

Alimuddin Ali



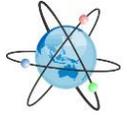
# **KERAGAMAN ACTINO BACTERIA DI SULAWESI SELATAN**

**dan Aplikasinya dalam  
Bioteknologi Tanaman**

**UNDANG-UNDANG REPUBLIK INDONESIA  
NOMOR 28 TAHUN 2014  
TENTANG HAK CIPTA**

**PASAL 113  
KETENTUAN PIDANA**

- (1) Setiap orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 100.000.000,00 (seratus juta rupiah).
- (2) Setiap orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).
- (3) Setiap orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp 1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
- (4) Setiap orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah)



*Keragaman Actinobacteria di Sulawesi  
Selatan dan Aplikasinya dalam  
Bioteknologi Tanaman*

Alimuddin Ali

2017

# Keragaman Actinobacteria di Sulawesi Selatan dan Aplikasinya dalam Bioteknologi Tanaman

Penulis : Alimuddin Ali

---

Hak Cipta ©2017 pada penulis.

Hak penerbitan pada Pustaka Ramadhan. Bagi mereka yang ingin memperbanyak sebagian isi buku ini dalam bentuk atau cara apapun harus mendapat izin tertulis dari penulis dan Penerbit Global RCI.

Penyunting : Prof. Dr. H. Hamzah Upu, M.Ed.  
Perancang Sampul : Muhammad Iswan Achlan  
Penata Letak : Muhammad Yusran Basri  
Isi : Sepenuhnya tanggung jawab penulis

Diterbitkan Oleh:



**Global Research and Consulting Institute (Global-RCI)**

Kompleks Alauddin Business Center (ABC)

Jalan Sultan Alauddin No. 78 P, Makassar, Indonesia, 90222. Telepon: 08114100046,  
Homepage: <http://www.global-rci.com>.

ISBN 978-602-50355-0-0

Cetakan Pertama, Oktober 2017

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

*All Rights Reserved*

---

**Perpustakaan Nasional: Katalog dalam Terbitan (KDT)**

---

**Alimuddin Ali**

**Keragaman Actinobacteria di Sulawesi Selatan dan Aplikasinya dalam Bioteknologi Tanaman** /Alimuddin Ali: -- cetakan I -- Makassar: Global RCI, 2017

x + 146al.; 16 x 23 cm

## KATA PENGANTAR

Buku ini mengulas berbagai aspek tentang Actinobacteria seperti morfologi, struktur, dan karakteristik. Aspek lain yang dibahas dalam buku ini adalah cara mengisolasi, mengidentifikasi dan mengkarakterisasi serta aplikasinya dalam bioteknologi tanaman. Disamping itu, aplikasi Actinobacteria dalam berbagai bidang seperti kesehatan, farmasi, pangan, industri juga diulas dalam buku ini.

Berkenaan dengan penulisan buku referensi ini, maka penulis mengucapkan terima kasih kepada Allah swt atas limpahan rahmat dan karuniaNya sehingga buku ini dapat diselesaikan sebagaimana yang diharapkan. Ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya penulis haturkan kepada **Kementerian Riset dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia** atas dana yang diberikan dalam rangka penelitian **Hibah Penelitian Berbasis Kompetensi Tahun 2015/6**. Terima kasih pula saya sampaikan kepada semua kolega di Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Makassar Prof. Dr. Ir. Yusminah Hala, MS; Oslan Jumadi, Si,Si, M.Phil, Ph.D, Dr. Ir. Muhammad Junda, M.Si dan Hartono, S.Si, M.Biotech atas kerjasamanya yang sangat menyenangkan.

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada istri tercinta Dr.Herlina Rante, S.Si, M.Si, Apt, serta putri-putri tersayang Istiftah A, Dini Naswah Alimuddin, Salwa Intani Alimuddin dan Rizhany Afseen Alimuddin sebagai inspirasi atas pengertian serta waktu yang terabaikan menemani mereka di saat-saat penulisan naskah buku ini.

Buku ini disusun mengacu pada berbagai referensi utama seperti buku teks, jurnal maupun review yang berbahasa Inggris serta hasil penelitian yang dilakukan oleh penulis. Oleh sebab itu diharapkan uluran saran dan kritikan yang membangun untuk perbaikan dimasa datang. Akhirnya penulis berharap semoga buku referensi ini dapat digunakan sebagai salah satu wahana pembelajaran untuk mencerdaskan anak bangsa.

Makasar, Oktober 2017

Penulis

Buku ini kopersambahkan kepada:  
Orang tuaku dan guru-guruku, *semoga manjadi amal jariyah*

# DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vii
BAB 1. PENDAHULUAN .....	1
A. Pengertian Actinobacteria .....	1
B. Arti Penting Actinobacteria .....	6
BAB 2. MORFOLOGI DAN ANATOMI ACTINOBACTERIA .....	17
A. Karakter Umum Actinobacteria .....	17
B. Struktur Umum Actinobacteria .....	19
C. Pertumbuhan Actinobacteria .....	30
BAB 3. METABOLISME DAN METABOLIT ACTINOBACTERIA .....	41
A. Pengertian Metabolisme .....	41
B. Metabolit Primer Actinobacteria .....	44
C. Metabolit Sekunder Actinobacteria .....	46
D. Biosintesis Senyawa Poliketida Actinobacteria .....	51
E. Mekanisme Biosintesis Nystatin Actinobacteria .....	56
F. Mekanisme Biosintesis Herbimycin A Actinobacteria .....	59
G. Metabolit Actinobacteria Laut (Marine) .....	63
BAB 4. TEKNOLOGI HAYATI ACTINOBACTERIA .....	73
A. Actinobacteria Penghasil Senyawa Obat .....	73
B. Lingkungan dan Actinobacteria .....	75
C. Pertanian dan Actinobacteria .....	76
D. Pangan dan Actinobacteria .....	87
BAB 5. METODE RISET KERAGAMAN ACTINOBACTERIA .....	93
A. Metode Analisis Keragaman Actinobacteria .....	93
B. Keragaman Actinobacteria dari Rizosfer Tanaman .....	100
BAB 6. METODE RISET ACTINOBACTERIA PELARUT POSFAT .....	103
A. Pengujian actinobacteria pelarut posfat .....	104
B. Seleksi kandidat Actinobacteria .....	112
C. Formulasi pupuk hayati .....	113
BAB 7. APLIKASI PUPUK HAYATI ACTINOBACTERIA PELARUT POSFAT PADA TANAMAN .....	117
A. Aplikasi pupuk hayati Skala in planta .....	120
B. Hasil pertumbuhan tanaman .....	126
DAFTAR PUSTAKA .....	133



# BAB

# I

## PENDAHULUAN

### Pengertian Actinobacteria

Actinobacteria atau yang lazim dikenal dengan istilah Actinomycetes [baca: aktinomiset] merupakan mikrobia yang memiliki sejumlah keunikan dibandingkan dengan mikrobia lainnya. Actinobacteria pertama kali diperkenalkan oleh Ferdinand Cohn pada tahun 1875 sewaktu berhasil mengisolasi *Actinomyces brovis*. Mikrobia yang ditemukan tersebut lalu dinamakannya sebagai Actinomycetes atau *ray-fungi* yang dapat diartikan sebagai fungi radian. Makna fungi radian disebabkan oleh susunan filamen-filamen bercabang yang menyerupai jari-jari lingkaran. Selanjutnya kata *mykes* [bahasa Yunani] yang melengkapi nama Actinomycetes tersebut merujuk pada makna fungi. Hal ini disebabkan oleh bentuk atau morfologi dari Actinobacteria tersebut memiliki kemiripan dengan fungi. Namun demikian Actinobacteria bukanlah fungi atau jamur yang termasuk kelompok eukariotik melainkan bakteri yang termasuk dalam kelompok prokariotik.

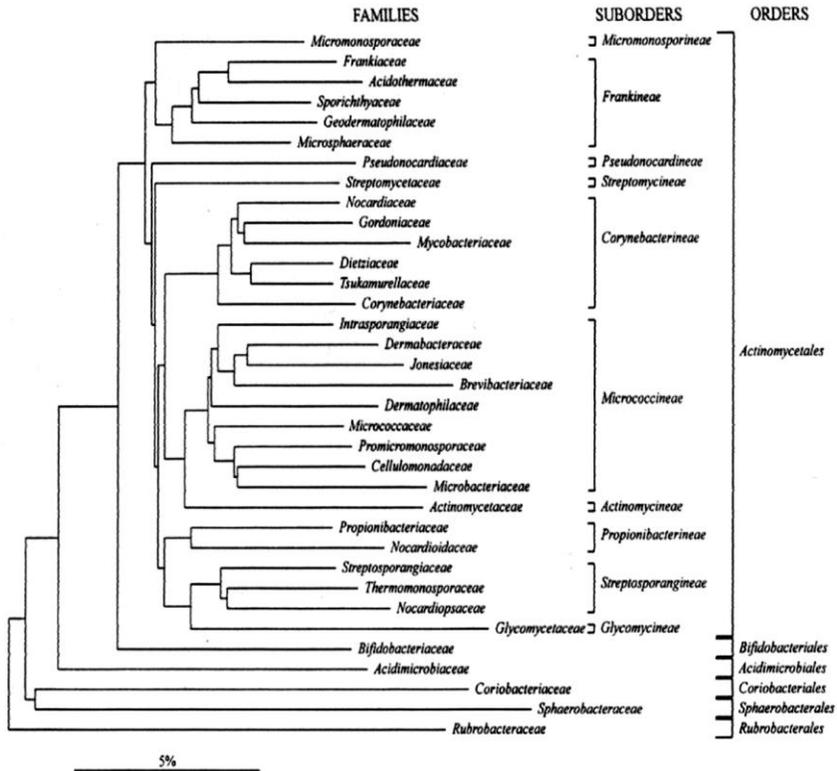
Actinobacteria dipandang sebagai bentuk transisi antara bakteri dan fungi, sehingga kadang-kadang istilah Actinobacteria disebut juga “*bakteri tingkat tinggi*” atau “*bakteri berfilamen*”. Komposisi dinding sel Actinobacteria berbeda dengan fungi, karena tidak ditemukan adanya *kitin* dan *selulosa* yang umumnya ditemukan pada dinding sel fungi. Penjelasan lebih rinci tentang morfologi dan karakter Actinobacteria akan dipaparkan pada Bab berikutnya.

Tidak ada definisi resmi untuk " Actinomycetes" karena kata itu kehilangan statusnya sebagai kelas dalam waktu yang lama pada nomenklatur bakteri. Namun, kebanyakan digunakan istilah

"Actinomycetes" sebagai istilah yang merujuk pada bakteri dari ordo *Actinomycetales* (yaitu, *Streptomyces* dan sejenisnya).

Actinomycetes merupakan kelas dalam klasifikasi kerajaan bakteri (domain) yang telah berubah namanya dan diganti menjadi kelas **Actinobacteria**, namun masih digunakan dalam literatur sampai saat ini karena nama tersebut sudah menjadi lazim. Akan tetapi bagi sebagian orang, Actinomycetes dan Actinobacteria adalah hal yang sama. Jika kita melakukan pencarian nama tersebut di situs internet dengan kata "Actinomycetes", hasilnya, kita justru diarahkan ke halaman yang mencantumkan kata Actinobacteria. Disitu dinyatakan bahwa definisi: "Actinobacteria atau Actinomycetes adalah kelompok bakteri Gram-positif yang memiliki nisbah/rasio G+C yang tinggi. Jadi Actinomycetes dengan Actinobacteria dinyatakan sebagai nama yang sama atau sinonim sebagai kelas dalam urutan klasifikasi.

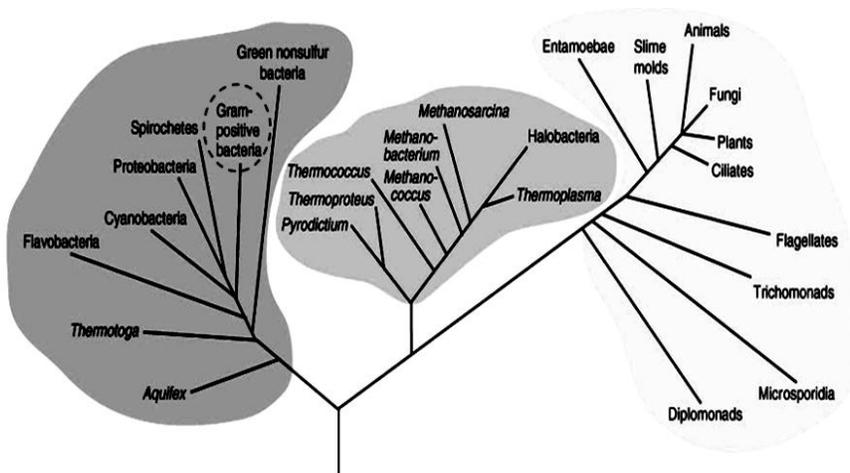
Tampaknya bahwa "Actinomycetes" adalah nama lama untuk kelas, dan kemudian digantikan menjadi "Actinobacteria". Tetapi jika dicermati lebih lanjut untuk menelusuri lebih jauh klasifikasi dari Actinomycetes tersebut, maka akan ditemukan bahwa Actinobacteria juga sebagai nama filum. Dengan demikian apakah Actinobacteria (kelas atau filum) sama dengan Actinomycetes? Penjelasan tentang hal tersebut dapat dipahami jika topik pembicaraan tentang istilah Actinomycetes [sinonim Actinobacteria] merujuk pada bakteri berfilamen yang merupakan anggota dari ordo dari Actinomycetales (salah satu dari 5 ordo dalam filum Actinobacteria). Sebaliknya jika pembicaraan merujuk pada filum, maka istilah Actinobacteria merupakan filum yang beranggotakan ordo Acidimicrobiales [genus *Acidimicrobium*], Bifidobacteriales [genus *Bifidobacterium*], Coriobacteriales [genus *Coriobacterium*], Rubrobacteriales [genus *Rubrobacter*] serta Actinomycetales [genus *Streptomyces*] itu sendiri..



Gambar 1.1. Pohon filogenetik yang menggambarkan hubungan antar familia dan ordo dari kelompok Actinomycetes berdasarkan hasil analisis sekuen gen 16S rRNA (Stackebrandt *et al.*, 1997).

Dengan demikian istilah Actinomycetes dan Actinobacteria dapat dibedakan jika tema pembicaraan didasarkan atas posisi dari kedua istilah tersebut, yaitu sebagai kelompok bakteri, kelas atau filum.

