

Karakterisasi dan Pengaruh Senyawa Antibakteri *Streptomyces* spp. dalam Menghambat Pertumbuhan *Vibrio cholerae*

Ajeng Putri Retno Andani, Oedjijono*, Dini Ryandini

Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Jl. dr. Suparno 63 Purwokerto 53122

*Correspondent email : oedjijono@unsoed.ac.id

Rekam Jejak Artikel:

Diterima : 15/08/2022

Disetujui : 02/12/2023

Abstract

Streptomyces is a microorganism that is often used in making various types of antibiotics which have the ability to inhibit the growth of several types of bacteria. This study aimed to determine the ability of *Streptomyces* spp. isolated from mangrove sediments in inhibiting the growth of *Vibrio cholerae*, to know the inhibitory activity of antibacterial compounds produced by *Streptomyces* spp. against *V. cholerae*, and to know the characteristics of antibacterial compounds produced by *Streptomyces* spp. The research stages included the screening of *Streptomyces* spp. isolates (SA34, SA37, SA40, SAE4034) against *V. cholerae*, production of antibacterial compounds, test of antibacterial inhibitory activity using Kirby Bauer method, determination of MIC value (%), separation of antibacterial compounds by TLC and phytochemical methods, bioautography test, treatment of varies temperature (40°C, 60°C, 80°C, 100°C) and pH (2, 4, 6, 9) over antibacterial compound activity, and confirmation tests of bacterial characteristics. Data were analyzed descriptively. The screening result showed that the highest inhibition toward the growth of *V. cholerae* was shown by *Streptomyces* sp. SAE4034. The crude extract was able to inhibit *V. cholerae* with an inhibitory zone diameter of 11.5-17.5 mm, MIC value of 30%, and produced compounds with R_f values ranging from 0.31-0.70. Antibacterial compound of *Streptomyces* sp. SAE4034 which was able to inhibit the growth of *V. cholerae* bacteria had a R_f value of 0.43 and the compound belonged to the alkaloid group. A treatment using temperature 40°C still produced high inhibition with an inhibition zone of 14 mm and its inhibitory activity decreased with higher temperature treatment up to 100°C. Likewise with the pH treatment, the highest inhibitory activity was obtained at pH 6 with an inhibition zone of 16 mm, while at pH 2, 4, and 9 the antibacterial activity of the extract decreased

Key Words: antibacterial, pH, *Streptomyces*, temperature, *V. cholerae*.

Abstrak

Streptomyces merupakan mikroorganisme yang sering dimanfaatkan dalam pembuatan berbagai jenis antibiotik yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan beberapa jenis bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan *Streptomyces* spp. yang diisolasi dari sedimen mangrove dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae*, mengetahui kekuatan senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh *Streptomyces* spp. terhadap *V. cholerae*, dan mengetahui karakteristik dari senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh *Streptomyces* spp. Tahap penelitian meliputi penapisan isolat bakteri *Streptomyces* spp. (SA34, SA37, SA40, SAE4034) yang menghambat *V. cholerae*, produksi senyawa antibakteri, uji aktivitas antibakteri dengan metode Kirby Bauer, penentuan nilai MIC (%), pemisahan senyawa antibakteri dengan metode TLC, uji fitokimia, uji bioautografi, uji aktivitas senyawa antibakteri pada variasi suhu (40°C, 60°C, 80°C, 100°C) dan pH (2, 4, 6, 9), serta uji konfirmasi karakter bakteri. Data dianalisis secara deskriptif. Hasil penapisan menunjukkan bahwa penghambatan terhadap pertumbuhan *V. cholerae* tertinggi ditunjukkan oleh isolat SAE4034. Ekstrak kasar mampu menghambat *V. cholerae* dengan diameter zona hambat 11,5-17,5 mm; nilai MIC 30%, dan menghasilkan senyawa bioaktif dengan nilai R_f berkisar antara 0,31-0,70. Senyawa yang mampu menghambat memiliki nilai R_f 0,43 dan senyawa tersebut termasuk golongan alkaloid. Perlakuan suhu 40°C tetap tinggi dengan zona hambat 14 mm dan aktivitas penghambatannya menurun sejalan dengan perlakuan suhu yang lebih tinggi sampai 100°C. Perlakuan pH 6 menunjukkan aktivitas penghambatan tertinggi dengan zona hambat 16 mm, sebaliknya pada pH 2, 4, dan 9 aktivitas antibakteri ekstrak kasar menurun.

Kata kunci: antibakteri, pH, *Streptomyces*, suhu, *V. cholerae*

PENDAHULUAN

Streptomyces adalah mikroba yang banyak digunakan untuk memproduksi berbagai antibiotik. Lebih dari 22.000 senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroba, sekitar 70% di antaranya

diproduksi oleh aktinomisetes, 20% oleh fungi, 7% *Bacillus* spp. dan 1-2% oleh bakteri lainnya. Kelompok *Streptomyces* merupakan kelompok yang penting karena lebih dari 10.000 antibiotik yang telah ditemukan saat ini, 50-55% diproduksi oleh marga

tersebut (Subramani & Aalbersberg, 2012). Salah satu lingkungan non-terrestrial sebagai sasaran eksplorasi aktinomisetes adalah ekosistem hutan bakau, seperti kawasan mangrove Segara Anakan Cilacap, Jawa Tengah (Akbar *et al.*, 2017). Isolat *Streptomyces* spp. yang telah diisolasi dari tanah rizosfer mangrove Segara Anakan terbukti mampu menghambat pertumbuhan beberapa bakteri dan fungi patogen namun belum diketahui kemampuan penghambatannya terhadap *Vibrio cholerae*.

Vibrio cholerae adalah bakteri patogen Gram negatif, halofilik yang berbentuk batang melengkung, bersifat aerob, motil, serta mempunyai satu flagel di kutub. *V. cholerae* memiliki habitat di perairan seperti pantai dan muara yang hangat. *V. cholerae* biasanya mencemari makanan yang bersumber dari laut seperti kerang. *Vibrio* menyebabkan penyakit kolera pada manusia (Pruzzo *et al.*, 2005). Bakteri tersebut akan mengeluarkan enterotoksin di dalam saluran pencernaan manusia, sehingga menyebabkan diare dan muntah. Hal ini akan menyebabkan kehilangan banyak cairan tubuh sehingga mengalami dehidrasi (Nomer *et al.*, 2019).

