filogenetik dievaluasi dan disimpan dalam format gambar melalui menu: *Image | Save as PNG*.

## 4.2 Isolasi dan Amplifikasi Gen 16S rRNA

Isolasi DNA merupakan tahapan penting pada identifikasi molekular, genetika, dan genom aktinomisetes. Isolasi DNA dilakukan melalui tiga tahap yaitu lisis dinding sel, pemurnian DNA dari ekstrak sel, dan presipitasi DNA untuk memperoleh DNA murni. Indeks kemurnian DNA dihitung berdasarkan perbandingan absorbansi DNA pada  $\lambda 260$  nm dan absorbansi protein pada  $\lambda 280$  nm.

Hasil pengukuran absorbansi menunjukkan bahwa konsentrasi DNA yang diperoleh dari hasil isolasi DNA isolat W-1B, P-6G, dan P-7H adalah 125, 110, dan 85  $\mu\text{g/mL}$ . Indeks kemurnian DNA isolat W-1B, P-6G, dan P-7H adalah 2,083; 2,440; dan 2,125. (Tabel 11). Indeks kemurnian DNA berdasarkan hasil perbandingan nilai absorbansi DNA dan protein adalah  $> 1,8$  sehingga dapat dikatakan bahwa DNA hasil isolasi dinyatakan murni dan dapat digunakan untuk amplifikasi PCR.

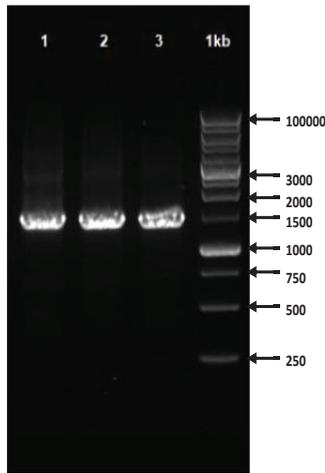
Tabel 11. Hasil isolasi DNA isolat W-1B, P-6G, dan P-7H

Isolat	Absorbansi		Kemurnian DNA	Konsentrasi DNA ( $\mu\text{g/mL}$ )
	$\lambda 260$	$\lambda 280$		
W-1B	0,025	0,012	2,083	125
P-6G	0,022	0,009	2,440	110
P-7H	0,017	0,008	2,125	85

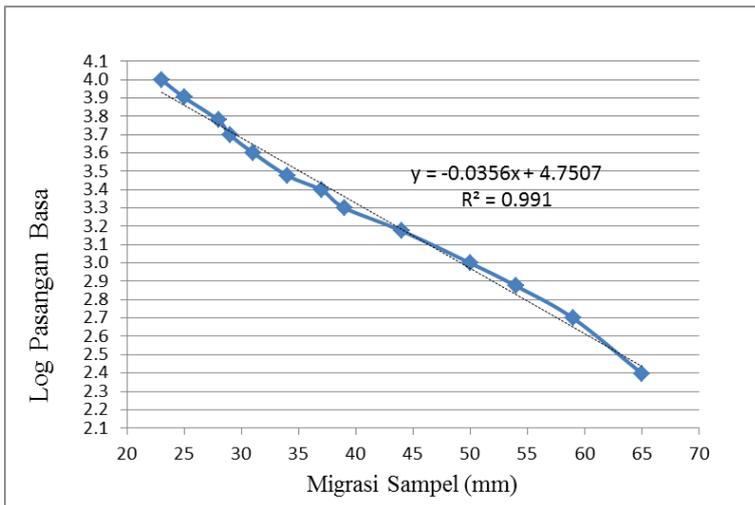
Amplifikasi gen *16S rDNA* aktinomisetes dilakukan menggunakan primer universal, yaitu primer *forward* 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) dan primer *reverse* 1492R (TACGGYTACCTTGTTCAGACTT). Pada kondisi tertentu, kedua primer akan mengenali dan berikatan dengan untai DNA komplemennya yang terletak pada awal dan akhir fragmen DNA target, sehingga kedua primer tersebut akan menyediakan gugus hidroksil bebas pada karbon 3'. Setelah kedua primer menempel pada DNA templat, DNA polimerase mengkatalisis proses pemanjangan kedua primer dengan menambahkan nukleotida yang komplemen dengan urutan nukleotida templat. DNA polimerase mengkatalisis pembentukan ikatan fosfodiester antara OH pada karbon 3' dengan gugus 5' fosfat dNTP yang ditambahkan. Sehingga proses penambahan dNTP yang dikatalisis oleh enzim DNA polimerase ini berlangsung dengan arah 5'→3' dan disebut reaksi polimerisasi. Enzim DNA polimerase hanya akan menambahkan dNTP yang komplemen dengan nukleotida yang terdapat pada rantai DNA *template*.