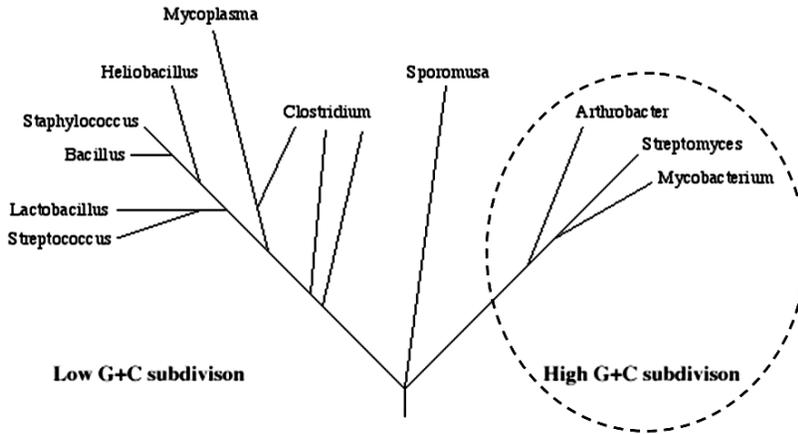
Dalam taksonomi modern, Actinobacteria dimasukkan ke dalam Super Kerajaan bakteri yaitu berada dalam **Domain Bacteria** sebagaimana yang diusulkan oleh Woese, 1990, seperti pada Gambar. 1.2.



Gambar. 1.2. Pohon filogenetik universal yang dikonstruksi berdasarkan perbandingan sekuen RNA ribosomal

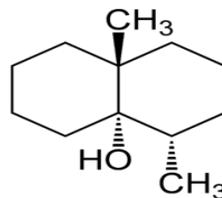
Berdasarkan analisis gen penyandi RNA ribosomal, maka Actinobacteria bergabung bersama-sama dengan bakteri lainnya dan berpisah dengan Arhaea dan jamur. Demikian pula dalam kelompok bakteri ini sendiri dipisahkan dengan bakteri lainnya berdasarkan kandungan %GC yaitu subdivisi G+C tinggi (Gambar 1.3). Berikut ini kedudukan taksonomi kelompok Actinobacteria yaitu genus *Streptomyces* sebagai berikut:

- Domain : Bacteria
- Filum** : **Actinobacteria**
- Kelas** : **Actinobacteria**
- Ordo : Actinomycetales
- Familia : Streptomycetaceae
- Genus : *Streptomyces*
- Spesies : *Streptomyces coelicolor*



Gambar. 1.3. Pengelompokan bakteri berdasarkan kandungan G+C

Actinobacteria mudah dikenal karena memiliki kekhasan bau (bau tanah basah) akibat pembentukan geosmin jika ditumbuhkan pada media agar. *Geosmin*, secara harfiah berarti “bau tanah” merupakan suatu senyawa organik yang menyebabkan aroma atau bau khas yang biasanya timbul jika tanah kering tiba-tiba terguyur air, misalnya saat hujan turun atau jika kita mengaduk-aduk tanah. Hal ini disebabkan populasi Actinobacteria dalam tanah umumnya lebih tinggi dibandingkan dengan populasi mikrobial lainnya yang secara langsung membangun bau khas tanah tersebut.



Gambar 1.4. Struktur kimia geosmin

Geosmin dihasilkan oleh beberapa kelas mikrobial termasuk Cyanobacteria (alga biru-hijau) dan Actinobacteria (khususnya genus

Streptomyces), dan terlepas jika mikrobial tersebut tumbuh. Masyarakat yang menggunakan air permukaan, biasanya secara berkala memiliki pengalaman yaitu air tampungan berbau kurang sedap/bau tanah. Hal ini terjadi jika populasi Actinobacteria dalam air tersebut tinggi, sehingga menyebabkan terjadinya pelepasan geosmin dalam air. Manusia yang memiliki tingkat sensitivitas tinggi terhadap bau geosmin, mampu mencium bau tersebut meski dalam konsentrasi di bawah 5 ppm.

### Arti penting Actinobacteria

Actinobacteria merupakan prokariotik yang memiliki nilai ekonomi dan bioteknologi paling penting. Mikrobial ini menghasilkan sekitar separuh dari jumlah metabolit sekunder bioaktif yang telah ditemukan baik antibiotik, bahan antitumor, immunosupresif, maupun enzim. Rekam jejak (*track record*) yang sangat tinggi ini menyebabkan Actinomycetes mendapat perhatian khusus selama lebih dari 50 tahun. Selain itu keragaman struktur kimia yang menakjubkan serta aktivitas biologi dari senyawa tersebut yang sangat beragam, menjadi alasan utama perhatian para ilmuwan untuk terus mengkaji mikrobial ini. Sejumlah upaya intensif dilakukan dan difokuskan untuk mencari Actinobacteria baru yang diharapkan menghasilkan senyawa baru melalui proses skrining dari berbagai sumber.

Pustaka ilmiah melaporkan bahwa kurang lebih 4000an paten yang didaftarkan terkait dengan produk dan proses produksi dari Actinobacteria. Sekitar 22.500 dari total metabolit sekunder atau mencapai 10.100 (45%) yang dilaporkan dihasilkan oleh Actinobacteria (763) terutama oleh kelompok Streptomyces dan 2470 merupakan produk dari Actinobacteria non-Streptomyces. Jumlah senyawa bioaktif tersebut yang berasal dari Actinobacteria dan kelompok senyawa yang dihasilkannya tertera pada Tabel 1.1 dan Tabel 1.2.

Tabel 1.1. Jumlah senyawa yang ditemukan pada kelompok Actinobacteria

Genus	1974	1980	1984	1988	1992	1996	2005
<i>Streptomyces</i>	1934	2784	3477	4877	5645	6600	7630
<i>Micromonospora</i>	41	129	269	398	492	535	740

<i>Actinomadura</i>	0	16	51	164	248	315	345
<i>Streptovercillium</i>	19	41	64	168	169	244	258
<i>Nocardia</i>	45	74	107	262	270	287	357
<i>Actinoplanes</i>	6	40	95	146	169	195	248
<i>Streptosporangium</i>	7	20	26	39	57	66	79

Tabel 1.2. Kelompok utama metabolit sekunder bioaktif

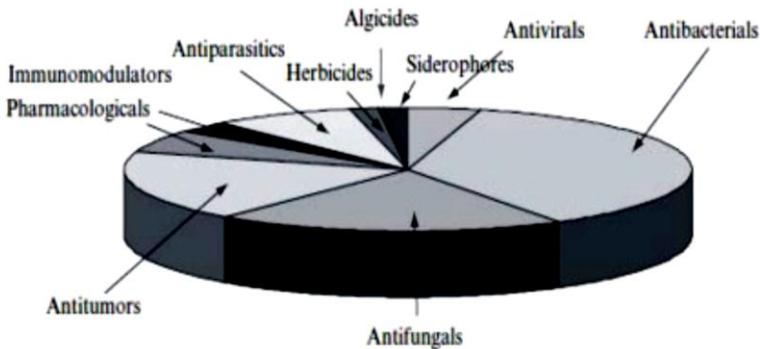
Jenis aktivitas	Actinobacteria	Fungi	Bakteri lainnya	Total
Bahan aktif farmasi/ imunologis	230	750	80	1060
Inhibitor enzim	380	150	40	570
Fitotoksin/herbisida	80	380	50	510
Pestisida	360	85	10	455
Pengatur mikrobia	30	30	20	80
Bahan aktif lainnya	320	2305	700	3325
Jumlah total	1400	3700	900	6000
Antibiotika	8700	4900	2900	16.500
Metabolit sekunder aktif (total)	10100	8600	3800	22.500

Sumber: Text book of Microbiology, P.C. Trivedi, Sonali Pandey, Seema Bhaduria, *First Published in 2010 by Prem C. Bakliwal*

Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh Actinobacteria menunjukkan aktivitas biologik yang beragam. Metabolit sekunder tersebut menunjukkan struktur yang sangat komplit sehingga dibutuhkan banyak enzim untuk proses sintesisnya. Sebagai contoh adalah pembentukan antibiotik ***Streptomycin*** yang memerlukan kurang lebih 30 enzim berbeda yang terlibat dalam proses sintesis senyawa tersebut. Proses sintesis yang sangat komplit ini tidak mudah dilakukan dengan proses secara kimiawi biasa. Bahkan metabolit sekunder tunggal tersebut justru mampu menunjukkan aktivitas biologik yang sangat beragam. *Avermectin* merupakan contoh metabolit tunggal yang dihasilkan oleh *S. hygrosopicus* menunjukkan aktivitas beragam seperti antibakteri, antifungi, antiparasit dan insektisida. Contoh lainnya adalah *Ascomycin* yang diproduksi oleh *S. hygrosopicus* var. *ascomyceticus* dilaporkan bersifat sebagai antifungi. Kajian lebih lanjut menunjukkan bahwa senyawa tersebut juga aktif sebagai imunosupresif. Analisis yang dilakukan

mengungkap bahwa ascomycin tersusun atas dua senyawa yaitu FR900520 dan FR900523 yang berkaitan erat dengan senyawa FK506 sebagai immunosupresif dihasilkan oleh *S. tsukubaensis*. Keragaman dan kekhasan aktivitas senyawa yang dihasilkannya tersebut, maka tidak berlebihan jika dikatakan bahwa Actinobacteria merupakan mikrobia paling penting dalam industri.

Ribuan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh Actinobacteria ditemukan selama kurun waktu antara tahun 1988-1992. Sebagian besar senyawa tersebut dihasilkan oleh berbagai spesies khususnya dari genus *Streptomyces*. Dilaporkan pula bahwa lebih dari 60% insektisida dan herbisida baru dalam 5 tahun terakhir ini ditemukan pada kelompok genus *Streptomyces* (Tanaka dan Omura 1993). Diperkirakan pula bahwa tiga perempat dari semua spesies *Streptomyces* spp mampu menghasilkan antibiotik seperti tertera pada Gambar 1.5.



Gambar 1.5. Metabolit yang berasal dari Actinobacteria

Hal yang menarik lainnya adalah bahwa Actinobacteria menghasilkan antibiotik dengan berbagai struktur kimiawi yang beragam seperti poliketida,  $\beta$ -laktam dan peptida. Selain itu berbagai metabolit sekunder lainnya memiliki aktifitas sebagai antifungi, antitumor dan immunosupresif (Behal, 2000). Metabolit sekunder yang paling banyak diperoleh dari Actinobacteria adalah dari kelompok antimikrobia.

Actinobacteria memainkan pula peranan yang penting dalam dekomposisi bahan organik seperti selulosa dan kitin. Aktivitas ini menambah cadangan hara di dalam tanah dan merupakan bagian penting dari pembentukan humus. Kemampuan Actinobacteria untuk hidup di lingkungan bernutrisi rendah dan menguraikan lignoselulosa (lignin dan selulosa, zat-zat penyusun kayu yang biasanya sukar diurai oleh kebanyakan bakteri tanah) menyebabkan Actinobacteria mendominasi habitat tanah, bahkan pada bebatuan kapur (karst). Hal ini terlihat pada tanah yang diberi pupuk kandang yang kaya selulosa akan meningkatkan populasi Actinobacteria di tanah. Sebaliknya pemberian pupuk seperti amonium atau nitrat yang terus-menerus justru dapat menekan populasi Actinobacteria. Kelompok Actinobacteria tidak menyukai pH dibawah 6 (suasana asam), namun pengapuran untuk menaikkan pH (suasana alkali) dapat menaikkan populasi Actinobacteria.

Perhatian besar yang ditujukan Actinobacteria pada aplikasi bioteknologi adalah produk alami dengan keragaman yang sangat tinggi dari mikrobia ini serta asosiasinya dengan lingkungan. Actinobacteria merupakan kelompok mikrobia yang memiliki keunikan diantara prokaritoid lainnya dalam hal perbedaan karakter morfologi, kultur, biokimia dan fisiologi.

### ❖ Antibiotik

Actinobacteria diketahui sebagai mikrobia penghasil antibiotik paling banyak. Bahkan dinyatakan bahwa produk utama Actinobacteria adalah antimikrobia yang dihasilkan paling dominan diantara genera Actinobacteria. Saat ini dua pertiga dari antibiotik diperoleh dari mikrobia ini. Antibiotik yang cukup penting dalam bidang pengobatan antara lain antrasiklin, aminoglikosida,  $\beta$ -laktam, kloramfenikol, makrolida, tetrasiklin, nukleosida, peptida dan polimer (Tabel 1.3).

Tabel 1.3. Kelompok utama antibiotik dan genera Actinobacteria penghasil antibiotik

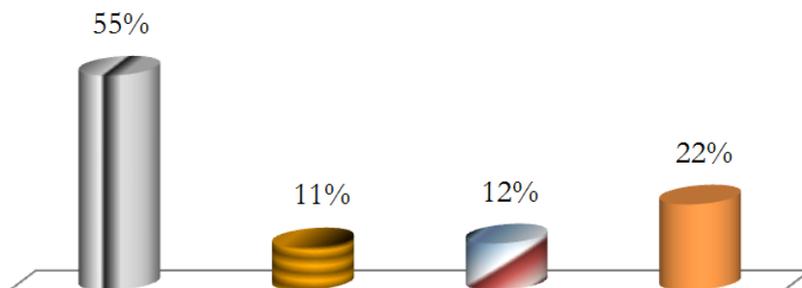
Kelompok kimiawi antibiotik	Actinobacteria penghasil
Aminoglikosida	<i>Streptomyces</i>
Makrolida dan Ansamakrolida	<i>Micromonospora</i>
Depsipeptida	<i>Actinoplanes</i>
Polieter ionofor	<i>Actinomadura</i>

Tabel 1.4. Senyawa alami non-antibiotik yang dihasilkan oleh Actinobacteria

Senyawa	Aktivitas biologis
Antrasiklin	Antitumor
Siklipostin	Inhibitor lipase
Higromisin	Imunosupresif
Piperastatin A	Inhibitor serin karboksipeptidase
Streptozotisin	Diabetogenik
Bafilomisin	Inhibitor ATP-ase mikrobial dan sel hewan
Valinomisin	Ionofor, toksik untuk prokariotik dan eukariotik

Besarnya usaha eksploitasi metabolit dari Actinobacteria khususnya kelompok *Streptomyces*, menyebabkan terjadinya penurunan penemuan senyawa baru dari kelompok mikrobial tersebut. Saat ini, pencarian senyawa baru difokuskan pada kelompok Actinobacteria yang bukan *Streptomyces* yang biasa disebut *rare Actinomycetes* seperti *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Actinosynnema* dan *Dactylosporangium*. Teknik biologi molekular dikembangkan untuk melakukan pencarian senyawa antimikrobial baru dari Actinobacteria.

■ *Streptomyces* ■ *Actinomycetes* lainnya ▽ Bakteri tak berfilamen ■ Fungi



Gambar 1.6. Sumber senyawa aktif dari kelompok mikrobial

## ❖ Enzim

Selama bertahun-tahun, Actinobacteria telah diketahui sebagai sumber penghasil antibiotik. Selanjutnya, diketahui bahwa ternyata Actinobacteria juga sebagai penghasil enzim yang sangat menjanjikan. Sejumlah besar enzim yang diperoleh dari Actinobacteria cukup telah diterapkan dalam proses bioteknologi seperti proses enzimatik dalam industri, kimia klinik dan terapi kesehatan (Tabel 1.5). Enzim-enzim tersebut cukup memuaskan karena memiliki stabilitas tinggi, aktif pada suhu tinggi dan tidak membutuhkan substrat spesifik.