Pengujian kemampuan isolat *Streptomyces* spp. dalam menghambat pertumbuhan *V. cholerae* dilakukan dengan menguji aktivitas daya hambat antibakteri dengan metode *Kirby Bauer* dan penentuan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Metode *Kirby Bauer* adalah metode uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan kertas cakram yang telah ditambahkan dengan zat uji ke media berisi mikroba yang akan diperiksa. Penentuan nilai MIC adalah metode untuk mengetahui konsentrasi minimum senyawa antibakteri dalam menghambat pertumbuhan mikroba lain. Karakterisasi senyawa antibakteri dilakukan dengan pemisahan senyawa antibakteri dilakukan dengan metode *Thin Layer Chromatography* (TLC), uji fitokimia dan uji bioautografi. TLC adalah metode pemisahan komponen dalam suatu senyawa berdasarkan fase diam dan fase gerak. Deteksi senyawa dalam suatu ekstrak dapat menggunakan kombinasi antara metode TLC dengan metode fitokimia. Hasil uji TLC digunakan untuk mengetahui golongan senyawa yang bersifat menghambat bakteri uji dengan metode bioautografi (Wall, 2007).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui kemampuan isolat *Streptomyces* spp. dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. cholerae*, mengetahui kekuatan senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh isolat *Streptomyces* spp. terhadap pertumbuhan bakteri *V. cholerae* dan mengetahui karakteristik senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh isolat *Streptomyces* spp. asal sedimen mangrove. Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi tentang potensi isolat *Streptomyces* spp. asal sedimen mangrove dalam menghasilkan senyawa antibakteri dan kemampuan penghambatannya terhadap *V. cholerae*.

MATERI DAN METODE

Penelitian menggunakan isolat *Streptomyces* spp. (SA34, SA37, SA40, SAE4034) dan *V. cholerae* koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi. Penelitian karakterisasi senyawa yang dihasilkan oleh bakteri tersebut dan aktivitas penghambatannya terhadap *V. cholerae* dilakukan dengan metode survei. Tahapan penelitian meliputi penapisan isolat *Streptomyces* spp. yang menghambat *V. cholerae*, pengujian kekuatan senyawa antibakteri *Streptomyces* spp. dengan metode *Kirby Bauer* dan penentuan nilai *Minimum Inhibition Concentration* (MIC) serta karakterisasi senyawa antibakteri *Streptomyces* spp. dengan metode *Thin Layer Chromatography* (TLC) dan fitokimia, uji bioautografi, uji aktivitas senyawa antibakteri pada variasi suhu dan pH.

Preparasi penelitian

Preparasi penelitian meliputi sterilisasi alat dan medium serta rekultur isolat *Streptomyces* spp. dan *V. cholerae*. dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm selama 15 menit (Atlas *et al.*, 2010). Rekultur isolat *Streptomyces* spp. dilakukan dengan metode gores kontinyu pada medium *Starch Casein Nitrate Agar* (SCNA), diinkubasi pada suhu ruang selama 5 hari. Rekultur isolat *V. cholerae* dengan metode gores kontinyu pada medium *Nutrient Agar* miring, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam.

Penapisan kemampuan isolat *Streptomyces* spp. dalam menghambat pertumbuhan *Vibrio cholerae*

Penapisan dilakukan dengan metode gores silang. Sebanyak 1 ose masing-masing isolat *Streptomyces* spp. digoreskan pada bagian tengah permukaan medium NA, kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang hingga terjadi sporulasi. Sebanyak 1 ose isolat *V. cholerae* digoreskan dengan jarak 5 mm secara tegak lurus terhadap goresan isolat *Streptomyces* spp. Biakan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Aktivitas antibakteri diamati secara kualitatif dengan cara melihat jarak penghambatan pertumbuhan *V. cholerae* terhadap koloni bakteri aktinomisetes. Isolat aktinomisetes yang menunjukkan aktivitas penghambatan tertinggi selanjutnya dipilih untuk uji produksi senyawa antibakterinya (Kang *et al.*, 2010).

Produksi senyawa antibakteri isolat *Streptomyces* sp. terpilih (Ryandini *et al.*, 2018)

Isolat *Streptomyces* sp. terpilih ditumbuhkan pada medium SCNA, diinkubasi selama 7 hari. Sebanyak 20 plug inokulum yang telah dilubangi dengan *cork borer* diinokulasi ke dalam 200 mL medium *Starch Casein Nitrate Broth* (SCNB). Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 21 hari. Setelah masa inkubasi, kultur disaring menggunakan kertas saring Whatman untuk memisahkan miselium dan filtrat. Miselium dikeringkan dan diukur berat keringnya menggunakan timbangan analitik.

Filtrat yang diperoleh diekstraksi menggunakan pelarut etil-asetat dengan perbandingan antara filtrat dan pelarut 1:1 (v/v) dan dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali. Lapisan bagian atas yang mengandung senyawa antibakteri diuapkan menggunakan alat *rotatory evaporator* pada suhu 70°C selama 2 jam hingga didapatkan ekstrak kasar. Ekstrak kasar kemudian diukur persentasenya dengan menggunakan rumus:

$$\text{Hasil (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat kering}} \times 100\%$$

Uji aktivitas daya hambat ekstrak kasar senyawa antibakteri terhadap *Vibrio cholerae* (Ryandini *et al.*, 2018)

Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode *Kirby Bauer*. Sebanyak 0,1 mL isolat *V. cholerae* diinokulasi ke dalam 10 mL medium Nutrient Broth (NB) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sebanyak 0,1 mL kultur *V. cholerae* diinokulasikan ke dalam cawan petri yang berisi 20 mL medium MHA secara *spread plate*. Sebanyak 20 µL ekstrak kasar diteteskan ke kertas cakram berdiameter 6 mm untuk pengujian aktivitas penghambatan terhadap *V. cholerae*. Antibiotik tetrasiklin 100 µg/mL digunakan sebagai kontrol positif dan sebagai kontrol negatif adalah 20 µL DMSO 5%. Biakan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Zona hambat diamati, diukur diameternya dan dihitung rata-rata diameternya.

Penentuan nilai MIC ekstrak senyawa aktif *Streptomyces sp.*

Penentuan nilai MIC dilakukan dengan cara memasukkan sebanyak 0,8 mL medium NB ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,1 mL ekstrak *Streptomyces sp.* yang telah dilarutkan dalam DMSO 5% sebagai larutan pengencer dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%. Sebanyak 0,1 mL *V. cholerae* ditambahkan ke setiap tabung. Perlakuan untuk kontrol positif dilakukan dengan menambahkan sebanyak 0,1 mL kultur *V. cholerae* ke dalam medium NB, kemudian ditambahkan antibiotik tetrasiklin. Kontrol negatif dibuat dengan cara menambahkan sebanyak 0,1 mL kultur bakteri *V. cholerae* ke dalam medium NB. Semua tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Konsentrasi yang merupakan nilai MIC dari ekstrak senyawa aktif ditunjukkan oleh tabung yang tampak bening yang menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri.