Pemisahan fragmen DNA pada elektroforesis menggunakan gel agarosa sebagai matriksnya. Etidium bromida akan berinterkalasi atau menempel di antara basa-basa DNA dan berfluoresen di bawah sinar ultraviolet. Marker adalah segmen DNA spesifik yang telah diketahui ukurannya. Marker berfungsi sebagai acuan untuk mengetahui ukuran DNA hasil amplifikasi. Pewarna etidium bromide digunakan dalam proses elektroforesis untuk visualisasi DNA. Hasil elektroforesis dari

amplikon DNA produk PCR isolat W-1B, P-6G, dan P-7H yang di *running* dengan marka DNA 1 kb tersaji pada Gambar 4.



(A)



(B)

Gambar 4. (A) Gel elektroforesis hasil PCR isolat (1) W-1B, (2) P-6G, dan (3) P-7H dengan marka DNA 1 Kb; (B) Grafik hubungan Log pasangan DNA dengan jarak migrasi dari standar DNA.

Berdasarkan data migrasi marka DNA (Tabel 12), maka dapat dibuat grafik hubungan antara log pasangan basa dengan jarak migrasi marka DNA tersebut sehingga diperoleh persamaan regresi  $y = -0.0356x + 4.7507$  yang dapat digunakan untuk menentukan berat molekul nukleotida dari DNA sampel. Bila jarak migrasi DNA isolat W-1B, P-6G, dan P-7H adalah 45, 44, dan 44 mm, maka berdasarkan perhitungan teoretis berat nukleotida W-1B, P-6G, dan P-7H adalah 1408 bp, 1529 bp, 1529 bp. Hasil elektroforesis juga menunjukkan migrasi pita DNA W-1B, P-6G, dan P-7H sejajar dengan marka  $\pm 1500$  bp (Gambar 4). Mengingat bahwa target amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer 27F dan 1492R adalah sekitar  $\pm 1500$  bp maka dapat disimpulkan bahwa amplifikasi DNA isolat W-1B, P-6G, dan P-7H telah berhasil dilakukan.

Tabel 12. Migrasi produk amplifikasi DNA dan standard DNA

No.	Ukuran Marka (bp)	Migrasi Marka (mm)	Log pasangan Basa
1	10000	23	4
2	8000	25	3,9031
3	6000	28	3,7782
4	5000	29	3,6989
5	4000	31	3,6021
6	3000	34	3,4771
7	2500	37	3,3979
8	2000	39	3,301
9	1500	44	3,1761
10	1000	50	3,0000
11	750	54	2,8751
12	500	59	2,6989
13	250	65	2,3979
14	<b>Isolat W-1B</b>	45	<b>(x, ?)</b>
15.	<b>Isolat P-6G</b>	44	<b>(x, ?)</b>
16	<b>Isolat P-7H</b>	44	<b>(x, ?)</b>

Contoh Perhitungan Berat Molekul:

Amplikon DNA isolat W-1B, jarak migrasi 45 mm

$$y = -0.0356 x + 4.7507$$

$$y = -0.0356 (45) + 4.7507$$

$$y = 3.1487$$

$$\text{Log pasangan basa} = 3.1487$$

$$\text{BM} = \text{antilog } 3.1487 = 1408$$

Jadi berat molekul amplikon DNA W-iB adalah 1.408 Kb.