Tabel 1.5. Kelompok enzim yang dihasilkan oleh Actinobacteria

Enzim	Aktivitas biologik	Jenis industri yang memanfaatkan	Mikrobia penghasil	Pustaka
Ligno-selulolitik	Hidrolisis lignin	Industri kertas	<i>Thermomonospora fusca</i> BD25	Tuncer <i>et al</i> , 1999
$\alpha$ -amilase	Pembuatan glukosa-maltosa	Industri makanan	<i>Streptomyces</i> spp	
Lipase	Penghilang lemak	Industri makanan dan laundry	<i>S. cinnamomeus</i>	Vishnu-priya <i>et al</i> , 2010
			<i>S. griseus</i>	
Protease	Degradasi protein	Industri tekstil	<i>S. lividan</i> TK 24	
Xilanase	Hidrolisis polisakarida non selulosa pada bubur kertas	Industri kertas dan pakan hewan	<i>S. galbus</i>	Kansoh <i>et al</i> , 2004
Xilosa isomerase	Konversi glukosa menjadi fruktosa	Industri makanan	<i>S. murinus</i>	Jørgensen <i>et al</i> , 1988
			<i>S. thermovulgaris</i>	

Kolesterol oksidase dari *Nocardia* dan *Streptomyces* telah digunakan dalam penentuan kolesterol serum darah. Kolin oksidase

dari *Streptomyces* digunakan dalam uji penentuan kadar pospolipid pada serum darah pasien. Protease yang dihasilkan oleh Actinobacteria telah banyak digunakan sebagai bahan tambahan pada deterjen atau digunakan dalam proses industri penyamakan kulit. Glukosa isomerase juga digunakan dalam industri untuk menghasilkan sirop fruktosa. Enzim-enzim bakteriolitik dan mikolitik dari Actinobacteria digunakan untuk penjernihan bir dan minuman anggur atau bertindak sebagai pengawet makanan yang tidak toksik.

#### ❖ Inhibitor enzim

*Leupreptin* yang dihasilkan oleh *Streptomyces* dapat menghambat papain, plasmin dan tripsin. *Antipain* menghambat papain, kimotripsin, tripsin, dan cathepsin B. Inhibitor enzim lainnya digunakan untuk pengobatan kanker misalnya *revistin*, suatu enzim yang dihasilkan oleh *Streptomyces* digunakan untuk menghambat transkriptase balik (*reverse transcriptase*). Hal yang sama ditunjukkan oleh enzim *streptonigrin* dan *retrostatin* yang dihasilkan oleh *Streptomyces* juga menghambat transkriptase balik. *Alistragin* yang dihasilkan oleh *S. roseoviridis* menghambat enzim karboksipeptidase.

#### ❖ Bioremediasi

Beberapa teknik telah diaplikasikan untuk membersihkan tanah-tanah yang terkontaminasi senyawa beracun. Dalam dekade terakhir bioremediasi telah diterima sebagai metode alternatif untuk menghilangkan polutan. Bioremediasi didefinisikan sebagai penggunaan mikrobial atau tanaman untuk mengurangi konsentrasi dan atau toksisitas berbagai senyawa kimia seperti turunan minyak bumi, pelarut industri, pestisida dan logam.

Pencemaran tanah dan air limbah akibat senyawa kimia seperti minyak bumi dan turunannya, pelarut, senyawa terklorinasi atau herbisida merupakan problema lingkungan di negara industri. Tanah dan air yang terkontaminasi oleh logam berat mempengaruhi struktur komunitas mikrobial baik secara kualitatif maupun kuantitatif mengakibatkan aktivitas metabolisme dan biomassa serta

keragaman menurun. Masalah yang timbul akibat polusi misalnya penyakit baik secara langsung atau melalui kontaminasi makanan.

Perhatian besar sekarang ditujukan pada proses remediasi oleh mikroba. Beberapa mikrobia mampu mendekomposisi atau mengubah senyawa kimia beracun/polutan menjadi senyawa yang kurang atau tidak beracun. Kajian menunjukkan bahwa tanah yang terkontaminasi logam berat ternyata ditemukan populasi mikrobia paling banyak dari kelompok Actinobacteria. Jumlah tersebut mencapai 56 - 86% dari semua bakteri yang diisolasi pada agar nutrisi (non-selektif). Dari jumlah itu, ditemukan hingga 95% menunjukkan karakter secara morfologis merupakan genus *Streptomyces*. Selain *Streptomyces*, juga ditemukan genera seperti *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Burkholderia* dan *Sphingopyxis* yang juga mungkin memainkan peran aktif dalam proses dekontaminasi.

#### ❖ Actinobacteria sebagai PGPR

Upaya untuk mengembangkan biokontrol (pengendali hayati) komersil dan produk pemacu pertumbuhan tanaman (PGPR) melalui pemanfaatan rizobakteri semakin giat dilakukan. Oleh karena itu sangat penting untuk memahami secara komprehensif kehadiran berbagai mikrobia yang membentuk populasi atau mikrobiota di sekitar perakaran tanaman. Untuk itu kajian mengenai interaksi antara jenis PGPR dan simbion tanaman inang secara spesifik bahkan dalam satu jenis tanaman budidaya terus digalakkan. Hal ini penting dilakukan agar rizobakteri yang diperoleh dapat digunakan untuk memacu pengaruh positif terhadap satu tanaman dan tidak mempengaruhi tanaman lain. Bahkan dapat juga digunakan untuk menghambat pertumbuhan tanaman lainnya yang tidak diinginkan seperti halnya gulma.

Meski sejarah *Streptomyces* telah terdokumentasi secara baik sebagai biokontrol, bukti awal menunjukkan bahwa kelompok mikrobia tersebut mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman. Meski demikian kajian terhadap spesies *Streptomyces* masih diperlukan untuk mengetahui secara detail potensinya sebagai PGPR. Hal ini cukup menjanjikan karena *Streptomyces* memiliki prosentase yang

melimpah dari mikroflora tanah, lebih efektif sebagai kolonisasi akar pada sistem perakaran tanaman. Selain itu kemampuannya untuk bertahan dalam kondisi lingkungan ekstrim melalui mekanisme pembentukan spora.

PGPR dapat mempengaruhi pertumbuhan tanaman dengan dua cara, baik secara langsung maupun tidak langsung. Pemacuan secara tidak langsung terjadi ketika PGPR mengurangi atau mencegah efek berbahaya dari satu atau lebih mikrobia merugikan. Hal ini terutama dilakukan melalui mekanisme biokontrol, atau antagonisme patogen tanaman. Secara khusus, kolonisasi atau biosintesis antibiotik serta adanya produksi metabolit sekunder lainnya dapat mencegah invasi patogen yang merugikan tanaman.

### ❖ Patogen Manusia

Actinobacteria tentu tidak semuanya menguntungkan manusia. Beberapa diantaranya justru merugikan manusia baik secara langsung maupun tidak. Secara langsung dengan menyebabkan penyakit pada manusia, sedangkan secara tidak langsung menimbulkan penyakit pada hewan atau tanaman budidaya manusia.

Berdasarkan literatur beberapa spesies dari genus *Streptomyces* yaitu *S. somaliensis* dikenal patogen manusia. Spesies tersebut menyebabkan actinomycetoma, yaitu infeksi kronis yang merusak dan infeksi progresif kulit, jaringan subkutan dan bahkan tulang. Penyakit ini endemik di iklim tropis dan subtropis seperti di Kenya, Mali (Mahe *et al.*, 1996), Arab Saudi (Bendl *et al.*, 1987), Somalia, India Selatan (Klokke *et al.*, 1968) dan Sudan. *Streptomyces* spp lainnya yang diisolasi dari manusia (Trujilo & Goodfellow, 2003; Mossad *et al.*, 1995; Unaogu & Gugnani 1990) termasuk *S. violaceoruber*, *S. coelicolor* Müller, *S. griseus*, *S. albus* dan *S. candidus* dari pasien streptotrichosis paru, karies gigi, darah, amandel, kulit, dahak dan tulang. *S. albus* telah dilaporkan sebagai penyebab alveolitis alergi (Dutkiewicz *et al.*, 2001).

Kelompok non-streptomycetes juga menyebabkan penyakit ini, terutama *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri*, *Nocardia otitidiscaviarum* dan *Nocardia transvalensis*. Bahkan penyakit kulit yang

biasa menginfeksi kulit terutama wajah (jerawat) disebabkan oleh *Propionibacterium acne*.

#### ❖ Patogen tanaman

Sampai saat ini, 12 spesies dianggap sangat mematikan bagi tanaman: *S. scabiei*, *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies*, *S. europascabiei*, *S. stelliscabiei*, *S. reticuliscabiei*, *S. caviscabies*, *S. luridiscabiei*, *S. puniscabiei*, *S. niveiscabiei* dan *S. cheleniumii*. Selanjutnya tujuh spesies telah diketahui kurang virulen pada kentang yaitu *S. aureofaciens*, *S. griseus*, *S. rochei*, *S. setonii*, *S. Tendae*, *S. venezuelae*.

Hampir semua riset ditujukan pada patogen tanaman oleh *Streptomyces* yang mengacu pada pembentukan keropeng tanaman kentang (*Solanum tuberosum*) karena dampak ekonominya yang signifikan. Perkiraan mendasar kerugian akibat penyakit ini di Tasmania saja lebih dari € 2.100.000 per tahun. Laporan pertama penyakit ini yang memaparkan bahwa *Oospora scabies* (dinamai ulang sebagai *S. scabiei* oleh Waksman & Henrici, 1943) sebagai organisme penyebab penyakit tersebut.

Meskipun penyakit ini memiliki dampak yang kecil pada hasil total panen, namun kualitas umbi yang terkena menurun, kandungan dan kualitas pati umbi juga menurun. Gejala penyakit kudis ini tergantung pada beberapa faktor lingkungan dan tanaman itu sendiri misalnya masa infeksi, tingkat pertumbuhan kentang, kultivar kentang, dan virulensi streptomycete yang menginfeksi.

Penyakit penting kedua yang berdampak ekonomi terjadi pada daerah beriklim hangat yang disebabkan oleh *S. ipomoea*. Mikrobial ini menyebabkan busuk tanah (juga disebut sebagai cacar) ubi jalar (*Ipomoea batatas*) dan menunjukkan dua gejala (i) tanaman kerdil dan pertumbuhan pohon anjing layu atau mati; sistem akar kurang berkembang, sebagian besar akar membusuk dan banyak yang mati (ii) ditemukan lubang atau rongga pada kentang matang kasar bergerigi atau tidak teratur.



# BAB II

## MORFOLOGI DAN ANATOM ACTINOBACTERIA

### A. Karakter Umum Actinobacteria

Bagi anda yang pernah punya pengalaman menumbuhkan atau mengisolasi mikrobia khususnya dari sampel tanah tetapi belum pernah melihat koloni Actinobacteria sebelumnya, maka boleh jadi anda keliru dan mengira kalau itu adalah koloni jamur/fungi. Koloni Actinobacteria yang tumbuh pada media agar, sepintas agak sulit membedakannya dengan koloni fungi. Hal itu wajar karena memang koloni kedua mikrobia tersebut memiliki kemiripan (Gambar 2.1 )



Gambar 2.1. Morfologi koloni Actinobacteria yang ditumbuhkan pada media *Starch Nitrate* agar. [Perhatikan perbedaan koloni Actinobacteria, tanda panah (A) dengan fungi, tanda panah (B)](Dok. penulis)

Awalnya Actinobacteria dinyatakan sebagai kelompok mikrobia yang memiliki sifat antara bakteri dan fungi. Bahkan bakteri ini pernah dimasukkan dalam klasifikasi *fungi* dengan nama *Actinomycoata*. Hal ini disebabkan oleh ada anggotanya yang membentuk berkas-berkas mirip *bifa* serta menghasilkan *antibiotik*.

Actinobacteria merupakan mikrobia yang memiliki karakter yang dimiliki oleh bakteri maupun fungi. Adanya dinding sel (peptidoglikan) pada Actinobacteria menunjukkan bahwa mikrobia tersebut memiliki ciri sebagai prokariotik, akan tetapi secara morfologi pembentukan filamen dan rantai konidia menunjukkan bahwa mikrobia tersebut memiliki ciri yang dekat dengan eukariotik.

Sifat bakteri ditunjukkan oleh hasil pengecatan sebagai Gram positif, sedangkan sifat fungi atau jamur ditunjukkan oleh pembentukan spora dan hifa yang bercabang-cabang membentuk miselium. Akan tetapi penelitian secara cermat terhadap komposisi kimia dan strukturnya (terutama DNA), menunjukkan bahwa Actinobacteria merupakan kelompok prokariotik dan ditempatkan dalam **Domain BACTERIA**. Menurut Bergy's Manual of Systematic Bacteriology (Ludwig *et al.*, 2011) Actinobacteria dimasukkan ke dalam filum Actinobacteria berdasarkan hasil analisis gen 16S rRNA.

Keterkaitan antara Actinobacteria dengan bakteri didasarkan pada karakter sebagai berikut:

1. Actinobacteria mirip dengan bakteri karena dalam struktur selnya memiliki peptidoglikan pada dinding selnya dan ada yang memiliki flagela yang mirip dengan flagela bakteri.
2. Selain itu Actinobacteria sensitif terhadap antibiotik antibakteri namun tidak terhadap antibiotik antifungi. Oleh karena sifatnya yang Gram positif, maka Actinobacteria juga sensitif terhadap lisozim (memecah ikatan  $\beta$  1,4-glikosida pada NAM dan NAG peptidoglikan).
3. Actinobacteria berbeda dengan fungi dalam hal komposisi selulernya seperti tidak memiliki kitin dan selulosa yang ditemukan pada dinding sel fungi.
4. Diameter filamen dan spora Actinobacteria lebih mirip dengan bakteri daripada jamur.
5. Banyak Actinobacteria bereproduksi dengan fragmen atau oidia yang memiliki bentuk dan ukuran yang sama dengan bakteri bentuk batang dan bulat.

6. Banyak Actinobacteria terutama yang bersifat patogen, tidak membentuk miselium udara, sehingga mirip dengan sifat pertumbuhan bakteri yang mengalami pleomorfisme terutama anggota genus *Corynebacterium*
7. Banyak Actinobacteria bersifat acid-fast (tahan-asam) yang secara morfologi dan fisiologi mirip dengan bakteri misalnya genus *Mycobacterium*. Kelompok tertentu dari Actinobacteria khususnya genus *Actinomyces* dan *Nocardia* sangat mirip dengan *Mycobacteria*.

Selanjutnya Actinobacteria memiliki kedekatan karakter dengan fungi terutama Fungi Imperfecti (Jamur Tak Sempurna) antara lain:

1. Tingkatan percabangan miselium udara pada beberapa kelompok Actinobacteria terutama genus *Streptomyces* dan *Micromonospora*, sangat mirip dengan jamur.
2. Pembentukan miselium udara dan konidia pada kebanyakan Actinobacteria memiliki tipikal yang mirip dengan fungi.
3. Pertumbuhan koloni pada permukaan media cair dan padat memiliki kemiripan dengan fungi dibandingkan dengan bakteri. Hal lain yang juga mirip dengan jamur yaitu tidak terbentuknya kekeruhan jika ditumbuhkan pada media cair.