Pemisahan Senyawa Antibakteri Ekstrak Kasar dengan Metode TLC (Ryandini *et al.*, 2018)

Sebanyak 10 µL ekstrak senyawa antibakteri diteteskan pada lempeng kromatografi (TLC *aluminium sheet silica gel 60 F254*) yang telah diberi penanda garis *start* dan garis *finish*. Lempeng direndam dalam larutan eluen berupa campuran kloroform, etil asetat, dan asam asetat dengan perbandingan 3:3:1. Lempeng dikeringkan di dalam

oven dengan suhu 80°C selama 2 jam. Lempeng kemudian diamati di dalam UV *cabinet* pada panjang gelombang 366 nm. Spot yang terbentuk diukur nilai R_f -nya dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$R_f \text{ value} = \frac{As}{Ao}$$

Keterangan:

As = Jarak tempuh sempel

Ao = Jarak yang ditempuh oleh pelarut

Analisis senyawa bioaktif ekstrak kasar *Streptomyces sp.* dengan metode fitokimia (Fajriaty *et al.*, 2018)

Identifikasi senyawa golongan poliketida dilakukan dengan mengamati spot pada sinar UV 254 nm yang tampak padam tetapi menampilkan warna tertentu pada panjang gelombang 366 nm. Identifikasi senyawa golongan alkaloid dengan penyemprotan lempeng menggunakan pereaksi *Dragendorff*, kemudian dipanaskan dalam oven suhu 100°C selama 5 menit. Adanya senyawa golongan alkaloid ditunjukkan oleh terbentuknya bercak kuning jingga atau orange. Identifikasi senyawa golongan terpenoid dengan penyemprotan lempeng menggunakan pereaksi vanilin asam sulfat, kemudian dipanaskan dalam oven suhu 100°C selama 10 menit. Adanya senyawa golongan terpenoid ditunjukkan oleh terbentuknya bercak ungu kehitaman. Identifikasi senyawa golongan flavonoid dengan penyemprotan lempeng menggunakan pereaksi sitroborat, kemudian dipanaskan dalam oven suhu 100°C selama 5 menit. Adanya senyawa golongan flavonoid ditunjukkan oleh terbentuknya spot berwarna kuning, hijau, atau ungu yang terlihat pada pengamatan di bawah sinar UV 366 nm.

Uji bioautografi ekstrak kasar *Streptomyces sp.* terhadap *Vibrio cholerae*

Uji bioautografi bertujuan untuk mendeteksi senyawa aktif yang memiliki aktivitas antibakteri. Sebanyak 1 mL kultur *Vibrio cholerae* dimasukkan ke dalam cawan petri kemudian ditambahkan 20 mL medium NA secara *pour plate*. Hasil campuran dihomogenisasi kemudian didiamkan hingga medium memadat. Plat TLC dengan spot senyawa diletakkan di atas medium NA yang telah padat dengan metode kontak langsung, dibiarkan selama 20 menit. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Adanya zona bening (zona hambat) pada medium NA menunjukkan bahwa senyawa dengan nilai R_f tertentu memiliki aktivitas antibakteri.

Uji aktivitas senyawa antibakteri yang diberi perlakuan variasi suhu dan pH (Thirumurugan & Vijayakumar, 2015)

Uji pengaruh suhu terhadap aktivitas antibakteri ekstrak *Streptomyces sp.* dilakukan dengan cara mencampurkan ekstrak kasar dengan larutan DMSO 5%. Larutan ekstrak selanjutnya diberi perlakuan dengan variasi suhu 40°C, 60°C, 80°C, atau 100°C selama 10 menit dalam *watherbath*, kemudian didinginkan selama 15 menit pada suhu ruang.

Aktivitas antibakteri diuji menggunakan metode Kirby Bauer dengan mengukur diameter zona hambat.

Uji pengaruh pH terhadap aktivitas antibakteri ekstrak *Streptomyces* sp. dilakukan dengan mencampurkan ekstrak kasar dalam larutan DMSO 5%. Larutan ekstrak selanjutnya diatur nilai pH 2, 4, 6 dan 9. Ekstrak disimpan dalam *waterbath* selama 10 menit pada suhu optimum, kemudian didinginkan selama 15 menit pada suhu ruang. Aktivitas antibakteri diuji menggunakan metode Kirby Bauer dengan mengukur diameter zona hambat.

Karakterisasi morfologi koloni

Karakterisasi morfologi meliputi pengamatan bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni, permukaan koloni, ukuran koloni, dan warna koloni.

Pengujian sifat Gram (Schaad *et al.*, 2001)

Uji Gram dengan KOH 3%, yaitu larutan KOH 3% ditetes di atas *object glass*, kemudian diambil biakan murni isolat *Streptomyces* sp. dan dicampurkan merata menggunakan jarum ose. Interpretasi kelompok bakteri Gram negatif ditandai dengan terbentuknya lendir saat jarum ose ditarik ke atas. Interpretasi kelompok bakteri Gram positif ditandai dengan tidak terbentuk lendir saat jarum ose ditarik ke atas.

Pengamatan morfologi hifa (Mukti *et al.*, 2018)

Sebanyak 1 ose isolat *Streptomyces* sp. dikultur pada medium SCNA, *cover glass* steril diletakkan di atas medium agar yang telah diinokulasi *Streptomyces* sp. Biakan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Bentuk hifa diamati dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 1000X meliputi tipe hifa aerial, hifa atau miselium substrat, dan tipe rantai spora.

Uji Oksidase (Ramadhaniah, 2013)

Sebanyak 1 ose isolat diulaskan di atas *object glass* yang sudah diberi kertas saring, kemudian ditetesi reagen *tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride*. Interpretasi positif jika terbentuk warna biru kehitaman dan interpretasi negatif jika tidak berubah warna.

Uji Katalase (Brown, 2007)

Sebanyak 1 ose isolat diulaskan diatas *object glass* kemudian ditetesi reagen H₂O₂. Interpretasi positif jika terbentuk gelembung gas dan interpretasi negatif jika tidak terbentuk gelembung gas.