### 4.3 Identifikasi Spesies

DNA isolat W-1B, P-6G, dan P-7H yang telah berhasil di amplifikasi kemudian dilakukan sekuensing untuk menentukan urutan nukleotida pada molekul DNA. Adenine (A), Sitosin (C), Guanine (G), Timin (T) pada molekul DNA. Sekuensing dilakukan secara *bidirectional* (dua arah) untuk meminimalisasi kemungkinan kesalahan dalam proses sekuensing. Kedua data hasil sekuensing tersebut selanjutnya disejajarkan dengan menggunakan program BioEdit. Pensejajaran dilakukan dengan metode *pairwise Alignment allow end to slide* untuk memperoleh urutan gen 16S sebagai satu kesatuan yang utuh. Contoh hasil analisis program BioEdit dari data sekuensing W-1B tersaji pada Gambar 5.

```
CGTTTTTGTGGGTGAACGGGGGGGGGCCAAAAGCGGCGGCTTACACATGCA
GTTCGAGCGCCCCGAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGAAC
GTACCATTGCTACGGAATAACTCAGGAACTTGTGCTAATACCGTATGAGC
CCGAAAGGGGAAAGATTTATCGGCAAATGATCGGCCCGCGTTGGATTAGCTA
GTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGG
ATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTG
AGTGATGAAGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGAC
GGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATA
CGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGATTTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCG
GGCTAATAAGTCAGGGGTGAAATCCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTTG
ATACTGTTAGTCTTGAGTATGGTAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGT
GAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGAC
CATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTTGGGGAGTTACTCTT
CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCGCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAG
ATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCAGTCCGCG
GTTAGTGGAGACACTATCCTTCAGTTCGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCAT
GGCTGTCGTAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGC
AACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTGAGTGGGCACTTAAGGGGACTGCCG
GTGATAAGCCCAGAGGAAGGGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTAC
GGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGCACC
CAAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCTTCTCAGTTCGGATTGCATCTTGCAAC
TCCGGTGCATGAAGTTGGAATCCCTAGTAATCCCGGATCAGCATGCCGCGGG
GAAAACCTTCCCAGGCTTGTACCCACCGCCCTTACACCAGGGGAGTTGGTT
TTCCCAAAGGCGCTGTGCTTACCCAGGGGGGGCACCCGGGGGTCCCCAC
GGGGACCTACCAGGAGCTAGGAA
```

Gambar 5. Hasil pensejajaran dengan program BioEdit dari gen 16S isolat W-1B

Karakterisasi basa nukleotida dari aktinomisetes W-1B adalah sebagai berikut:

*Length* = 1360 base pairs

*Molecular Weight* = 412518.00 Daltons, *single stranded*

*Molecular Weight* = 828021.00 Daltons, *double stranded*

*G+C content* = 55.37%

*A+T content* = 44.63%

<i>Nucleotide</i>	<i>Number</i>	<i>Mol%</i>
A	331	24,34
C	322	23,68
G	431	31,69
T	276	20,29

Sekuens gen 16S yang diperoleh dari pensejajaran menggunakan program BioEdit selanjutnya dianalisis menggunakan BLAST *nucleotide* pada laman NCBI. BLAST merupakan program bioinformatika pada situs NCBI menggunakan analisis statistik untuk menganalisis tingkat homologi antar sekuen. Tujuan penggunaan BLAST *nucleotide* adalah untuk membandingkan nukleotida sampel dengan sekuens nukleotida yang telah tersimpan di basis data GenBank. Sebagai *output* dari BLAST adalah urutan sekuens berdasarkan prioritas. Sekuens yang paling homolog akan ditaruh di bagian atas, dan yang paling tidak homolog ditaruh di paling bawah.

Informasi dari hasil penelusuran BLAST berupa *Score*, *Query Coverage*, *E-value* dan *Maximum identity*. Pengertian dari istilah-istilah yang diperoleh dari penelusuran BLAST adalah sebagai berikut.

- *Score* adalah jumlah keselarasan semua segmen dari urutan database yang cocok dengan urutan nukleotida. Nilai skor menunjukkan keakuratan nilai penjajaran sekuens berupa nukleotida yang tidak diketahui dengan sekuens nukleotida yang terdapat di dalam *genbank*. Semakin tinggi nilai skor yang diperoleh maka semakin tinggi tingkat homologi kedua sekuens.

- *Query coverage* adalah persentasi dari panjang nukleotida yang selaras dengan database yang terdapat pada BLAST.
- Nilai *E-value* merupakan nilai dugaan yang memberikan ukuran statistik yang signifikan terhadap kedua sekuen. Nilai *E-value* yang semakin tinggi menunjukkan tingkat homologi antar sekuens semakin rendah, sebaliknya nilai *E-value* yang semakin rendah menunjukkan tingkat homologi antar sekuens semakin tinggi. Nilai *E-value* bernilai 0 (nol) menunjukkan bahwa kedua sekuens tersebut identik.
- *Max identity* adalah nilai tertinggi dari persentase identitas atau kecocokan antara sekuen *query* dengan sekuen database yang tersejajarkan.
- Homologi sekuen dengan nilai  $\geq 99\%$  menunjukkan bahwa spesies yang dibandingkan merupakan spesies yang sama, sedangkan homologi  $\geq 97\%$  dapat dinyatakan bahwa isolat yang dibandingkan berada pada genus yang sama dan homologi antara 89-93% menunjukkan famili yang berbeda.