## **B. Struktur Umum Actinobacteria**

Sebelum tahun 1940an, Actinobacteria telah menarik perhatian pada ilmuwan karena mikrobia ini menunjukkan adanya keragaman warna jika ditumbuhkan pada media. Selain itu mikrobia ini merupakan agen penyebab berbagai penyakit baik pada hewan, manusia maupun pada tumbuhan.

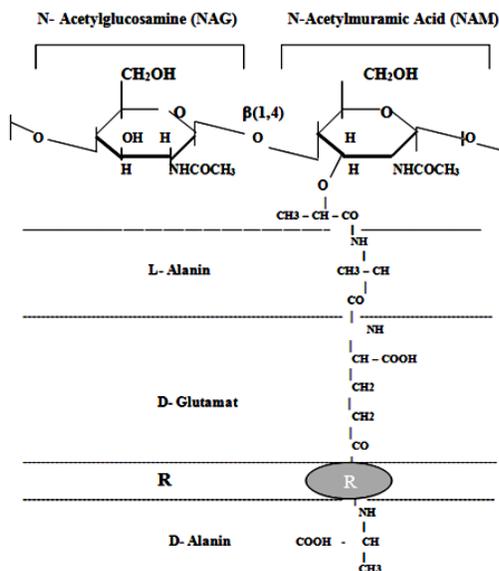
Mikrobia ini umumnya tumbuh membentuk filamen dibanding sebagai sel-sel tunggal. Actinobacteria yang tumbuh mampu menghasilkan filamen bercabang-cabang yang rumit dan disebut juga dengan *miselium*. Miselium tersebut dapat juga dinyatakan sebagai *miselium aerial/udara* karena tumbuh pada permukaan media. Sebaliknya yang tertancap masuk ke dalam

media disebut sebagai *miselium substrat*. Ukuran miselium umumnya memiliki diameter 0,5-1,0  $\mu\text{m}$ , dengan panjang yang tidak tentu, dan tidak memiliki sekat pada fase vegetatif (Madigan *et al.* 1997).

Sebagian besar Actinobacteria mampu menghasilkan spora seperti halnya fungi atau jamur. Spora Actinobacteria disebut eksospora, karena terbentuk tidak dari dalam sel serta memiliki dinding yang tidak terlalu tebal (Janse, 2005). Beberapa Actinobacteria seperti *Mycobacterium* sp, *Nocardia* sp tidak membentuk miselia dan tumbuh sebagai *pleomorfik*. Makna pleomorfik adalah bentuk varian atau bentuk sel bakteri yang tidak lazim dari sel normalnya yang mungkin disebabkan oleh pengaruh faktor luar (faktor lingkungan). Hal ini biasa terjadi pada biakan murni (kultur isolat tunggal) ditemukan berbagai bentuk seperti batang panjang, batang gemuk atau menyerupai hifa (*pseudohypae*) pada biakan yang berumur tua. Beberapa Actinobacteria tidak membentuk spora secara langsung pada miselium udara, tapi justru membentuk sporangia. Anggota genus *Streptomyces* memiliki miselium permanen; miselium udaranya seringkali berkembang dengan baik dan mengandung hifa udara (sporofor).

## 1. Dinding sel

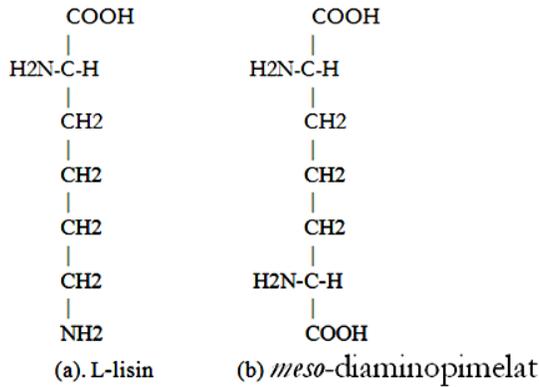
Dinding sel merupakan salah satu komponen sel prokariotik yang sangat penting karena menentukan bentuk dan kekuatan sel. Selain itu juga berperan menjaga sel agar tidak lisis (pecah) akibat tekanan osmotik, mencegah sel dari substansi atau senyawa toksik serta berfungsi dalam pembelahan sel, pertumbuhan dan komunikasi antar sel. Dinding sel mempunyai komponen struktural terbesar yang disebut: *Peptidoglikan*, kadang-kadang dinamakan *murein*.



Gambar 2.2. Struktur umum peptidoglikan (R = variasi asam amino)

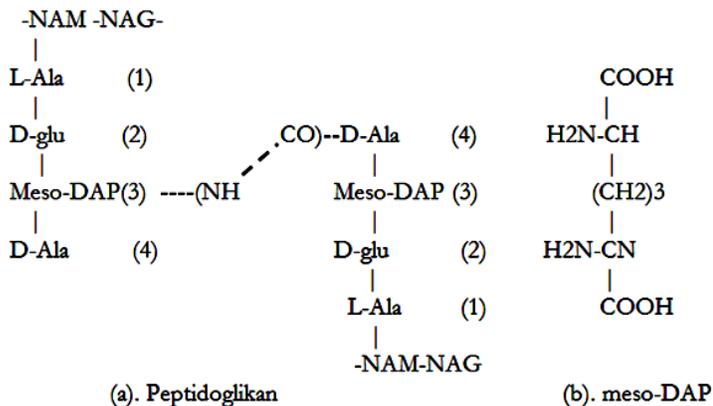
Peptidoglikan merupakan polimer yang tersusun menyerupai jaring dengan subunit yang identik. Polimer tersebut mengandung dua derivat gula yaitu asam *N-asetilglukosamin* (NAG) dan asam *N-asetilmuramat* (NAM) serta beberapa asam amino yang berbeda. Kedua macam ikatan peptidoglikan, yaitu ikatan glikosida pada NAG-NAM dan ikatan peptida pada rantai tetrapeptida menyebabkan suatu bentuk anyaman jala (mata jala molekuler) yang kuat dari dinding sel, sehingga dapat menahan tekanan dari luar. Secara umum, komposisi subunit peptidoglikan dapat dilihat pada Gambar 2.2.

Selanjutnya tiga jenis asam amino yang menyusun rantai peptida pada peptidoglikan tersebut yaitu *D-asam glutamat*, *D-alanin* dan asam *meso*-diaminopimelat yang terhubung pada gugus karbonil dari NAM. Meski demikian, banyak bakteri mengganti *meso*-diaminopimelat dengan asam diamino lainnya dan biasanya adalah L-lisin (Gambar 2.3).



Gambar 2.3. Asam diamino pada peptidoglikan

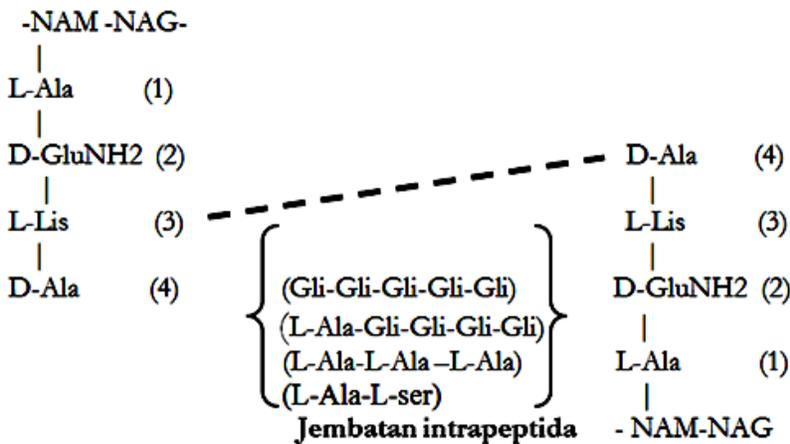
Sangatlah menarik bahwa ketiga asam amino yang terlibat dalam jalinan–silang peptidoglikan memiliki konfigurasi D-isomer. Padahal pada umumnya protein hanya terdiri atas asam amino L, maka penyimpangan dari keadaan normal inilah merupakan sifat sel prokariotik yang tidak lazim. Keberadaan asam amino konfigurasi D tersebut justru memiliki keuntungan karena sel terhindar dari degradasi enzim peptidase, yang hanya mengenali residu asam amino L-isomer.



Gambar 2.4. Tipe peptidoglikan pada beberapa bakteri.

Keterangan :Catatan (NAM=asam N-asetilmuramat; NAG= asam N-asetilglukosamin; L-Ala= L-Alanin; D-glu= asam glutamat; Meso-DAP= *meso*-diaminopimelat). Angka dalam kurung (x) menunjukkan posisi asam amino dari rantai samping peptidoglikan

Struktur peptidoglikan memiliki variasi diantara kelompok bakteri gram positif. Banyak bakteri gram positif (hampir semua gram negatif) mempunyai struktur peptidoglikan dalam mana asam *meso*-diaminopimelat pada posisi 3 secara langsung berikatan dengan gugus amino bebasnya dengan karboksil bebas dari ujung D-alanin pada rantai peptida (Gambar 2.4).



Gambar 2.5. Variasi asam amino pada jembatan intrapeptida pada peptidoglikan.

Keterangan : (NAM=asam N-asetilmuramat; NAG= asam N-asetilglukosamin; L-Ala= L-Alanin; D-GluNH2= asam glutamat; L-Lis= L-Lisin; Gli=Glisin;L-ser= L-Serin). Angka dalam kurung (x) menunjukkan posisi asam amino dari rantai samping peptidoglikan, angka dalam kurung krawal {} menunjukkan beberapa variasi asam amino yang menyusun jembatan intrapeptida

Tipe lainnya adalah Lisin yang menggantikan asam DAP pada posisi 3, dan subunit peptida dari rantai glikan berikatan silang melalui jembatan intrapeptida yang mengandung asam L-amino monokarboksilat atau glisin atau keduanya (Gambar 2.5). Tipe ini

dapat ditemukan pada genus *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, dan *Micrococcus*.

## 2. Dinding sel bakteri dan Actinobacteria

Kemiripan Actinobacteria dengan bakteri karena dalam struktur selnya memiliki peptidoglikan pada dinding selnya dan ada yang memiliki flagela yang mirip dengan flagela bakteri. Selain itu Actinobacteria sensitif terhadap antibiotik antibakteri namun tidak terhadap antibiotik antifungi. Karena sifatnya yang Gram positif, maka Actinobacteria juga sensitif terhadap *lisozim*, suatu enzim yang memutuskan ikatan  $\beta$ -1,4 glikosida pada kedua gula amino (NAG dan HAM) peptidoglikan dinding sel bakteri. Actinobacteria berbeda dengan fungi dalam hal komposisi selulernya seperti tidak memiliki kitin dan selulosa yang ditemukan pada dinding sel fungi.

Actinobacteria memiliki dinding sel yang cukup variatif yang membedakannya dengan kelompok lainnya. Bahkan perbedaan tersebut digunakan sebagai salah satu faktor penting dalam taksonomi. Ada empat tipe utama dari dinding sel Actinobacteria yang dapat dibedakan berdasarkan komposisi dan struktur peptidoglikan, yaitu asam amino pada posisi 3 rantai samping tetrapeptida, adanya glisin pada jembatan interpeptida serta kandungan gula-gula peptidoglikan.

Tabel 2.1. Pola-pola gula sel utuh Actinobacteria

Tipe-tipe pola gula <sup>a</sup>	Gula-gula karakteristik	Contoh Genus
A	Arabinosa, galaktosa	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i>
B	Madurosa <sup>b</sup>	<i>Actinomadura</i> , <i>Streptosporangium</i>
C	Tidak ada	<i>Thermonospora</i> , <i>Geodermatophilus</i>
D	Arabinosa, Xilosa	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i>

<sup>a</sup>Pola-pola gula tersebut hanya ada pada dinding sel tipe II-IV.

<sup>b</sup>Madurosa adalah 3-O-metil-D-galaktosa

Bahkan sel yang memiliki tipe II, III dan IV pun menunjukkan gula-gula khas yang dapat dijadikan sebagai ciri/karakter dalam proses identifikasi (lihat Tabel 2.1. Pola-pola gula sel utuh Actinobacteria).

Tipe peptidoglikan seperti pada Gambar 2.4, dapat ditemukan pada genus *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* (tiga genus terakhir merupakan kelompok Actinobacteria). Pada genus *Streptomyces* dan beberapa kelompok Actinobacteria lainnya, posisi *meso*-diaminopimelat pada posisi 3 diganti dengan L- *meso*-diaminopimelat dan satu residu glisin yang bertindak sebagai jembatan intrapeptida.

Actinobacteria dapat dikelompokkan ke dalam genera yang berbeda berdasarkan sifat morfologi, fisika dan kimia. Actinobacteria memiliki tipe dinding sel I – IV, tergantung pada adanya L-diaminopimelic acid (DAP) dan glisin (type I), *meso*-DAP dan glisin (type II), *meso*-DAP (type III), atau *meso*-DAP, arabinosadan galaktosae (Type IV) seperti tertera pada Tabel 2.2 (Goodfellow, 1989).

Tabel 2.2. Tipe-tipe dinding sel Actinobacteria

Tipe dinding sel	Isomer asam Diaminopimelat	Glisin pada jembatan interpeptida	Gula-gula	Contoh Genus
I	L,L	+	NA <sup>a</sup>	<i>Streptomyces</i>
II	Meso	+	NA	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i>
III	Meso	-	NA	<i>Actinomadura</i> , <i>Frankia</i>
IV	meso	-	Arabino sa, galaktos a	<i>Nocardia</i> , <i>Saccharomonospor a</i>

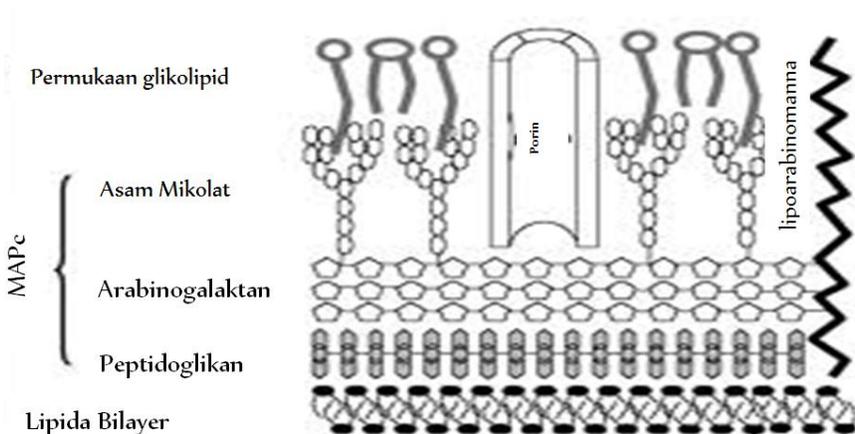
<sup>a</sup>NA, tidak terdeteksi

Genus *Streptomyces* diketahui secara umum memiliki dinding sel tipe I. *Micromonospora* dan *Actinoplanes* tipe II, *Thermoactinobacteria*, *Microtetraspora*, *Actinomadura* dan *Frankia* merupakan genera tipe III. Dinding sel tipe IV terdiri atas dua familia yang memiliki asam mikolat (*Mycobacteriaceae*) dan tanpa asam mikolat (*Pseudonocardiaceae*). Genera dari Familia *Pseudonocardiaceae* antara lain

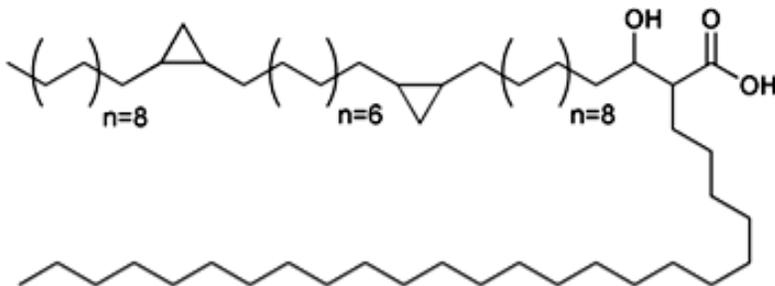
*Amycolatopsis*, *Amycolata*, *Pseudocardia*, *Saccharomonospora*, dan *Saccharopolyspora* (Euverink, 1999).