Uji oksidatif fermentatif (Kismiyati *et al.*, 2009)

Isolat bakteri diinokulasikan secara tusukan (*stab inoculation*) menggunakan tusuk steril sedalam $\frac{3}{4}$ bagian dari medium ke dalam dua tabung medium OF. Salah satu tabung ditetesi dengan parafin steril, kemudian kultur diinkubasi selama 2 x 24 pada suhu ruang. Oksidatif positif diindikasikan dengan perubahan medium yang tidak ditambah parafin menjadi kuning, fermentatif positif diindikasikan dengan perubahan medium yang ditambahkan

parafin menjadi kuning, dan oksidatif-fermentatif jika kedua medium berwarna kuning.

Uji fermentasi karbohidrat (Kismiyati *et al.*, 2009)

Sebanyak 1 ose isolat diinokulasikan pada media basal yang ditambah dengan 5% gula (glukosa, laktosa, sukrosa, fruktosa, rafinosa, rannosa, inositol, manitol, arabinosa, atau xylosa) dan diberi indikator phenol red. Inkubasi selama 7 x 24 jam pada suhu ruang. Interpretasi positif ditandai perubahan warna medium menjadi kuning dan terbentuk gelembung gas.

Uji Nutrisional (Kismiyati *et al.*, 2009)

Sebanyak 1 ose isolat diinokulasikan pada medium basal yang ditambah dengan 5% gula glukosa, laktosa, fruktosa, sukrosa, maltosa, atau mannitol, kemudian diinkubasi selama 7 x 24 jam pada suhu ruang. Interpretasi positif ditandai perubahan kekeruhan medium.

Uji kebutuhan suhu dan pH pertumbuhan (Damayanti *et al.*, 2020)

Sebanyak 1 ose isolat diinokulasikan ke dalam medium NB dan diinkubasi pada suhu 40°C dan 60°C, selanjutnya diinkubasi selama 5 x 24 jam. Sebanyak 1 ose isolat diinokulasikan ke dalam medium NB dengan pH 6 dan 9, kemudian diinkubasi selama 5 x 24 jam pada suhu ruang. Interpretasi positif ditandai dengan tumbuhnya bakteri dengan meningkatnya kekeruhan medium.

HASIL DAN PEMBAHASAN

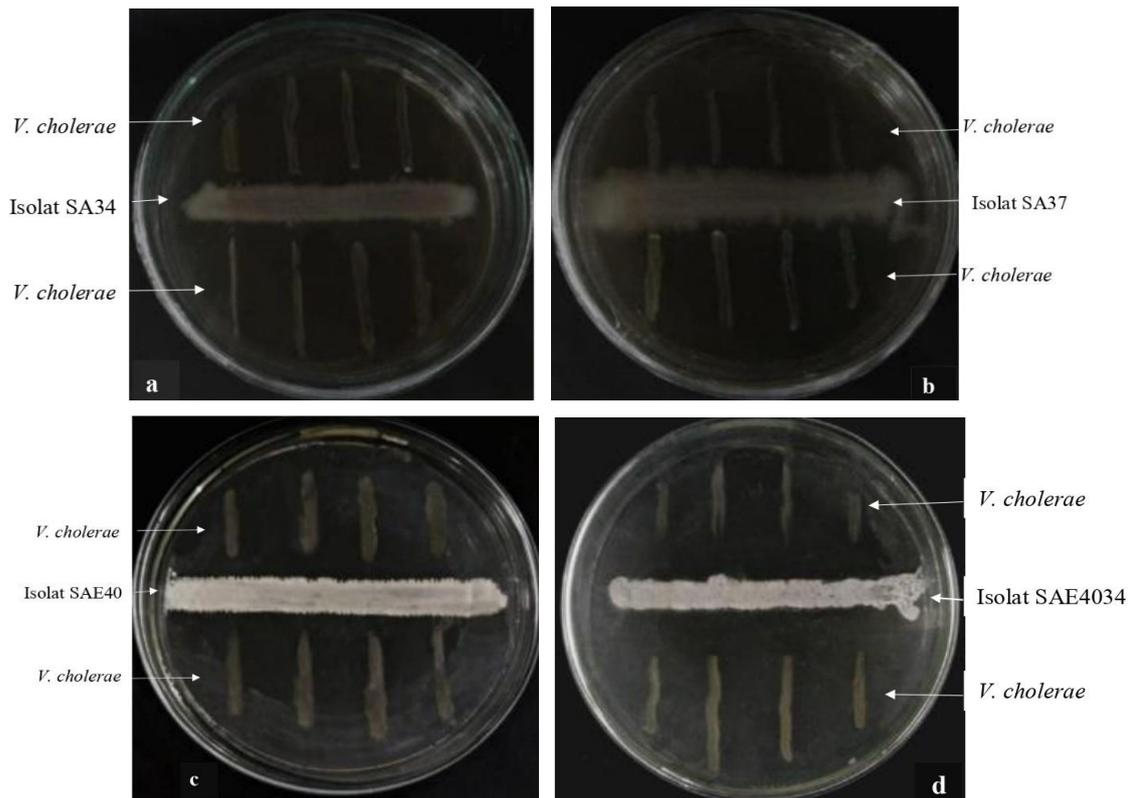
Penapisan kemampuan antibakteri *Streptomyces* spp. secara kualitatif berdasarkan Kang *et al.* (2010) menunjukkan bahwa *Streptomyces* sp. SAE4034 mampu menghambat *V. cholerae*. *Streptomyces* sp. SA34 dan *Streptomyces* sp. SA37 tidak mampu menghambat pertumbuhan *V. cholerae*, sedangkan *Streptomyces* sp. SA40 menghambat dengan kemampuan rendah (Gambar 1). Selanjutnya *Streptomyces* sp. SAE4034 digunakan untuk uji lanjut. Keberhasilan penapisan kemampuan isolat diketahui dari jarak pertumbuhan koloni bakteri.

Arifuzzaman *et al.* (2010) menyatakan bahwa seleksi isolat aktinomisetes yang berpotensi sebagai penghasil antibakteri diamati secara kualitatif dengan memberi skor dari zona hambat yang terbentuk, yaitu tidak berpotensi (-), berpotensi (++) , dan sangat berpotensi (+++) (Tabel 1). Berdasarkan kriteria tersebut, isolat SAE4034 termasuk isolat yang potensial dalam menekan pertumbuhan *V. cholerae*.

Tabel 1. Pengamatan penapisan kemampuan isolat dalam menghambat pertumbuhan *Vibrio cholerae*

No.	Kode Isolat	Aktivitas Penghambatan
1.	SA34	-
2.	SA37	-
3.	SA40	++
4.	SAE4034	+++

Keterangan: (-) = tidak berpotensi; (++) = berpotensi; (+++) = sangat berpotensi



Gambar 1. Penapisan aktivitas kemampuan *Streptomyces* spp. terhadap pertumbuhan *V. cholerae*
 Keterangan: Isolat SA34 (a); Isolat SA37 (b); Isolat SA40 (c); Isolat SAE4034 (d).