Hasil pensejajaran menggunakan BLAST menunjukkan bahwa aktinomisetes P-7H paling homolog dengan *Brevibacterium* sp. 0122 dengan nilai max score 2494, total score 2494, query cover 100%, E-value 0,0, dan maximum identity 98,99%. E-value bernilai 0 menunjukkan bahwa isolat identik dengan spesies pembandingnya (Tabel 13). Nilai maximum identity  $\geq 97\%$  mengindikasikan bahwa isolat aktinomisetes P-7H berada pada genus *Brevibacterium* yang sama namun pada spesies yang berbeda. Rincian hasil BLAST *nucleotide* dari gen 16S isolat W-1B, P-6G, dan P-7H tersaji pada Tabel 13.

Tabel 13. Hasil pensejajaran spesies W-1B, P-6B, dan P-7H dengan BLAST

Kode	Nama Isolat	Max Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Number
W-1B	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i> strain F85 16S	2025	90%	0,0	94.79%	MF682050.1
P-6G	<i>Rhodococcus qingshengii</i> strain BJC15-A38	2287	94%	0,0	98.72%	JX401475.1
P-7H	<i>Brevibacterium</i> sp. 0122	2494	100%	0,0	98.99%	EU442367.1

Taksonomi isolat P-7H dapat dirujuk melalui *Accession number* EU442367.1 dari mikroba pembanding, yaitu *Brevibacterium* sp. 0122. Berdasarkan referensi, maka taksonomi isolat P-7H adalah:

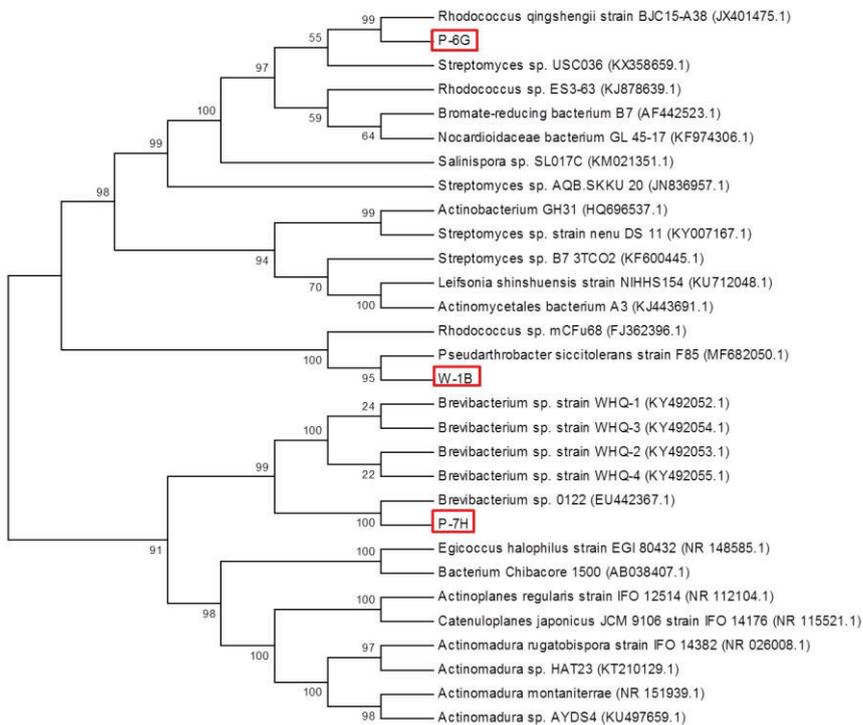
Domain : Bacteria  
 Phylum : Actinobacteria  
 Class : Aktinomisetes  
 Ordo : Micrococcales  
 Familia : Brevibacteriaceae  
 Genus : Brevibacterium  
 Spesies : *Brevibacterium* sp.0122

Menurut Hagstrom, et al. (2000), isolat yang memiliki tingkat homologi sekuen  $\geq 97\%$  menunjukkan spesies yang identik. Homologi sekuen 93-97% memiliki identitas yang sama pada tingkat genus, sedangkan berbeda pada tingkat spesies dan homologi sekuen 82-93% menunjukkan *novelty* pada tingkat genus. Pada umumnya jika derajat kesamaan urutan basa gen penyandi 16S rRNA kurang dari 97% dapat dianggap sebagai spesies baru. Berdasarkan hasil analisis BLAST dapat disimpulkan bahwa isolat W-1B, P-6B, dan P-7H memiliki persamaan pada tingkat genus mikroba pembanding namun berbeda pada tingkat spesiesnya.