### Asam mikolat

Selain peptidoglikan, senyawa lain yang menyusun dinding sel Actinobacteria adalah asam mikolat. Asam mikolat merupakan asam lemak rantai panjang yang ditemukan secara eksklusif di dalam dinding sel bakteri taksa yang disebut mikolata (lihat Gambar 2.6). Asam mikolat ditemukan pada genus *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Skermania*, and *Tsukamurella*.



Gambar 2.6. Diagram komponen penyusun dinding sel mikolata



Gambar 2.7. Tipikal asam mikolata *M. tuberculosis*.

Asam mikolat merupakan asam lemak berantai panjang yang dihubungkan dengan arabinogalaktan oleh ikatan glikolipid dan dengan peptidoglikan oleh jembatan fosfodiester (Gambar 2.7). Asam mikolat tersusun atas rantai  $\beta$ -hidroksi yang lebih pendek dengan rantai samping  $\alpha$ -alkil. Setiap molekul tersusun antara 60 sampai 90 atom karbon (C60 – C90). Jumlah yang sebenarnya dari karbon bervariasi berdasarkan spesies.

Meskipun namanya asam mikolat, namun hal ini tidak berkaitan dengan fungi atau jamur. Unsur lain yang terdapat pada dinding sel bakteri kelompok mikolata tersebut adalah polisakarida seperti arabinogalaktan dan arabinomanan. Struktur dinding sel yang kompleks tersebut menyebabkan bakteri seperti *M. tuberculosis* bersifat tahan asam, yaitu apabila sekali diwarnai akan tetap tahan terhadap upaya penghilangan zat warna tersebut dengan larutan asam-alkohol.

Anggota mikolata diketahui menunjukkan kedekatan jika dilakukan analisis secara kemotaksonomi, sistematika molekular dan taksonomi numerik. Banyak karakter kemotaksonomi yang berkontribusi penting terhadap definisi takson ini yang berkaitan dengan komposisi selubung selnya termasuk keberadaan dan ukuran asam mikolat. Anggota genus *Rhodococcus* sebagai contoh, mensintesis asam mikolat yang mengandung 30-54 karbon, sedangkan *Corynebacteria* memiliki 22-38 karbon dan *Mycobacterium* 60-90 karbon.

### 3. Asam lemak

Analisis lemak telah digunakan secara luas dalam sistematika bakteri dan memberi informasi yang sangat banyak dan berguna untuk klasifikasi dan identifikasi Actinobacteria. Fokus paling utama adalah analisis asam lemak rantai panjang, kuinon isoprenoid dan posfolipida. Analisis yang dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa Actinobacteria tipe dinding sel IV mengandung terutama iso dan anteiso-metil asam lemak bercabang. Menakuinon

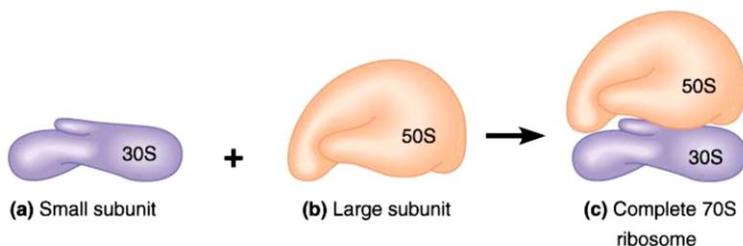
tetrahidrogenasi, dengan 8 atau 9 unit isoprena dan berbagai posfolipida.

Komposisi asam lemak membran bakteri dapat dipengaruhi oleh suhu, sehingga perubahan yang sangat sedikit, menyebabkan sulit untuk memprediksi dan tidak tampak secara jelas pada semua strain. Kajian saat ini menunjukkan bahwa komposisi asam lemak *Saccharopolyspora hirsuta* tidak dipengaruhi secara nyata oleh suhu inkubasi. Sebaliknya, pertumbuhan *Saccharomonospora caesia* pada 45°C menunjukkan bahwa produksi asam lemak rantai jenuh lebih tinggi pada dibandingkan senyawa mono tak jenuh pada suhu 30°C.

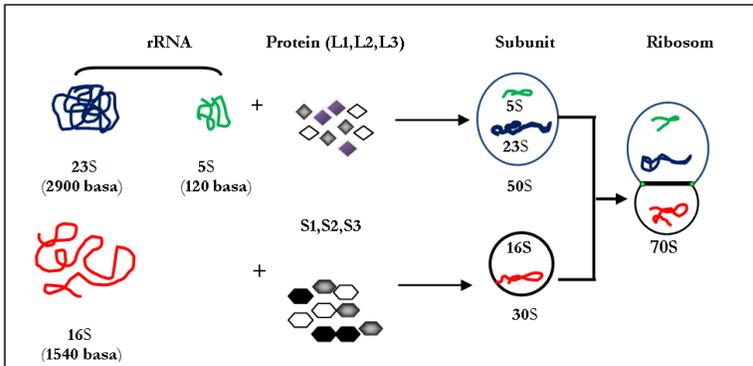
Anggota genus *Streptomyces* memiliki asam lemak rantai lurus dan rantai bercabang dengan panjang rantai karbon dari 14 - 18 atom. Beberapa spesies juga memiliki ester metil terhidroksilasi. Analisis asam lemak telah digunakan untuk membedakan diantara genera bakteri. Hal ini juga telah digunakan dalam memisahkan kelompok spesies pada *Bacterioides* dan penentuan strain *Corynebacterium*.

#### 4. Ribosom

Ribosom merupakan suatu partikel ribonukleo-protein subsel berupa kompleks RNA dan protein yang berfungsi sebagai tempat sintesis protein seluler. Bentuknya bulat dengan diameter 17-23 nm (Gambar 2.7). Bila ribosom prokariotik disentrifugasi, maka akan diperoleh koefisien sedimentasi 70S (S, unit Svedberg) yang terdiri atas dua subunit yaitu 50S dan 30S (Gambar 2.8). Hal ini berbeda dengan koefisien sedimentasi eukariotik yaitu 80S yang terdiri atas subunit 60S dan 40S.

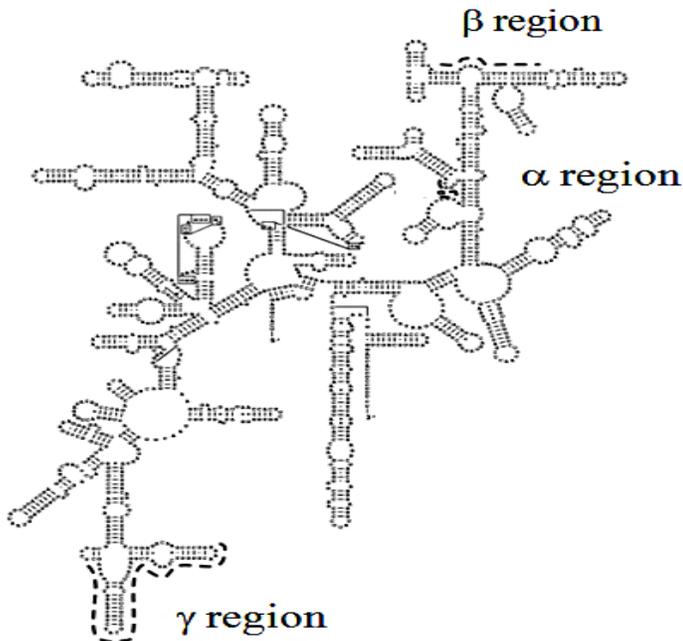


Gambar 2.7. Struktur ribosom dan sub-sub unitnya



Gambar 2.8. Subunit ribosom prokariotik (Lehninger, 1993)

Pada prokariotik terdapat tiga jenis RNA ribosomal, yaitu 5S, 16S, dan 23S rRNA. Di antara ketiganya, 16S rRNA yang paling sering digunakan sebagai penanda molekuler. Gen 16S rRNA merupakan pilihan karena gen ini terdapat pada semua prokariota dan fungsi yang identik pada seluruh organisme serta memiliki bagian atau sekuen konservatif dan sekuen lainnya yang sangat bervariasi (Madigan *et al.* 1997), lihat Gambar 2.9. Molekul 5S rRNA memiliki urutan nukleotida terlalu pendek, sehingga tidak ideal dari segi analisis statistika dan mengandung informasi yang kurang representatif. Selanjutnya molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang sehingga menyulitkan dalam praktek dan analisis.



Gambar 2.9. Struktur sekunder gen 16S rDNA *Streptomyces coelicolor*. Lokasi yang digunakan untuk menentukan kelompok *Streptomyces* ditandai dengan ( $\alpha$ ,  $\beta$  dan  $\gamma$ )

Penggunaan gen 16S rRNA telah digunakan sebagai parameter sistematik molekular yang universal, representatif, dan praktis untuk mengkonstruksi kekerabatan filogenetik pada tingkat spesies (Woese *et al.* 1990).

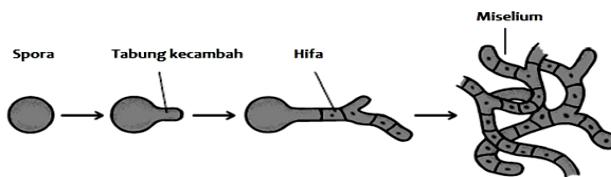
## C. PERTUMBUHAN ACTINOBACTERIA

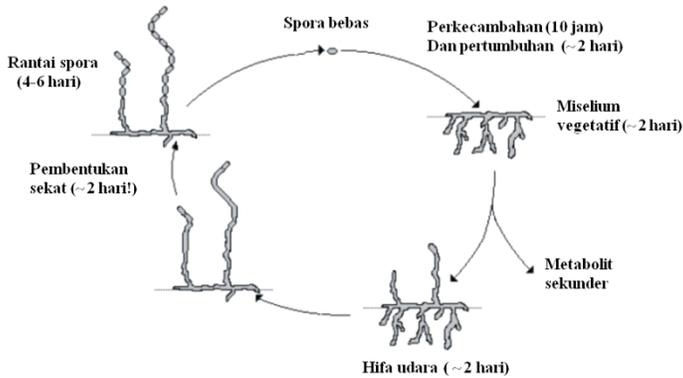
### 1. Mekanisme pembentukan hifa

Perbedaan seluler Actinobacteria dengan bakteri uniselular lainnya tampak dalam pertumbuhan, pembesaran dan pembelahan selnya. Hifa vegetatif tumbuh memanjang berupa kumpulan filamen bercabang-cabang tetapi tanpa mengalami pembelahan sel, hanya genom saja yang mengalami pembelahan sehingga hasilnya adalah sel panjang dengan *multiple copy genom* (Paradkar *et al.*, 2003)

Siklus hidup Actinobacteria menunjukkan dua fase yang berbeda (i) fase pembentukan miselium vegetatif (ii) fase sporulasi. Proses sporulasi dimulai ketika kondisi lingkungan kurang menguntungkan atau kekurangan nutrisi. Siklus hidup Actinobacteria dimulai dengan proses germinasi atau perkecambahan suatu spora. Spora yang berkecambah akan membentuk hifa yang bercabang-cabang atau membentuk jalinan yang disebut *miselium* (Gambar 2.10). Hifa biasanya dipisahkan oleh sekat yang disebut *septa* yang membagi hifa menjadi sel-sel panjang (20µm atau lebih) yang mengandung beberapa nukleoid. Pemanjangan dan pembentukan cabang-cabang filamen pada permukaan media membentuk hifa yang disebut *hifa aerial* atau *miselium aerial* (miselium udara), sedangkan yang menerobos masuk ke dalam media kultur membentuk hifa yang disebut *miselium vegetatif* atau *miselium substrat*. Miselium substrat melakukan penetrasi ke dalam media berfungsi untuk mengambil nutrisi dengan menggunakan enzim-enzim hidrolitik ekstraseluler. Pertumbuhan hifa merupakan proses yang sangat kompleks yaitu bahan pembentuk dinding hifa dibawa ke ujung melalui tekanan turgor oleh cairan intraseluler.

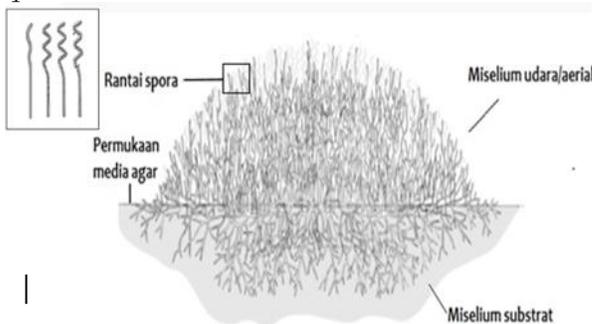
Pertumbuhan hifa ini mengikuti kinetika pertumbuhan secara eksponensial.