Hasil penelitian aktivitas daya hambat senyawa antibakteri *Streptomyces* sp. SAE4034 terhadap pertumbuhan *V. cholerae* menghasilkan diameter zona hambat berkisar antara 11,5-17,5 mm (Gambar 2). Menurut Rita (2010), ada empat kategori daya hambat senyawa antibakteri, yaitu dikategorikan sangat kuat apabila memiliki diameter ≥ 20 mm, kuat apabila memiliki diameter 10-20 mm, sedang apabila memiliki diameter 5-10 mm, dan lemah apabila memiliki diameter ≤ 5 mm. Ryandini *et al.* (2018) melaporkan bahwa ekstrak kasar *Streptomyces* sp. SAE4034 menghambat pertumbuhan bakteri MDR *S. aureus*, *E. coli*, dan *K. pneumoniae* dengan diameter zona hambat 21,5 mm; 12,5 mm dan 12,5 mm untuk masing-masingnya. Thirumurugan & Vijayakumar (2015) melaporkan bahwa isolat *Streptomyces* sp. ECR77 menunjukkan aktivitas hambat maksimum terhadap bakteri *V. cholerae* sebesar 13,66 mm pada konsentrasi 25 μ L.

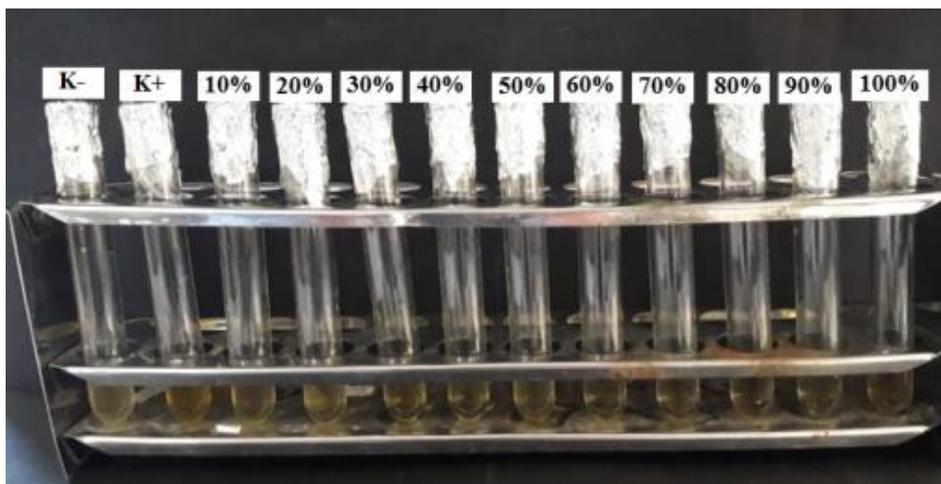
Pengujian aktivitas senyawa antibakteri *Streptomyces* sp. SAE4034 dilakukan dengan membuat dua seri konsentrasi ekstrak menggunakan pelarut DMSO 5%. Hasil pengujian menunjukkan bahwa senyawa antibakteri dengan konsentrasi 512 μ g/mL membentuk zona hambat lebih besar yaitu 17,5 mm, sedangkan pada konsentrasi 128 μ g/mL mengalami penurunan, yaitu 11,5 mm. Kenaikan dan penurunan zona hambat akibat perbedaan konsentrasi disebabkan oleh sifat kelarutan zat antibakteri pada ekstrak yang akan mempengaruhi kecepatan difusi pada media agar (Mujim, 2010).



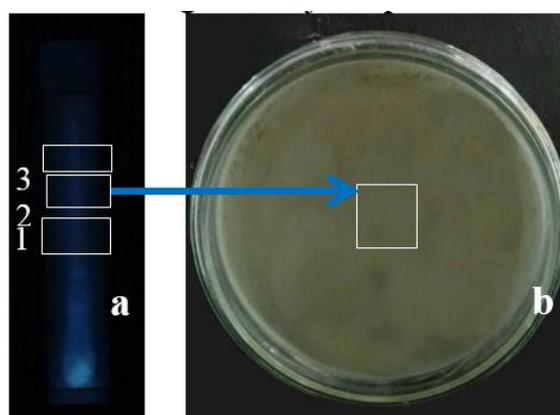
Gambar 2. Pengujian aktivitas senyawa antibakteri *Streptomyces* sp. SAE4034 dalam menghambat pertumbuhan *V. cholerae* menggunakan metode Kirby Bauer.

Keterangan: kontrol positif antibiotik tetrasiklin konsentrasi 100 μ g/mL (a); kontrol negatif larutan DMSO 5% (b); ekstrak *Streptomyces* sp. SAE4034 konsentrasi 512 μ g/mL (c); ekstrak *Streptomyces* sp. SAE4034 konsentrasi 128 μ g/mL (d).

Hasil pengujian MIC menunjukkan bahwa pada konsentrasi 20%, suspensi bakteri sudah terlihat sedikit jernih. Pengujian senyawa antibakteri pada konsentrasi 30%-100% menunjukkan bahwa suspensi terlihat jernih dibandingkan dengan kontrol tanpa ekstrak kasar dimana medium tampak keruh (Gambar 3). Wardana *et al.* (2017) melaporkan bahwa *Streptomyces* sp. SAE404 mampu menghambat *E. coli* dan *S. aureus* pada nilai MIC



Gambar 3. Pengujian aktivitas senyawa antibakteri *Streptomyces* sp. SAE4034 terhadap *V. cholerae* menggunakan metode MIC



Gambar 4. Hasil uji TLC dan uji bioautografi ekstrak *Streptomyces* sp. SAE4034

Keterangan: uji TLC menggunakan eluen kloroform, etil asetat, asam asetat (3:3:1) di bawah sinar UV 366 nm, nilai R_f 0,31 (1); 0,43 (2); 0,65 (3) (a); uji bioautografi terhadap *V. cholerae* pada medium NA(b).

20%. Sitanggang *et al.* (2019) menyatakan bahwa konsentrasi senyawa antibakteri konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100% mempunyai kategori penghambatan lemah sampai dengan kuat. Konsentrasi 10-20% mempunyai kategori penghambatan lemah, konsentrasi 30-50% kategori sedang, dan 60-100% kategori kuat.