#### 4.4 Konstruksi Pohon Filogenetik

Analisis hubungan kekerabatan antar spesies dapat dilakukan dengan tiga tahap yaitu pensejajaran sekuen, rekonstruksi pohon filogenetik, dan evaluasi pohon filogenetik secara statistik. Pohon filogenetik direkonstruksi dengan metode *Neighbour-joining* dan evaluasi pohon filogenetik menggunakan metode *bootstrap* sebanyak 1000 kali ulangan (Gambar 6).

Spesies yang berada dalam satu cabang menunjukkan kekerabatan yang dekat. Hal tersebut didukung dengan nilai *bootstrap* yang tinggi. Semakin tinggi nilai *bootstrap* maka pengelompokkan dalam pohon filogenetik tersebut memiliki tingkat kepercayaan yang tinggi pula. Jika proporsi *bootstrap*  $\geq 70\%$  maka cabang yang terbentuk dalam pohon filogenetik memiliki tingkat kestabilan yang tinggi. Berdasarkan analisis filogenetik isolat W-1B teridentifikasi sebagai anggota genus *Pseudarthrobacter*, P-6G merupakan anggota genus *Rhodococcus*, dan P-7H merupakan anggota genus *Brevibacterium*. Untuk mengetahui spesies dari ketiga isolat tersebut dapat menggunakan metode polifasik karena metode tersebut memadukan antara karakterisasi fenotip, genotip, dan analisis filogenetik.



Gambar 6. Pohon Filogenetik dari isolat W-1B, P-6G, dan P-7H

## **BAB V. KESIMPULAN**

Berdasarkan kajian tentang Eksplorasi Aktinomisetes di Kawasan mangrove Segara Anakan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Metode perlakuan awal sampel sumber isolat dengan fenol, *dry heating*, dan *oil separation* perlu dilakukan, dan penggunaan medium isolasi *starch-casein nitrat* (SCN) agar yang disuplementasi dengan 25 µg *nystatin* cukup efektif dalam isolasi Aktinomisetes dari Kawasan Mangrove Segara Anakan.
2. Identitas isolat bakteri anggota Aktinomisetes dari Kawasan mangrove Segara Anakan dapat diketahui melalui karakterisasi fenetik (morfologi koloni, miselium dan spora, biokimia) dan karakterisasi filogenetik berdasarkan sekuens gen 16S rRNA.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, R. A., Ryandini, D., & Kusharyati, D. F. (2017). Potensi aktinomisetes asal tanah perakaran mangrove Segara Anakan Cilacap sebagai penghasil antifungi terhadap yeast patogen *Candida albicans*. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 2(2), 39–44. <https://doi.org/10.22146/jtbb.26554>
- Ardli, E. R., & Wolff, M. (2008). Land use and land cover change affecting habitat distribution in the Segara Anakan lagoon, Java, Indonesia. *Regional Environmental Change*, 9(4), 235–243. <https://doi.org/10.1007/s10113-008-0072-6>
- Asnani, A., Luviriani, E., & Oedjijono. (2020). Activity of Actinomycetes isolated from Mangrove Segara Anakan Cilacap toward Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 23(1), 1-7. <https://doi.org/10.14710/jksa.23.1.1-7>
- Asnani, A., Ryandini, D., & Suwandri. (2016). Screening of marine actinomycetes from Segara Anakan for natural pigment and hydrolytic activities. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 107). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/107/1/012056>
- Asnani, A., & Ryandini, D. (2011). Screening of marine actinomycetes from Segara Anakan Indonesia for antimicrobial activity. In *Proceedings of the International Conference on Natural Sciences (ICONS)* (p. 64). Shaker Verlag GmbH, Germany.
- Asnani, Ari, Ryandini, D., & Suwandri. (2014). Analisis potensi amilolitik dan selulolitik dari isolat aktinomisetes laut. In *Prosiding Seminar Nasional Percepatan Desa Berdikari Melalui Pemberdayaan Masyarakat dan Inovasi Teknologi*. <https://doi.org/ISBN:978-602-1643-13>
- Augustine, D., Jacob, J. C., Ramya, K., & Philip, R. (2013). Actinobacteria from sediment samples of Arabian Sea and Bay of Bengal: biochemical and physiological characterization. *Int. J. Res. Mar. Sci*, 2, 56–63.