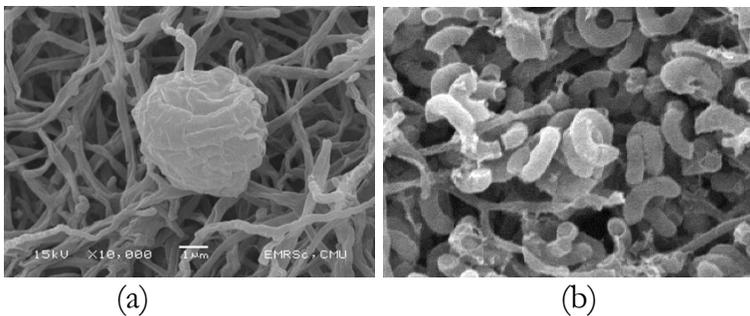
Gambar 2.10. Daur hidup *Streptomyces* sp. Spora tunggal yang berasal dari miselium vegetatif mengalami proses perkecambahan lalu diikuti dengan pertumbuhan hifa aerial. Hifa ini selanjutnya mengalami proses penyekatan lalu akhirnya membentuk rantai spora untuk akhirnya mengalami siklus baru kembali (Kieser *et al*, 2000)

Actinobacteria membentuk miselium udara yang ukurannya lebih ramping dibandingkan dengan fungi dan kebanyakan spesies menghasilkan spora aseksual. Miselium udara selanjutnya membentuk spora berdinding tipis melalui proses pembentukan sekat-sekat hifa yang nantinya akan terbentuk menjadi *rantai spora* (Gambar 2.11). Spora yang terbentuk pada miselium udara (tepatnya ujung hifa udara) disebut *konidia* (tunggal: *konidium*) atau *konidiospora*.



Gambar 2.11. Penampang melintang pertumbuhan Actinobacteria pada media agar

Spora tersebut dinamakan *eksospora* karena proses pembentukannya tidak di dalam sel induk seperti halnya endospora pada *Bacillus* dan *Clostridium*. Jika spora-spora tersebut terbentuk (berada) di dalam sporangium (jamak: *sporangia*, semacam kantung), maka spora disebut *sporangiospora* (Gambar 2.12). Bentuk dan susunan sporangiospora dapat digunakan untuk identifikasi taksa Actinobacteria. Oleh karena itu koloni Actinobacteria yang tampak lebih kasar dan seperti tepung disebabkan oleh pembentukan spora aseksual atau konidia. Meski demikian, tidak semua kelompok Actinobacteria membentuk spora, misalnya ditemukan pada genus *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, dan *Dietzia*.

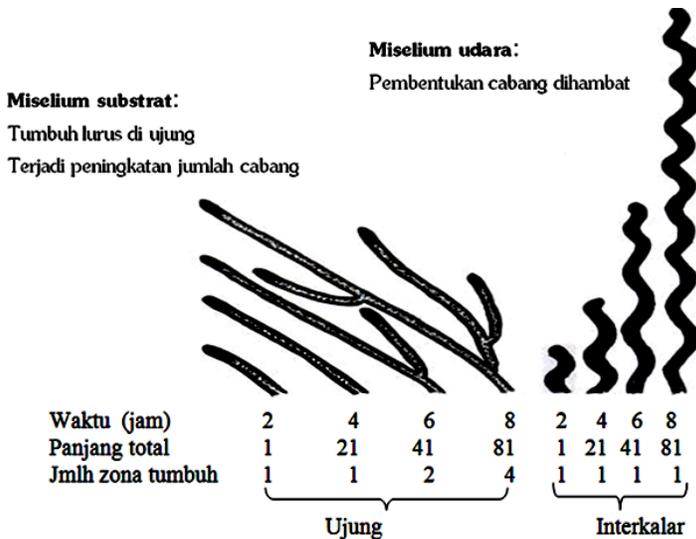


Gambar 2.12. (a).Sporangium, hifa membentuk kantung pada *Spirillospora*, (b). Konidiospora atau konidia, ujung hifa bersekat-sekat membentuk rantai spora pada *Streptomyces* sp.GMR22 (Dok. Penulis)

Proses pertumbuhan hifa pada Actinobacteria menunjukkan adanya perbedaan antara hifa yang tumbuh pada substrat (*miselium substrat*) dengan hifa udara (*miselium udara*) seperti terlihat pada Gambar 2.13. Perbedaan ini dapat dibagi atas dua model pertumbuhan hifa yaitu: pertumbuhan hifa utama yang diikuti pembentukan cabang hifa seiring dengan bertambah panjangnya hifa utama. Cabang hifa utama akan membentuk hifa cabang lagi sehingga menghasilkan percabangan yang banyak. Model pertumbuhan hifa ini akan menghasilkan pertumbuhan eksponensial hifa karena adanya peningkatan panjang hifa menjadi dua kali lipat. Model pertumbuhan hifa ini menguntungkan karena

fungsi dari miselium vegetatif atau substrat yang harus mencari sumber nutrisi untuk menunjang pertumbuhan mikrobial yang bersangkutan. Model ini akan meningkatkan zona pertumbuhan miselium secara cepat layaknya pertumbuhan akar tanaman pada tumbuhan untuk mencari sumber nutrisi.

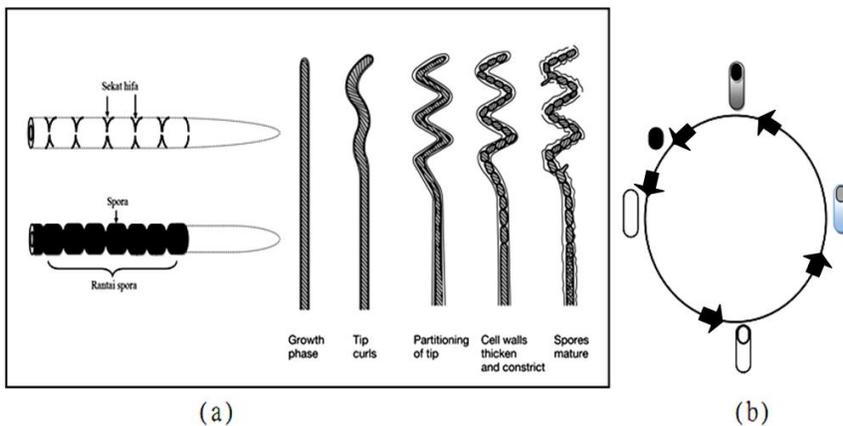
Model pertumbuhan lainnya yaitu hifa utama tumbuh memanjang tanpa disertai dengan pertumbuhan cabang hifa. Model ini biasanya ditemukan pada miselium udara. Pertumbuhan hifa terus memanjang seiring dengan bertambahnya waktu. Akibatnya, hifa yang mengalami penuaan dan akhirnya membentuk sekat-sekat pada ujung hifa yang selanjutnya akan menjadi rantai spora sebagai alat perkembangbiakan secara aseksual (konidia).



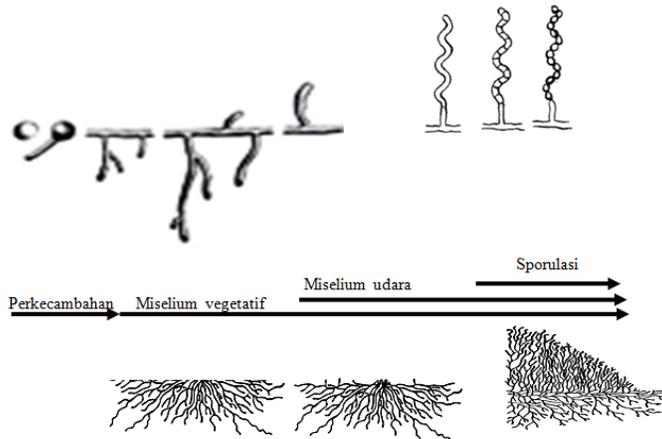
Gambar 2.13. Model pertumbuhan hifa pada Actinobacteria

Seperti pada bakteri lainnya, maka Actinobacteria membentuk spora sebagai respon terhadap kondisi lingkungan yang mulai kekurangan nutrisi. Akan tetapi sebagian besar spora Actinobacteria bukan untuk perlindungan terhadap suhu tinggi, namun lebih difungsikan sebagai tanggapan terhadap kekeringan untuk proses adaptif. Berbeda dengan endospora bakteri, maka struktur spora pada Actinobacteria merupakan bagian dari proses

reproduksi. Proses perkembangan filamen untuk pembentukan spora Actinobacteria tidak serumit dibandingkan dengan pembentukan endospora bakteri. Proses ini sangat sederhana yaitu pembagian filamen menjadi sekat-sekat yang masing-masing berisi kromosom (Gambar 2.14). Selanjutnya terjadi diferensiasi menjadi spora yang matang. Selama proses ini, maka dinding sel mengalami pengkerutan dan menyebabkan sitoplasma ke keadaan yang tidak aktif sehingga spora menjadi lebih tahan terhadap suhu tinggi dan bahan kimia meski tidak lebih resisten dibanding dengan endospora.



Gambar 2.14. Skema tahapan pembentukan spora (konidia) dari *Streptomyces*, yaitu terjadinya perubahan pada hifa melalui pembentukan sekat-sekat yang akan menjadi rantai spora (a), dan *Bacillus* sp (b)

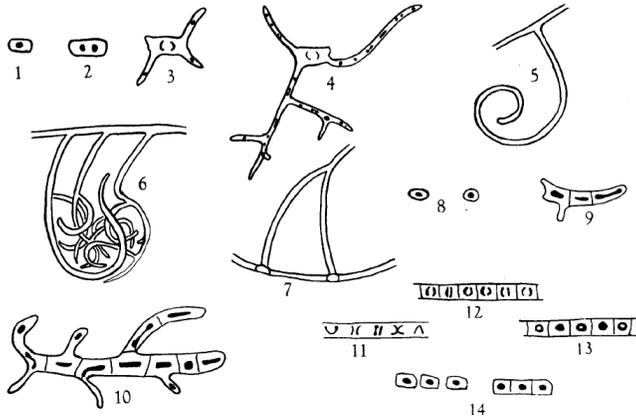


Gambar 2.15. Mekanisme pembentukan rantai spora

Spora Actinobacteria mampu bertahan dalam jangka waktu yang lama (selama bertahun-tahun) dan dapat berkecambah kembali menjadi sel vegetatif jika kondisi lingkungan memungkinkan untuk tumbuh. Banyak genera yang berbeda mampu membentuk spora jenis ini dan kemampuan membentuk struktur ini tampaknya tidak berkorelasi dengan kelompok mikrobial lainnya.

## 2. Mekanisme Pembentukan Rantai Spora Actinobacteria

Jika miselium primer telah mencapai tahap atau stadium tertentu dalam proses pertumbuhan, maka hifa akan membentuk gelendong, anyaman dan gulungan (Gambar 2.16).



Gambar 2.16. Mekanisme pembentukan rantai spora pada Actinobacteria

**Keterangan:** 1. Spora, 2. Perkecambahan spora (jenis *A. gardneri*), 3. Pembentukan tiga tabung perkecambahan, 4. Miselium primer, spora masih tampak (Septa tidak dicantumkan), 5, 6. Pembentukan filamen sarang (Septa dan struktur inti tidak dicantumkan), 7. Munculnya sel-sel pemula (Septa dan struktur inti tidak dicantumkan), 8. Sel-sel pemula. 9, 10. Miselium sekunder muda, 11. Silinder inti hifa sekunder terpisah ke dalam kromosom, 12. Pasangan 'kromosom' membentuk inti spora, 13. Spora baru yang terbentuk masih bersambung antara satu dengan lainnya, 14. Spora matang.

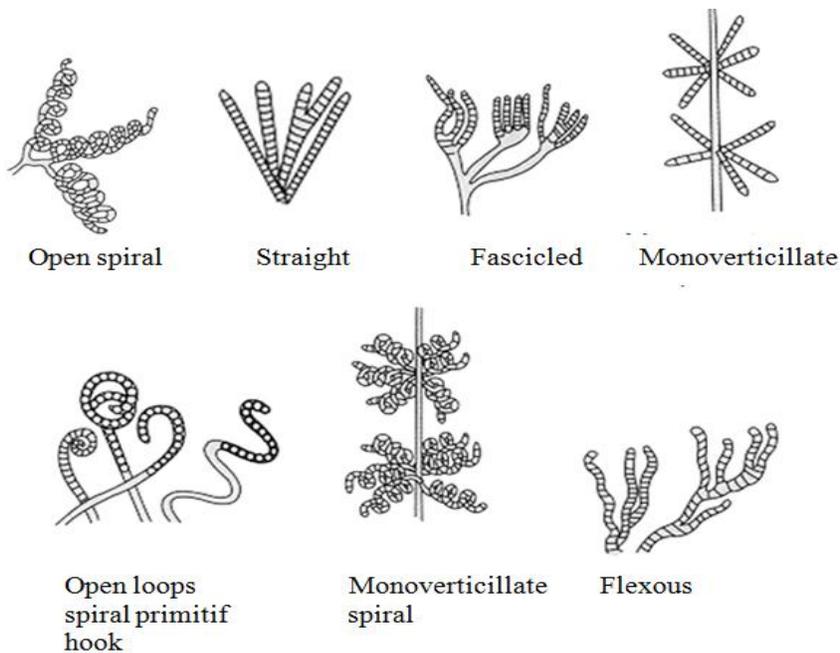
Pada kasus seperti spesies *A. gardneri*, tampak anyaman bersifat kompak dan menyerupai sarang burung, dan yang lainnya membentuk gulungan dan percabangan. Bila *A.gardnerii* ditumbuhkan pada media yang merangsang pembentukan spora, maka anyaman-anyamana filamen akan mulai terbentuk pada hari kedua masa pertumbuhan dan mulai tampak jika diamati dibawah mikroskop meski dengan perbesaran rendah.

Beberapa ciri yang dapat dijadikan sebagai karakter dalam taksonomi adalah morfologi dan warna miselium serta sporangia, yaitu konfigurasi dan susunan rantai, ornamen permukaan spora, persen kandungan G+C pada DNA, komposisi pospolipid membran sel serta resistensi spora terhadap panas. Konfigurasi rantai spora dan ornamen spora ditentukan dengan pengamatan

menggunakan mikroskop elektron (SEM) antara lain: *straight*, *flexuous*, *spirales* dan *verticillate*, seperti terlihat pada Gambar 2.17).

Ornamen spora dibedakan atas: *smooth* (permukaan spora tampak halus), *spiny* (permukaan spora tampak berduri), *rugose* (permukaan spora tampak seperti bopeng-bopeng atau berceruk) dan *hairy* (permukaan spora tampak seperti berambut) seperti terlihat pada Gambar 2.18.

Kadang-kadang penentuan antar ornamen yang satu dengan yang lainnya sulit jika pembentukan spora belum matang atau karena terjadinya variabilitas strain. Meski media yang digunakan cukup bagus, beberapa kasus menyebabkan kegagalan strain melakukan proses sporulasi. Oleh karena itu dibutuhkan waktu inkubasi selama 2 hingga 4 minggu bahkan lebih untuk melihat pembentukan rantai spora terutama pada genus-genus tertentu yang sulit membentuk spora dalam waktu singkat.



Gambar 2.17. Konfigurasi konidiospora atau rantai spora



Gambar 2.18. Ornamen permukaan rantai spora pada *Streptomyces*

Berbeda dengan filamen fungi yang biasanya memiliki ukuran hifa yang lebih besar dibanding hifa dari Actinobacteria seperti *Streptomyces*. Sebagai kelompok eukariotik, maka fungi memiliki struktur internal lebih kompleks misalnya sitoskeleton, organel dan membrannya yang berbeda dengan Actinobacteria.