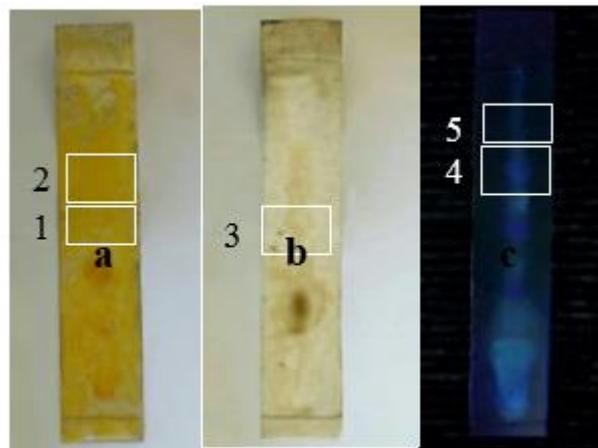
Hasil uji golongan senyawa menggunakan metode TLC yang diamati di bawah sinar UV 366 nm menghasilkan 3 spot dengan nilai R_f 0,31; 0,43; dan 0,65 (Gambar 4.a). Ekstrak kasar *Streptomyces* sp. SAE4034 yang menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, dan *Enterococcus* sp. pada hasil TLC senyawa aktifnya menghasilkan 4 spot dengan nilai R_f 0,36; 0,45; 0,54; dan 0,6 (Ryandini *et al.*, 2018).

Faktor-faktor yang menyebabkan variasi nilai R_f antara lain preparasi sampel sebelum pengujian, karakteristik dan ukuran plat TLC yang digunakan, volume dan komposisi eluen sebagai fase gerak, kondisi kesetimbangan, kadar air pada plat TLC, suhu dalam ruang, dan ukuran sampel. Pemilihan eluen merupakan faktor yang paling berpengaruh pada hasil

uji TLC. Eluen dapat terdiri dari satu pelarut atau campuran dari dua sampai enam pelarut. Nilai R_f berkisar antara 0 dan 1 dengan nilai R_f terbaik antara 0,2-0,8 untuk deteksi UV (Wulandari, 2011).

Hasil uji bioautografi untuk mengetahui aktivitas dari masing-masing spot melalui interaksi antara spot pada plat TLC dengan bakteri uji menunjukkan bahwa, spot dengan nilai R_f 0,43 mampu menghambat pertumbuhan *V. cholerae* yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih (Gambar 4.b). Bioautografi adalah uji aktivitas senyawa antimikroba *in situ* bersama dengan uji TLC (Wardana *et al.*, 2017). Hasil TLC dan bioautografi disajikan pada Gambar 4.

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak *Streptomyces* sp. SAE4034 menghasilkan 5 spot yang terdiri atas senyawa alkaloid, terpenoid, dan flavonoid. Spot dengan nilai R_f 0,34 dan 0,43 adalah golongan senyawa alkaloid, spot dengan nilai R_f 0,32 adalah golongan senyawa terpenoid, dan spot dengan nilai R_f 0,65 dan 0,70 adalah golongan senyawa flavonoid (Gambar 5). Senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan *V. cholerae* adalah senyawa alkaloid dengan nilai R_f 0,43. Senyawa



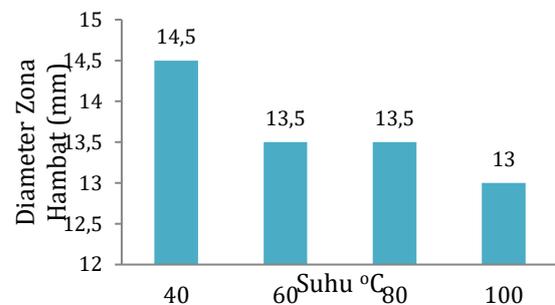
Gambar 5. Hasil identifikasi senyawa ekstrak *Streptomyces* sp. SAE4034 menggunakan metode fitokimia
Keterangan: senyawa alkaloid menggunakan reagen *Dragendroff*, nilai R_f 0,34 (1); 0,43 (2) (a); senyawa terpenoid menggunakan reagen anilin asam sulfat, nilai R_f 0,32 (3) (b); senyawa flavonoid menggunakan reagen sitroborat pada sinar UV 366 nm, nilai R_f 0,65 (4); 0,70 (5) (c).

alkaloid diketahui mampu menghambat pertumbuhan bakteri karena memiliki gugus basa yang mengandung nitrogen. DNA bakteri akan mengalami kerusakan, dan merusak dinding sel karena lapisan dinding sel bakteri tidak terbentuk secara sempurna sehingga menyebabkan sel mati (Juliantina *et al.*, 2009).

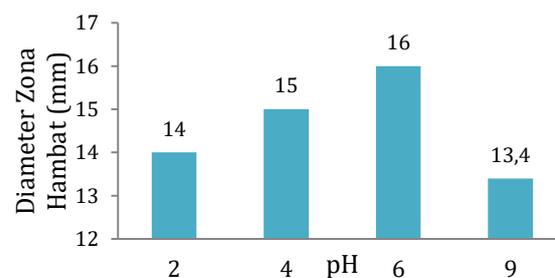
Spot senyawa flavonoid dan terpenoid tidak menunjukkan penghambatan terhadap pertumbuhan *V. cholerae*. Hal ini menunjukkan bahwa kedua senyawa tersebut tidak mengandung senyawa antibakter yang menghambat pertumbuhan *V. cholerae*. Menurut Nugraha *et al.* (2017), senyawa flavonoid dapat bersifat antibakteri terhadap bakteri *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Flavonoid menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak dinding sel, menonaktifkan kerja enzim, berikatan dengan adhesin, dan merusak membran sel. Senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Branhamella catarrhalis*, *Staphylococcus epidermidis* dan *Straphylococcus aureus*. Senyawa terpenoid menghambat sintesis protein, mudah larut dalam lipid sehingga mengakibatkan senyawa ini lebih mudah menembus dinding sel bakteri Gram positif dan sel bakteri Gram negatif (Rosyidah *et al.*, 2010).

Ekstrak kasar dengan perlakuan suhu 40°C menunjukkan aktivitas penghambatan tinggi terhadap *V. cholerae* dengan zona penghambatan sebesar 14,5 mm. Perlakuan ekstrak kasar *Streptomyces* sp. SAE4034 pada suhu 60°C, 80°C, dan 100°C menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri *V. cholerae* semakin menurun (Gambar 6).