- Devi, N. K. A., Jeyarani, M., & Balakrishnan, K. (2006). Isolation and identification of marine actinomycetes and their potential in antimicrobial activity. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(3), 470–472. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2006.470.472>
- Dinda, A.P., Asnani, A., & Anjarwati, D.U. (2020). The activities of Streptomyces W-5A as antibacterial and antibiofilm towards Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 2983. In *Proceeding of the 1<sup>st</sup> Jenderal Soedirman International Medical Conference in conjunction with the 5<sup>th</sup> Annual Meeting (Temilnas) Consortium of Biochemical Science Indonesia (JIMC 2020)*, pages 109-115. <https://www.scitepress.org/Papers/2020/104886/104886.pdf>
- Genilloud, O. (2017). Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Natural Product Reports*, 34(10), 1203–1232. <https://doi.org/10.1039/C7NP00026J>
- Herlina, Asnani, A., & Diastuti, H. (2017). The application of red pigments from Streptomyces K-4B and Dayak Onions (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.) in colouring glycerine soap. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 172(1), 012023. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/172/1/012023>
- Hilmi, E., Siregar, A. S., & Febryanni, L. (2015). Struktur komunitas, zonasi dan keanekaragaman hayati vegetasi mangrove di Segara Anakan Cilacap. *Omni-Akuatika*, 11(2), 20–35. <https://doi.org/10.20884/1.oa.2015.11.2.36>
- Istianto, Y., Koesoemowidodo, R. S. A., Watanabe, Y., Pranamuda, H., & Marwoto, B. (2012). Application of phenol pretreatment for the isolation of rare actinomycetes from Indonesian soil. *Microbiology Indonesia*, 6(1), 42–47. <https://doi.org/10.5454/mi.6.1.7>
- Kannan, R. R., Iniyar, A. M., & Prakash, V. S. G. (2011). Isolation of a small molecule with anti-MRSA activity from a mangrove symbiont Streptomyces sp. PVRK-1 and its biomedical studies in Zebrafish embryos. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(5), 341. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60077-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60077-4)
- Khan, S. T., Komaki, H., Motohashi, K., Kozone, I., Mukai, A., Takagi, M., & Shin-ya, K. (2011). Streptomyces associated with a marine sponge *Haliclona* sp.; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. *Environmental Microbiology*, 13(2), 391–403. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02337.x>
- Khucharoenphaisan, K., Sriparoj, N., & Sinma, K. (2012). Isolation and identification of actinomycetes from termite's gut against human

- pathogen. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(21), 68–73. <https://doi.org/10.3923/ajava.2012.68.73>
- Larasati, A., Ryandini, D., Oedjijono, & Kusharyati, D.F. (2019). Optimization of medium and incubation time in the production of antibacterial compounds by *Streptomyces* sp. SA404. *Advances in Biological Sciences Research* Vol. 15, 37-43. <https://dx.doi.org/10.2991/absr.k.210810.008>
- Luviriani, E. (2017). *Aktinomisetes lingkungan payau penghasil senyawa antibakteri yang antagonis terhadap Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Thesis (Unpublished). Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.
- Mangamuri, U. K., Muvva, V., Poda, S., & Kamma, S. (2012). Isolation, identification and molecular characterization of rare actinomycetes from mangrove ecosystem of Nizampatnam. *Mal J Microbiol*, 8(2), 83–91.
- Naorungrote, S., Chunglok, W., Lertcanawanichakul, M., & Bangrak, P. (2011). Actinomycetes producing anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from soil samples in Nakhon Si Thammarat. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 8(2), 131–138.
- Parte, A. (2012). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. (M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. E. Trujillo, K. Suzuki, W. Ludwig, & W. B. Whitman, Eds.). New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4>
- Purwanto, A. D., & Asriningrum, W. (2019). Identification of mangrove forests using multispectral satellite imageries. *International Journal of Remote Sensing and Earth Sciences (IJReSES)*, 16(1), 63. <https://doi.org/10.30536/j.ijreses.2019.v16.a3097>
- Ryandini, D., Radjasa, O.K., & Oedjijono. (2018). Isolate Actinomycetes SA32 origin of Segara Anakan mangrove rhizosphere and its capability in inhibiting multi-drugs resistant bacteria growth. *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 10(1), 1-7. <https://www.walshmedicalmedia.com/open-access/isolate-actinomycetes-sa32-origin-of-segara-anakan-mangroverhizosphere-and-its-capability-in-inhibiting-multidrug-resistant-bacte-1948-5948-1000386.pdf>
- Ryandini, D., Radjasa, O.K., & Oedjijono. (2021). Bioactive compounds derived from *Streptomyces* sp. SA32: antibacterial activity, chemical profile, and their related genes. In *IOP Conf. Series:*