Terlepas dari semua perbedaan ini, maka fungi dan Actinobacteria memiliki kesamaan morfologi sebagai organisme berfilamen. Sementara itu secara umum dapat diterima bahwa tekanan turgor memiliki pengaruh dominan sebagai kekuatan pendorong utama pada pertumbuhan hifa Actinobacteria. Akan tetapi perannya dalam pertumbuhan jamur masih menjadi topik perdebatan (Money, 1997)



# BAB III

## METABOLISME DAN METABOLIT ACTINOBACTERIA

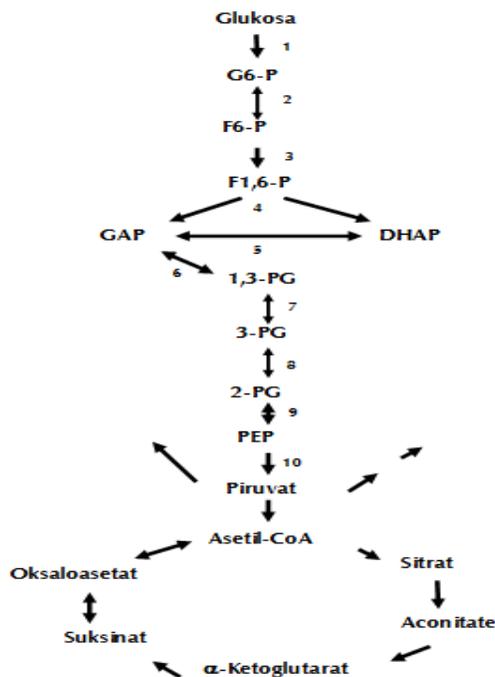
### A. Pengertian metabolisme

Metabolisme merupakan serangkaian reaksi biokimia yang terjadi dalam organisme hidup untuk mempertahankan hidupnya. Melalui proses ini, maka organisme memungkinkan untuk tumbuh dan bereproduksi, menjaga struktur sel, dan merespon pengaruh lingkungan. Metabolisme biasanya dibagi menjadi dua kategori yaitu *Katabolisme* dan *Anabolisme*. Katabolisme memecah bahan organik, untuk mendapatkan energi dalam proses respirasi selular. Anabolisme, menggunakan energi untuk membangun komponen sel seperti protein dan asam nukleat. Proses ini dimungkinkan berlangsung karena adanya peranan enzim untuk menggerakkan reaksi yang diperlukan. Enzim bertindak sebagai katalis reaksi-reaksi kimiawi dengan cepat dan efisien. Enzim juga memungkinkan pengaturan jalur metabolik dalam menanggapi perubahan lingkungan sel atau sinyal sel lain.

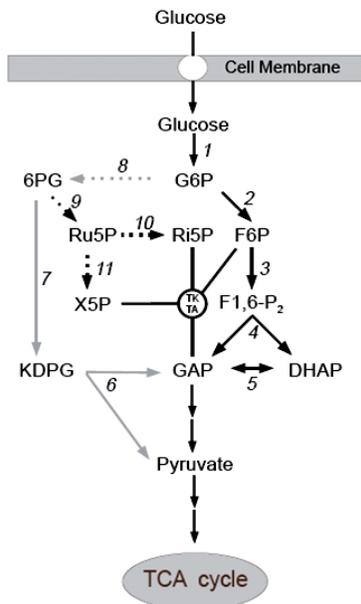
Keseluruhan rangkaian proses yang terlibat dalam sintesis serta menggunakan senyawa-senyawa karbohidrat, protein, lemak, vitamin disebut **metabolisme primer**. Senyawa yang dihasilkan pada proses tersebut termasuk dalam golongan *metabolit primer*. Selain metabolisme primer juga terdapat suatu metabolisme lain yang terjadi hanya pada spesies tertentu. Metabolisme ini menghasilkan produk-produk yang tidak biasa (berlainan) tergantung spesiesnya. Oleh karena metabolisme ini bersifat tidak esensial bagi kehidupan organisme, sehingga dinamakan **metabolisme sekunder**. Produk

metabolit sekunder menghasilkan senyawa yang disebut *metabolit sekunder*.

Ada tiga jalur utama metabolisme: Embden Meyerhoff-Parnas (EMP), Entner-Duodorof dan jalur Heksosa Monofosfat (HMP). Jalur EMP menghasilkan dua molekul piruvat melalui intermediet posfat triosa (Gambar 3.1). Jalur ini paling banyak ditemukan pada hewan, tumbuhan, khamir, dan bakteri. Namun banyak mikrobia menggunakan jalur ini sebagai satu-satunya jalur untuk penggunaan glukosa.



Gambar 3.1. Jalur Embden Meyerhoff-Parnas (EMP)



Gambar 3.2. Jalur metabolisme glukosa.

Keterangan: Tanda panah abu-abu menunjukkan enzim dari jalur Entner-Doudoroff. Tanda panah putus-putus menunjukkan enzim dari jalur pentosa posfat, sedangkan panah hitam menunjukkan enzim dari jalur glikolisis. 1, hexokinase; 2, glucose-6-phosphate (G6P) isomerase; 3, phosphofruktokinase; 4, fructose-1,6-bisphosphate (F1,6P<sub>2</sub>) aldolase; 5, triosephosphate isomerase; 6, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) aldolase; 7, 6-phosphogluconate (6PG) dehidrase; 8, glucose-6-phosphate dehidrogenase; 9, 6-phosphogluconate dehidrogenase; 10, ribose-5-phosphate (Ri5P) isomerase; 11, ribulose-5-phosphate (Ru5P) epimerase; TK, transketolase; TA, transaldolase; F6P, fructose-6-phosphate; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; X5P, xylulose-5-phosphate.

Biasanya Actinobacteria menggunakan jalur EMP untuk metabolisme glukosa karena lebih efisien daripada jalur ED. Namun, satu spesies Actinobacteria yaitu *Mycobacterium smegmatis*, telah ditemukan sebagai hal istimewa yaitu justru menggunakan jalur ED. Bakteri ini sekarang digunakan untuk menghasilkan antibiotik komersial untuk pengobatan multiresisten bakteri Gram positif

## B. Metabolit primer Actinobacteria

Metabolit primer dibutuhkan oleh sel untuk penggunaan nutrisi dalam lingkungannya seperti senyawa berberat molekul rendah untuk aktivitas selular. Metabolit primer merupakan kerangka dasar untuk makromolekul, intermediet dalam reaksi-reaksi pembangkitan senyawa kaya energi (ATP), koenzim dan vitamin. Metabolit sekunder tidak memiliki peran yang demikian dalam metabolisme, tetapi masih berperan penting dalam siklus suatu organisme. Jika organisme berhenti tumbuh dan memasuki fase istirahat, maka terjadi akumulasi metabolit primer. Hal ini berpotensi buruk dan cenderung terspekulasi sehingga sel menghindarinya dan memulai menghasilkan metabolit sekunder.

Ada beberapa kesamaan antara jalur yang menghasilkan metabolit primer dan sekunder, yaitu produk dari suatu reaksi menjadi substrat untuk reaksi berikutnya. Demikian pula pengaturan jalur metabolisme sekunder berkaitan erat dengan kompleksitas terhadap mekanisme pengaturan metabolisme primer. Proses metabolisme primer dan sekunder saling terkait, yaitu metabolit sekunder terjadi melalui proses biosintesis yang menggunakan prekursor senyawa-senyawa metabolit primer. Aseil-CoA yang merupakan metabolit primer mempunyai peran sebagai prekursor biosintesis metabolit sekunder golongan isoprenoid, terpenoid dan poliketida.

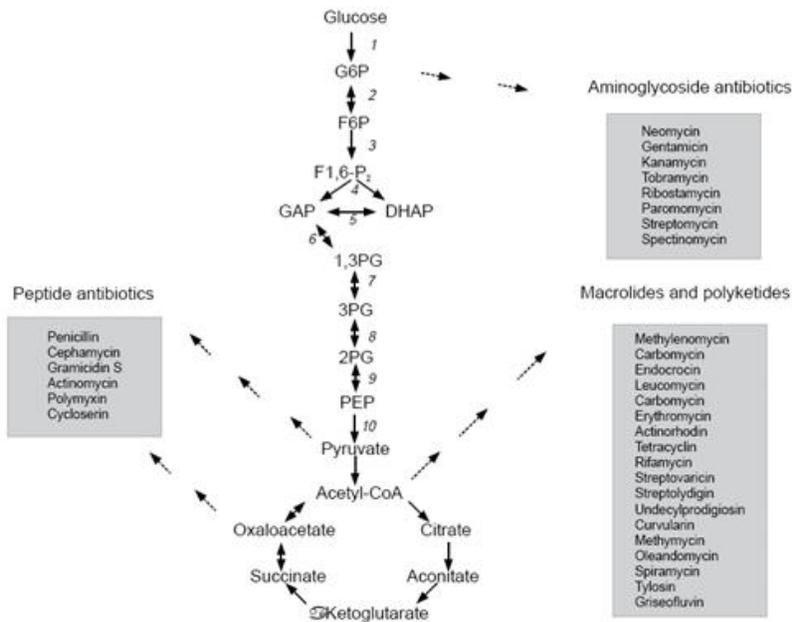
Beberapa jalur metabolit primer telah diketahui sebagai sumber prekursor sintesis metabolit sekunder. Metabolisme asam lemak (asetat dan propionat untuk biosintesis poliketida), metabolisme asam amino (misalnya serin, sistein, valin, tirosin), metabolisme karbohidrat (heksosa posfat, pospogliserat, pospoenulpiruvat, piruvat), metabolisme purin dan pirimidin (AMP).

Metabolit primer menghasilkan senyawa sederhana yang terdistribusi dengan luas dan memiliki berat molekul rendah seperti asam karboksilat pada lajur Krebs, asam amino, karbohidrat, lemak dan protein. Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa induk atau dikenal sebagai *prekursor* untuk metabolit sekunder tertentu berkaitan erat dengan enzim-enzim dalam metabolit primer. Termasuk enzim antibiotik sintetase dalam biosintesis antibiotika,

misalnya *phenoxazinone syntase* yaitu suatu enzim pada jalur pembentukan *actinomycin* dari *Streptomyces antibioticus* (Betina, 1983). Meski demikian metabolisme sekunder dapat berkompetisi dengan metabolisme primer. Penambahan inhibitor yang menghambat biosintesis protein selama fase idiofase memacu pembentukan actinomysin

Proses keseimbangan regulasi dalam pertumbuhan biasanya dikontrol oleh sejumlah enzim-enzim kunci baik pada aras aktivitas maupun sintesisnya. Sebagai contoh, laju penggunaan glukosa dikontrol oleh aras transportasi gula (misalnya: sistem glukosa-PTS), fosforilasi glukosa (glukosa kinase) dan pada tahap glikolisis, misalnya konversi fruktosa 6-fosfat (F-6-P) menjadi fruktosa-1,6-bisfosfat (F-1,6-P<sub>2</sub>) oleh enzim fosfofruktokinase atau konversi fosfoenolpiruvat (PEP) plus ADP ke dalam ATP oleh enzim piruvat kinase.

Meskipun Actinobacteria mampu menggunakan sejumlah besar gula untuk pertumbuhan, sampai saat ini, pemahaman tentang jalur metabolisme karbohidrat dan regulasinya masih sangat terbatas diketahui.



Gambar 3.3. Hubungan antara beberapa prekursor metabolisme primer dan produksi antibiotika.

Keterangan: Nomor yang ditulis miring menunjukkan enzim yang mengkatalisis setiap tahapan glikolisis 1, hexokinase; 2, glucose-6-phosphate isomerase; 3, phosphofruktokinase; 4, fructose-1,6-bisphosphate aldolase; 5, triose phosphate isomerase; 6, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; 7, phosphoglycerate kinase; 8, phosphoglycerate mutase; 9, enolase; 10, pyruvate kinase.

### C. Metabolisme sekunder Actinobacteria

Metabolit sekunder adalah senyawa yang dihasilkan oleh proses metabolisme sekunder makhluk hidup. Senyawa ini hanya disintesis oleh spesies tertentu dalam jumlah terbatas dan merupakan ciri khas bagi spesies tertentu. Fungsi senyawa ini diduga bermacam-macam, seperti pertahanan diri terhadap kompetitor (parasit atau predator), komunikasi, meningkatkan kemampuan pertumbuhan, dan ada juga yang belum jelas fungsinya. Metabolit sekunder banyak memberi manfaat bagi manusia atau makhluk hidup lain karena beberapa diantaranya berfungsi sebagai obat, vitamin, hormon, dan lain-lain (Dewick, 2002).

Metabolisme sekunder merupakan proses metabolisme yang tidak esensial untuk pertumbuhan dan reproduksi organisme itu sendiri. Proses metabolisme sekunder melalui lintasan biosintesis yang terdiri atas rangkaian reaksi biokimiawi dari suatu “*starting material*” (prekursor universal) seperti asetil-CoA, asam amino, atau shikimat. Reaksi ini menggunakan bantuan enzim spesifik hasil ekspresi gen tertentu sehingga menjadi suatu produk metabolit sekunder.

Biosintesis senyawa metabolit sekunder merupakan rangkaian proses reaksi kimia yang sangat kompleks. Meski rumit, namun pola biosintesis senyawa secara umum merupakan bagian atau melibatkan empat jalur utama yaitu: Jalur asam sikimat, Jalur mevalonat, Jalur poliketida dan Jalur asam amino.

Senyawa metabolit sekunder terbentuk secara ekstraseluler, sehingga dapat diekstraksi dari medium cair pertumbuhan bakteri. Beberapa kelas senyawa ini adalah terpen, poliketida, fenol, iridoid, steroid, non ribosomal peptida dan lain sebagainya.

Biosintesis metabolit sekunder mencakup beberapa tahapan berikut:

- Penyerapan nutrisi ke dalam sel dan mengubahnya menjadi senyawa intermediet pada metabolisme pusat
- Akumulasi metabolit primer dan pengenalan molekul yang menginduksi pembentukan metabolit sekunder
- Terbentuknya metabolit primer yang masuk ke dalam jalur pembentukan senyawa spesifik seperti antibiotika.

Antibiotika dan produk-produk mikrobia lainnya seperti mikotoksin, giberellin dan alkaloid merupakan metabolit sekunder. Metabolit sekunder dibentuk melalui jalur khusus dari metabolit primer, memiliki karakteristik untuk setiap genera, spesies atau galur tertentu, tidak bersifat esensial bagi pertumbuhan organisme yang memproduksinya, namun berperan bagi kelangsungan hidupnya di alam.

Actinobacteria merupakan kelompok bakteri penghasil metabolit sekunder yang bermanfaat sebagai senyawa bioaktif

(Moore *et al.*; 1999, Oskay *et al.*, 2004; Bentley *et al.*, 2002; Yehuda, 2005; Magarvey *et al.*, 2004; Pelaez, 2005). Terdapat 14 jenis obat yang telah digunakan secara klinis berasal dari *Streptomyces* spp. Selain menghasilkan senyawa antimikrobia, Actinobacteria juga menghasilkan berbagai senyawa lainnya seperti enzim-enzim hidrolitik ekstraselluler (Paradkar *et al.*, 2003).