Thirumurugan & Vijayakumar (2015) melaporkan bahwa antibakteri dari isolat *Streptomyces* sp. ECR77 memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *V. cholerae* dan *V. parahaemolyticus* dengan suhu optimum berkisar pada suhu 20-45°C. Senyawa antibakteri isolat *Streptomyces* sp. ECR77 memiliki titik lebur



Gambar 6. Aktivitas senyawa antibakteri *Streptomyces* sp. SAE4034 dalam menghambat *V. cholerae* pada variasi suhu



Gambar 7. Aktivitas senyawa antibakteri *Streptomyces* sp. SAE4034 dalam menghambat *V. cholerae* pada variasi pH

senyawa aktif pada suhu 110°C dan aktivitas senyawanya akan hilang dalam waktu 10 menit. Menurut Fajar *et al.* (2014), Pada suhu tinggi, senyawa alkaloid yang bersifat basa terdegradasi menjadi senyawa yang bersifat asam, hal ini menyebabkan gugus alkaloid rusak dan kandungan senyawa aktifnya menurun atau menghilang.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pH optimum aktivitas senyawa antibakteri *Streptomyces* sp. SAE4034 dalam menghambat *V. cholerae* adalah pada pH 6 dengan diameter zona hambat sebesar 16 mm. Ekstrak kasar *Streptomyces* sp. SAE4034

Tabel 2. Hasil karakterisasi *Streptomyces* sp. SAE4034

Karakteristik	Hasil	Karakteristik	Hasil
Makromorfologi		Fermentasi karbohidrat	
Bentuk koloni	Bulat	Fruktosa (A/G)	+/+
Tepi koloni	Undulate	Rafinosa (A/G)	+/+
Elevasi koloni	Timbul	Ramnosa (A/G)	-/-
Permukaan koloni	Powdery	Inositol (A/G)	-/-
Ukuran koloni	2-5 Mm	Manitol (A/G)	-/-
Warna koloni	Cream	Arabinosa (A/G)	+/+
Mikromorfologi		Xylosa (A/G)	+/-
Gram	Positif	Nutrisional	
Hifa aerial	Spiral	Glukosa	+
Miselium substrat	+	Laktosa	-
Rantai spora	Panjang	Fruktosa	+
Biokimiawi		Sukrosa	+
Oksidase	+	Maltosa	-
Katalase	+	Manitol	-
Oksidatif/Fermentatif	-/+	Fisiologis	
Fermentasi karbohidrat		Suhu 40°C	-
Glukosa (A/G)	+/+	Suhu 60°C	-
Laktosa (A/G)	-/-	pH 6	+
Sukrosa (A/G)	+/+	pH 9	+

dengan perlakuan pH 2, 4, dan 9 menunjukkan aktivitas penghambatan semakin menurun (Gambar 7).

Thirumurugan & Vijayakumar (2015) melaporkan bahwa antibakteri dari isolat *Streptomyces* sp. ECR77 memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *V. cholerae* dan *V. parahaemolyticus* dengan pH optimum berkisar 7,0 hingga 8,0; pada pH tersebut senyawa yang terkandung akan lebih stabil. Menurut Fajar *et al.* (2014), semakin tinggi suhu penyimpanan maka pH akan semakin rendah dan bersifat asam. Sifat asam inilah yang menyebabkan senyawa aktif pada ekstrak mengalami degradasi.

Hasil karakterisasi makromorfologi, mikromorfologi, biokimiawi, nutrisi dan fisiologi (Tabel 2.) dan mengacu pada buku "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition" dan dibandingkan dengan penelitian sebelumnya. Ryandini *et al.* (2018) pada penelitian sebelumnya melaporkan bahwa isolat *Streptomyces* sp. SAE4034 mempunyai koloni berbentuk bulat, dengan permukaan koloni bertepung, ukuran koloni 2-3 mm, dan koloni berwarna cream, miselium aerial berbentuk spiral dan terfragmentasi menjadi kokoid, miselium substrat positif, difusi pigmen negatif, dan memiliki rantai spora yang panjang. Goodfellow *et al.* (2012) menyatakan Genus *Streptomyces* adalah bakteri aerobik, Gram positif, tidak tahan asam dan mampu membentuk substrat bercabang dan miselium aerial. Miselium aerial membentuk hingga tiga rantai spora pada saat matang.

Berdasarkan hasil penelitian ini, isolat *Streptomyces* sp. SAE4034 bersifat oksidase, katalase dan fermentatif. Ryandini *et al.* (2018) melaporkan bahwa isolat *Streptomyces* sp. SAE4034 positif pada uji katalase dan oksidase. Menurut

Goodfellow *et al.* (2012) beberapa *Streptomyces* sp. positif oksidase, katalase, fosfatase, urease. Ryandini *et al.* (2018) melaporkan bahwa isolat *Streptomyces* sp. SAE4034 positif pada fruktosa, sukrosa, rafinosa, arabinosa, dan xylosa, sedangkan negatif pada ramnosa, inositol dan manitol. Beberapa *Streptomyces* dapat tumbuh dengan baik pada glukosa, sukrosa, arabinosa, galaktosa, rafinosa, menunjukkan pertumbuhan yang moderat pada fruktosa, xylosa, inositol, dan ramnosa, serta tidak ada pertumbuhan pada laktosa dan manitol (Goodfellow *et al.*, 2012).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat *Streptomyces* sp. SAE4034 tidak dapat tumbuh pada suhu 40°C dan 60°C, dan tumbuh pada pH 6 dan 9. Ryandini *et al.* (2018) melaporkan bahwa isolat *Streptomyces* sp. SAE4034 tumbuh optimum pada suhu ruang, pH 8,5, dan salinitas 3%. Pertumbuhan optimal *Streptomyces* yaitu pada suhu 30°C, toleransi terhadap pH berkisar 6-9,5, dan kadar NaCl hingga 6%. Kebanyakan *Streptomyces* adalah mesofil tumbuh pada suhu antara 10-37°C. Beberapa strain dapat tumbuh pada suhu 45°C dan bersifat neutrofil tumbuh antara pH 5,0 dan 9,0, dengan optimum pada pH 7,0 (Goodfellow *et al.*, 2012).

SIMPULAN

Streptomyces sp. SAE4034 mampu menghambat pertumbuhan *V. Cholerae* dan pada konsentrasi ekstrak *Streptomyces* sp. SAE4034 sebanyak 128 µg/mL dan 512 µg/mL berturut-turut mampu menghambat *V. cholerae* dengan diameter zona hambat sebesar 11,5 mm dan 17,5 mm dengan nilai MIC sebesar 30%. Senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. SAE4034 memiliki nilai R_f berkisar antara 0,31-0,70, dan senyawa aktif yang mampu menghambat *V. cholerae* termasuk

golongan alkaloid. Aktivitas senyawa antibakteri tinggi pada suhu 40°C dengan zona hambat 14 mm pH 6 dengan zona hambat 16 mm.