*Earth and Environmental Science* 948 (2021) 012062.  
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/948/1/012062/pdf>

- Saraswathi, K., Sabitha Rani, A. M., Sindhu, S., & Arumugam, P. (2015). Isolation, characterization of bioinspired secondary metabolites producing actinomycetes from marine soil samples. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 4, 107–119.
- Sathish, K. S. R., & Kokati, V. B. R. (2012). In-vitro antimicrobial activity of marine actinobacteria against multidrug resistance *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(10), 787–792. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60230-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60230-5)
- Sharma, D., Kaur, T., Chadha, B., & Manhas, R. (2011). Antimicrobial activity of actinomycetes against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and various other pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(6), 801–808. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v10i6.14>
- Soliev, A. B., Hosokawa, K., & Enomoto, K. (2011). Bioactive pigments from marine bacteria: Applications and physiological roles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2011/670349>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tyagi, J., Bhatnagar, T., & Pandey, F. K. (2014). Isolation and characterization of actinomycetes from soil and screening their antibacterial activities against different microbial isolates. *International Journal of Life Sciences Research*, 2(4), 101–105.
- Usha, R., Ananthaselvi, P., Venil, C. K., & Palaniswamy, M. (2010). Antimicrobial and antiangiogenesis activity of *Streptomyces parvulus* KUAP106 from mangrove soil. *Eur J Biol Sci*, 2(4), 77–83.
- Wardana, R.S., Ryandini, D., & Oedjijono. (2017). Antibacterial capacity *Streptomyces* isolate from a mangrove plant rhizosphere *Avicennia marina*. *Scripta Biologica* 4(2), 131-134. <https://journal.bio.unsoed.ac.id/index.php/scribio/article/view/433/pdf>.

## LAMPIRAN

### A. Komposisi dan Pembuatan Media

#### 1. Medium *Starch Casein* Nitrat agar

Bahan	
<i>Starch</i>	10 g
Kasein	1 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01g
Agar	20 g
Akuades	hingga 1.000 mL
pH	6,8 ± 0,2

#### 2. Medium *Starch Casein* Nitrat cair

Bahan	
<i>Starch</i>	10 g
Kasein	1 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01g
Akuades	hingga 1.000 mL
pH	6,8 ± 0,2

#### 3. Medium Oksidatif-Fermentatif (OF) *Hugh Leifson* medium

Bahan	
Pepton	2 g
NaCl	5 g
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g
Glukosa (Dekstrose)	10 g
<i>Bromothymol blue</i>	0,03 g
Agar	3 g
Akuades	hingga 1.000 mL
pH	6,8 ± 0,2 pada suhu 25°C

#### 4. Medium Indole

Bahan	
<i>Tryptone broth</i>	1 g
<i>Beef extract</i>	0,3 g
Akuades	hingga 100 mL

5. Medium MR - VP

Bahan	
Pepton	0,5 g
Glukosa	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
Akuades	hingga 100 mL
pH	6,8 ± 0,2

6. Medium Simmons Sitrat agar

Bahan	
NaCl	5 g
<i>Sodium citrate dihydrate</i>	2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
<i>Bromothymol blue</i>	0,08 g
Agar	15 g
Akuades	hingga 1.000 mL
pH	6,9 ± 0,2 pada 25°C

7. Medium Uji Nutrisional

Bahan	
KNO <sub>3</sub>	0,75 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 mg
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
Sumber gula	10 g
Akuades	hingga 1.000 mL

## 8. Medium Uji Produksi Asam

Bahan	
KNO <sub>3</sub>	0,75 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 mg
CaCl <sub>2</sub>	0,02 g
Sumber gula	10 g
Akuades	hingga 1.000 mL
<i>Phenol red</i>	Secukupnya sampai berwarna merah

### **Pembuatan medium:**

Semua bahan dilarutkan dalam akuades sampai volume 1000 mL. Larutan dididihkan dan terus diaduk hingga homogen. Kemudian pH medium diatur, apabila terlalu asam ditambahkan NaOH dan apabila terlalu basa ditambahkan HCl. Setelah itu medium disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121 °C bertekanan 2 atm selama 15 menit.

### **Pembuatan medium uji nutrisi dan uji produksi asam:**

Mineral dilarutkan dengan 90% akuades. Tabung Durham dan mineral yang sudah larut dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan volume 4 mL per tabung. 10% akuades sisa dimasukkan dalam botol dan disterilisasi. Untuk sumber gula, gula dilarutkan kedalam 10% akuades steril lalu di filtrasi menggunakan *millipore syringe filters* 0.22 um. Untuk medium uji produksi asam, 10% akuades sisa ditambahkan indikator *phenol red* sampai berwarna merah dan disterilisasi. Untuk sumber gula, gula dilarutkan kedalam 10% akuades yang mengandung *phenol red* yang sudah steril lalu di filtrasi. Jika akan digunakan, 1 mL sumber gula yang sudah steril ditambahkan ke medium mineral steril sehingga volume akhir 5 mL.

## B. Komposisi dan Pembuatan Reagen

- Reagen Lugol's iodine. Sebanyak 10 gram kalium iodida (KI) dilarutkan dalam 80 mL akuades dan diaduk sampai larut. Selanjutnya larutan ditambahkan 5 g iodium (I<sub>2</sub>), diaduk sampai sampai rata, lalu diencerkan sampai 100 mL. Larutan disimpan dalam botol plastik yang berwarna gelap, ditutup dengan tutup kedap dan tutup putar serta dijauhkan dari sinar matahari.
- Reagen Oksidase. Senyawa *Tetramethyl P-Phenylenediamine Dihydrochloride* dilarutkan dengan akuades untuk memperoleh konsentrasi 1%.
- Reagen Katalase. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dilarutkan dengan akuades untuk memperoleh konsentrasi 3%.
- Reagen *Methyl red*. Sebanyak 0,1 g *methyl red* dilarutkan dalam 300 mL alkohol 96%, lalu ditambahkan 200 mL akuades.
- Reagen *α-naftol*. Sebanyak 5 g *α-naftol* dilarutkan dalam 100 mL alkohol 96%.

## C. Buffer TE pH 8 1 L

1. Tris-Cl 1 M pH 7,5: Sebanyak 60,57 gram *Tris (hydroxymethyl) aminomethane* (BM 121,4 g/mol) dilarutkan dalam 500 mL akuades. pH larutan disesuaikan menjadi pH 7,5 dengan menambahkan HCl sedikit demi sedikit.
2. EDTA 0.5 M pH 8,0: Sebanyak 18,6 gram *Diaminoethane tetraacetic acid* (EDTA) dilarutkan dalam 100 mL ddH<sub>2</sub>O kemudian ditambahkan NaOH sedikit demi sedikit, diaduk hingga EDTA larut ketika pH mencapai 8.
3. Buffer TE dibuat dengan cara mencampur 10 mL stok 1 M Tris-Cl pH 7,5 dan 2 mL stok 0,5 M EDTA pH 8.0 lalu diencerkan hingga volume mencapai 1 L.

## TENTANG PENULIS



**Ari Asnani**, lahir di Jakarta pada tanggal 22 Maret 1969. Memperoleh gelar Sarjana Kimia dari Universitas Indonesia pada tahun 1993; Gelar Master of Science in Biochemistry dari University of Philippines at Los Banos (UPLB) Philippina tahun 1998; dan Gelar Ph.D dalam bidang Chemistry & Biochemistry dari University of Guelph Canada tahun 2007. Ari Asnani merupakan pegawai negeri yang bekerja sebagai dosen Kimia/Biokimia sejak tahun 1995 di Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Jenderal Soedirman. Penelitian isolasi, identifikasi, serta penapisan potensi aktinomisetes telah ditekuni Ari Asnani sejak tahun 2010 melalui perolehan hibah penelitian baik di tingkat universitas maupun tingkat nasional.



**Oedjijono**, lahir di Cilacap pada tanggal 17 Juni 1959. Oedjijono memperoleh gelar Sarjana Biologi dari Universitas Jenderal Soedirman tahun 1984; Gelar Master of Science dari Department Agriculture Science University of Tasmania tahun 1992 ; dan Gelar Doktor dalam bidang Biologi dari Universitas Gadjah Mada tahun 2015. Oedjijono merupakan pegawai negeri yang bekerja sebagai dosen Biologi sejak tahun 1986 di Jurusan Biologi, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman. Fokus penelitian Oedjijono mencakup mikrobiologi tanah, biokontrol, dan bioremediasi.



UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN  
Gd. UNSOED Press  
Jalan Prof. Dr. H.R. Boenyamin 708 Purwokerto  
Kode Pos 53122 Kotak Pos 115  
Telepon (0281) 626070  
Email: [unsoedpress@unsoed.ac.id](mailto:unsoedpress@unsoed.ac.id)

ISBN 978-623-7144-57-1



9 786237 144571