DAFTAR REFERENSI

- 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), pp. 39-44.
- Arifuzzaman, M., Khatun, M. R. & Rahman, H., 2010. Isolation and Screening of Actinomycetes from Sundarbans Soil for Antibacterial Activity. *African Journal of Biotechnology*, 9(29), pp. 4615-4619.
- Atlas, R. M., 2010. *Handbook of Microbiological Media Fourth Edition*. Washington, D. C: CRC Press.
- Berdy, J., 2005. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics*, 58(1), pp. 1-26.
- Brown, A. E., 2007. *Microbiological Applications*. New York : Higher Education.
- Damayanti, S. S., Komala, O. & Effendi, E. M., 2020. Identifikasi Bakteri Dari Pupuk Organik Cair Isi Rumen Sapi. *EKOLOGIA*, 18(2), pp. 63-71.
- Fajar, A., Ibrahim, R. & Dewi, E. N., 2014. Stabilitas Ekstrak Kasar Pigmen Klorofil, Beta Karoten, Dan Caulerpin Alga Hijau (*Caulerpa racemosa*) Pada Suhu Penyimpanan Yang Berbeda. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*, 3(1), pp. 1-10.
- Fajriaty, I., Hariyanto, I. H., Andres, A. & Setyaningrum, R., 2018. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis dari Ekstrak Etanol Daun Bintangur (*Calophyllum soulattri* Burm. F.). *Jurnal Pendidikan Informatika dan Sains*, 7(1), pp. 54-67.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W. & Whitman, W. B., 2012. *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria Part A. 2nd Edition*. New York: Springer Science & Business Media.
- Juliantina, F., Citra, D. A., Nirwani, B., Nurmasitoh, T. & Bowo, E. T., 2009. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan Bakteri Gram Negatif. *Jurnal kedokteran dan kesehatan indonesia*, (1), pp. 12-20.
- Kang, M. J., Strap, J. L. & Crawford., 2010. Isolation and Characterization of Potent Antifungal Strains of the *Streptomyces violaceusniger* Clade Active Against *Candida albicans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 37, pp. 35-41.
- Kismiyati, S. R., Yusuf, R. N. & KUSDawari, R., 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Gram Negatif pada Luka Ikan Maskoki (*Carassius auratus*) Akibat Infeksi Ektoparasit *Argulus* sp. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 1(2), pp. 129-134.
- Mujim, S., 2010. Pengaruh Ekstrak Rimpang Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) Terhadap Pertumbuhan *Pythium* sp. Penyebab Penyakit Rebah Kecambah Mentimun Secara In Vitro. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*, 10(1), pp. 59-63.
- Mukti, P. K., Hastuti, U. S. & Sulisetijono, S., 2018. Karakterisasi, Identifikasi, dan Observasi Histologik Letak Fungi Endofit yang Diisolasi dari Tanaman *Cordilyne fruticosa* (L.) A. Chev. In *Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Environmental, and Learning*, 15(1), pp. 862-869.
- Nomer, N. M. G. R., Duniaji, A. S. & Nocianitri, K. A., 2019. Kandungan Senyawa Flavonoid dan Antosianin Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) SERTA Aktivitas Antibakteri Terhadap *Vibrio cholerae*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 8(2), pp. 216-225.
- Nugraha, A. C., Prasetya, A. T. & Mursiti, S., 2017. Isolasi, Identifikasi, Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid Sebagai Antibakteri Dari Daun Mangga. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 6(2), pp. 91-96.
- Pruzzo, C., Gallo, G. & Canesi, L., 2005. Persistence of Vibrios In Marine Bivalves: The Role of Interactions With Haemolymph Components. *Environmental microbiology*, 7(6), pp. 761-772.
- Ramadhaniah, F. A., 2013. Keragaman Bakteri Endofit pada Kultivar Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) Leor dan Duri di Kabupaten Subang. *Skripsi*. Bandung : Universitas Pendidikan Indonesia.
- Rita, W. S., 2010. Isolasi, Identifikasi, dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Golongan Triterpenoid pada Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoaria* (Berg.) Roscoe). *Jurnal Kimia*, 4(1), pp. 20-26.
- Rosyidah, K., Nurmuhammadina, S. A., Komari, N. & Astuti, M. D., 2010. Aktivitas Antibakteri Fraksi Saponin Dari Kulit Batang Tumbuhan

- Kasturi (*Mangifera casturi*). *Alchemy*, 7 (2), pp. 25-31.
- Ryandini, D., Ocky, K. R. & Oedjijono., 2018. Isolate Aktinomisetes SA32 Origin of Segara Anakan Mangrove Rhizosphere and its Capability in Inhibiting Multi-Drugs Resistant Bacteria Growth. *J MicrobBiochem Technol*, 10(1), pp. 1-7.
- Ryandini, D., Pramono, H. & Sukanto, S. (2018). Antibacterial Activity of *Streptomyces* SAE4034 Isolated From Segara Anakan Mangrove Rhizosphere Against Antibiotic Resistant Bacteria. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 10(1), 117-124.
- Schaad N. W., Jones, J. B. & Chun, W., 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. USA: American Phytopatological Society Press.
- Sitanggang, F. M. C., Duniaji, A. S. & Pratiwi, I. D. P. K., 2019. Daya Hambat Ekstrak Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) dalam Etil Asetat Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*, 8(3), pp. 257-266.
- Subramani, R. & Aalbersberg, W., 2012. Marine Aktinomisetes: an Ongoing Source of Novel Bioactive Metabolites. *Microbiological research*, 167(10), pp. 571-580.
- Thirumurugan, D. & Vijayakumar, R., 2015. Characterization and Structure Elucidation of Antibacterial Compound of *Streptomyces* sp. ECR77 Isolated from East Coast of India. *Current Microbiology*, 70(5), pp. 745-755.
- Wall, P. E., 2007. *Thin-Layer Chromatography: A Modern Practical Approach*. United Kingdom: Royal Society of Chemistry.
- Wardana, R. S., Ryandini, D. & Oedjijono, O., 2017. Antibacterial Capacity of *Streptomyces* Isolate From a Mangrove Plant Rhizosphere *Avicennia marina*. *Scripta Biologica*, 4(2), pp. 131-134.
- Wulandari, L., 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT. Taman Kampus Presindo.