Sebagian besar mikrobia penghasil antibiotik menggunakan karbohidrat sebagai prekursor atau glukosa sebagai sumber karbon utama dan energi, sehingga ketersediaan glukosa sangat penting dalam medium produksi antibiotika atau dalam bentuk polisakarida dan disakarida. Beberapa antibiotika yang berasal dari glukosa, seperti streptomycin, kerangka atomnya tersusun dari 3 molekul glukosa.

Antibiotika lainnya yang berasal dari prekursor karbohidrat yaitu asam amino glikosida dan makrolida. Asam kojat juga merupakan salah satu metabolit sekunder fungi yang berasal dari glukosa. Glukosa polisakarida (misalnya pati), oligosakarida (misalnya laktosa) dan minyak (misalnya metiloleat) merupakan sumber karbon yang baik digunakan dalam proses fermentasi berkaitan dengan pembentukan metabolit sekunder. Sumber karbon lain yang berperan dalam metabolit sekunder adalah gliserol yang merupakan sumber karbon pembentukan antibiotika jenis actinomycin, cephalosporin, sikloserin, eritromysin dan peptida K-582 (Hoskisson *et al.*, 2001)

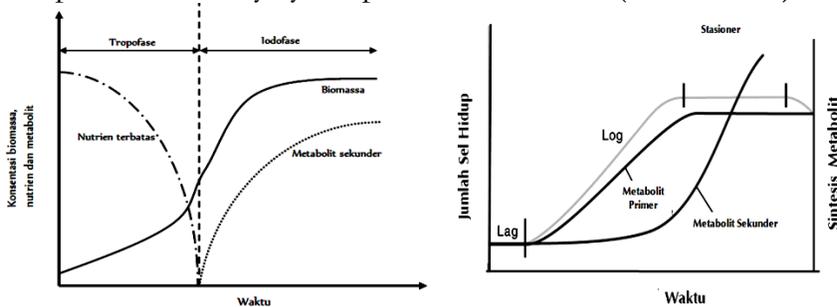
### **Fase Pertumbuhan dan Sintesis Metabolit Actinobacteria**

Dalam kultur cair fermentasi, maka produksi metabolit primer dimulai ketika sel berada pada fase eksponensial. Selama fase ini mikrobia menghasilkan produk esensial untuk pertumbuhan sel seperti: asam amino, protein, karbohidrat dan lemak. Oleh karena itu fase eksponensial disebut juga sebagai fase tropofase yang berarti pertumbuhan; trophos (bahasa Latin), artinya: tumbuh.

Selanjutnya mikrobia memasuki fase pertumbuhan terhambat atau konstan yang disebut fase stasioner. Selama fase ini berbagai produk metabolit sekunder yang penting artinya bagi industri

dihasilkan. Fase ini disebut juga sebagai fase idiofase, yang berarti fase dihasilkannya produk atau senyawa yang tidak biasa; idios (bahasa Latin), artinya: tidak biasa.

Proses awal biosintesis antibiotik ditentukan dan dipengaruhi oleh berbagai faktor fisiologis dan lingkungan, seperti laju pertumbuhan, difusi sinyal molekuler  $\gamma$ -butyrolactone, ketidakseimbangan metabolisme dan berbagai tekanan fisiologis. Sintesis antibiotik juga berkaitan dengan represi metabolit dan atau gangguan oleh sumber nitrogen (umumnya  $\text{NH}_4^+$ ), posfat dan atau glukosa. *Streptomyces* memproduksi metabolit sekunder bila dalam media atau lingkungannya nutrisi mulai terbatas untuk mendukung proses pertumbuhannya yaitu pada fase idiofase (Gambar 3.4).



Gambar 3.4. Pembentukan metabolit sekunder pada siklus hidup mikrobia.

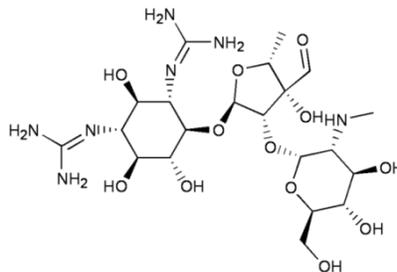
Jalur metabolit sekunder juga dipengaruhi oleh sumber N yang sangat penting untuk pertumbuhan, misalnya garam ammonium. Sumber N organik seperti protein (misalnya tepung kedelai) dilaporkan berperan penting sebagai sumber nitrogen untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder (Demain, 1989).

Beberapa senyawa antara (*intermediate*) yang terbentuk dalam proses pemecahan glukosa, menjadi kerangka karbon bagi semua asam amino yang menyusun protein. Beberapa asam amino tertentu merupakan prekursor bagi antibiotika peptida. Jadi antibiotika dan produk metabolit sekunder lain merupakan derivat metabolit primer yaitu sakarida, asam shikimat dan asam amino aromatik, asam amino trikarboksilat, purin dan pirimidin.

Suatu jenis mikroba dapat menghasilkan metabolit yang sangat berbeda. *Streptomyces griseus* dan *Bacillus subtilis* masing-masing menghasilkan lebih dari lima puluh antibiotik yang berbeda sebagai metabolit sekunder.

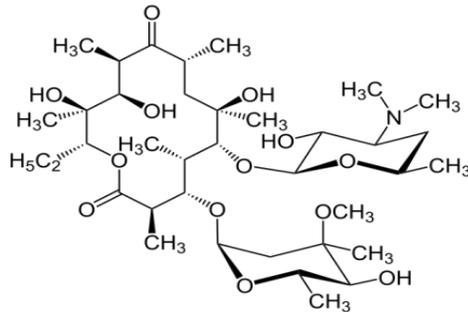
Umumnya metabolit sekunder dihasilkan oleh kelompok familia yang memiliki kedekatan senyawa terkait. Struktur kimia dan aktivitas yang dihasilkan mencakup berbagai kemungkinan, termasuk antibiotik, alkaloid ergot, naphtalenes, nukleosida, peptida, phenazines, quinolines, terpenoid dan beberapa faktor tumbuh yang kompleks. Produk tersebut memiliki nilai ekonomi penting seperti antibiotik sebagai salah satu kegiatan utama bioproses industri.

Sejak ditemukan pertama kali Actinobacteria di laboratorium Selman Waksman Univeritas Rutgers tahun 1943, yang diikuti dengan penemuan *Streptomycin* tahun 1943 sebagai obat yang cukup efektif dalam pengobatan tuberculosis, maka Actinobacteria mulai terkenal sebagai organisme penghasil antibiotik dan senyawa metabolit sekunder bioaktif lainnya.

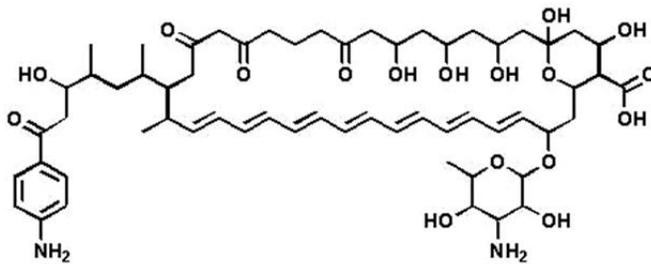


Gambar 3.5. Struktur kimia Streptomycin

Selama masa keemasan penemuan antibiotik, maka pada tahun 1950-an dan 1960-an telah dikenal banyak obat antibakteri seperti tetrasiklin, eritromycin, dan kanamycin; obat antifungi (candididin, nystatin) serta senyawa antikanker (adrymanicin). Total antibiotik yang dihasilkan oleh bakteri dan fungi mencapai 5.000 jenis meski ada yang melaporkan mencapai dua kali lipatny. Dari jumlah tersebut, maka Actinobacteria merupakan penghasil dua pertiga dari total jumlah tersebut. (Challis dan Hopwood, 2003).



Gambar 3.6. Struktur kimia Eritromisin



Gambar 3.7. Struktur kimia Candicidin

## D. Biosintesis Senyawa Poliketida

Umumnya antimikrobia yang dihasilkan oleh kelompok Actinobacteria merupakan poliketida dan peptida nonribosomal (NRPS) yang banyak digunakan dalam industri farmasi. Poliketida adalah blok pembangun (*building block*) untuk berbagai produk-produk alami. Hipotesis poliketida dipertelakan oleh Birch pada tahun 1975 dan memiliki kontribusi penting pada bidang biogenesis poliketida. Hasil kajian tersebut menunjukkan adanya korelasi yang bernilai antara struktur dari sebagian besar produk alami aromatik dan cara biosintesisnya melalui hubungan ikatan kepala-ekor dari unit asetat (Robinson, 1991). Beberapa senyawa poliketida yang dihasilkan oleh kelompok Actinobacteria antara lain eritromisin (antibakteri),

nystatin dan amphotericin A/B (antifungi), avermectin (antiparasit), daunorubicin (antitumor).

Biosintesis senyawa metabolit sekunder poliketida memiliki kemiripan dengan biosintesis asam lemak (kondensasi Claisen). Keduanya melalui proses kondensasi asil-CoA dengan malonil-CoA. Pada biosintesis asam lemak kondensasi diikuti oleh proses lain seperti reduksi, dehidrasi yang menghasilkan pemanjangan karbon dalam bentuk alkil. Sementara itu pada kondensasi poliketida asetil-CoA seringkali disebut sebagai prekursor *starter*, sedangkan malonil-CoA dikenal sebagai prekursor *extender* (Nedal, 2007). Meski demikian, berbeda dengan biosintesis asam lemak, maka pada biosintesis poliketida tahapan reduksi dan seterusnya tidak selalu terjadi tetapi proses kondensasi hanya menghasilkan ester poli- $\beta$ -keto. Bentuk poli- $\beta$ -keto ini selanjutnya mengalami proses siklisasi mengikuti mekanisme kondensasi aldol dan Claisen yang diikuti berbagai modifikasi yang menjadikan struktur poliketida menjadi beragam. Demikian pula pada poliketida, maka terdapat struktur ester koenzim A yang sangat bervariasi yang berasal dari berbagai jalur biosintesis lain termasuk jalur shikimat. Proses ini yang menghasilkan berbagai struktur yang menjadikannya variabilitas pada struktur poliketida. Enzim utama yang terlibat dalam biosintesis poliketida adalah poliketida sintase atau yang dikenal sebagai PKS (Polyketide Synthase).

Tiga jenis PKS bakteri yang telah diketahui sampai saat ini yaitu (i) PKS Tipe I adalah enzim multifungsi yang tersusun dalam modul, yang masing-masing berkelompok sebagai satu perangkat yang berbeda, non-iteratif yang bertanggung jawab atas katalisis satu siklus pemanjangan rantai poliketida. (ii) PKS Tipe II adalah kompleks multienzim yang membawa satu set aktivitas iterasi dan minimal terdiri dari  $\beta$ -sintase ketoasil (KS)  $\alpha$  dan subunit  $\beta$  dan protein pembawa asil (ACP). [Subunit KS $\beta$  juga dikenal sebagai faktor rantai panjang atau faktor rantai-inisiasi]. Tipe Iteratif synthases poliketida II terbentuk dari protein multifungsi sangat besar. Sisi aktif dari synthases ini tersebar diantara beberapa polipeptida kecil yang biasanya monofungsional. Poliketida synthases Tipe II mengkatalisis

pembentukan molekul yang membutuhkan aromatisasi dan siklisasi tanpa reduksi ekstensif atau siklus reduksi/dehidratasi. Synthase ini analog dengan synthase asam lemak pada bakteri. Poliketida synthases Tipe II iteratif bertanggung jawab terhadap biosintesis actinorhodin pada *S. coelicolor* dan juga pada biosintesis tetracenomycin dan doxorubicin. Semua enzim tipe II dan beberapa tipe I merupakan iteratif, yang berarti bahwa suatu enzim tunggal melakukan rentetan kondensasi ganda untuk menghasilkan produk poliketida. Akan tetapi, beberapa produk poliketida memerlukan fungsi terkoordinasi dari beberapa enzim tipe I di dalam suatu proses pembentukan secara berurutan (Mayer *et al.*, 2007). (iii) PKS Tipe III, juga dikenal sebagai PKS sintase-mirip-kalkon, banyak ditemukan pada tanaman meski telah ditemukan pula pada mikrobia (Cheng, 2003).

### **1. Senyawa makrolida pada Actinobacteria**

Pembentukan senyawa yang melibatkan mikrobia (jamur, bakteri) tidak hanya menghasilkan antibiotika, tetapi juga menghasilkan senyawa kimia atau kumpulan senyawa kimia lain yang strukturnya berbeda, disebut sebagai lakton makrosiklik (macrocyclic lactones) atau singkatnya makrolida (macrolides) atau makrolakton (macrolactones).

Istilah makrolida digunakan oleh Woodward untuk menunjukkan senyawa yang berciri: mempunyai cincin lakton bersegi 12, 14 atau 16; mempunyai nitrogen pada cincin dan memiliki sejumlah substitusi pada cincin yang meliputi satu sampai tiga gula yang melekat pada cincin ataupun melekat satu sama lain. Makrolida merupakan senyawa poliketida yang banyak digunakan sebagai obat (khususnya antibiotik). Aktivitasnya disebabkan karena keberadaan cincin makrolida, cincin lakton besar yang berikatan dengan satu atau lebih gula deoksi, biasanya cladinose dan desosamine.

Genetika dan biokimia biosintesis poliketida pada bakteri *Streptomyces* sp telah diketahui. Senyawa poliketida makrolida dibentuk dalam proses yang mirip dengan biosintesis asam lemak yaitu melalui proses kondensasi berulang dari asam karboksilat

sederhana oleh PKS tipe I. PKS tipe I tersusun ke dalam unit-unit berulang (modul), yaitu masing-masing unit bertanggung jawab terhadap satu siklus kondensasi sintesis rantai poliketida. Manipulasi terhadap gen PKS tipe I mengakibatkan terjadinya perubahan yang dapat diprediksi pada struktur kimia makrolida. Hal ini menunjukkan bahwa modus operasi proses ini telah dikenali.

## 2. Modifikasi pasca-PKS

Sintesis dan siklisasi poliketida biasanya dimodifikasi melalui proses hidroksilasi, glikosilasi, metilasi dan/atau asiklasi. Modifikasi akhir ini diyakini sangat penting untuk kegiatan biologik dari makrolida. Proses modifikasi pasca PKS umumnya dikatalisis oleh enzim-enzim seperti **oksigenase, oksidase, peroksidase, dehidrogenase** dan **kelompok transferase**. Enzim ini sangat penting untuk menambahkan gugus-gugus penting pada kerangka poliketida dan menjadi faktor utama yang menyebabkan terbentuknya keragaman struktur dan aktivitas biologik senyawa bahan alam ini.

### ✓ **Oksigenase**

Oksigenase mengkatalisis reaksi yang menyebabkan keragaman struktur yang sangat besar dari banyak produk PKS, membuat enzim ini menarik untuk biosintesis kombinasi. Jenis oxygenase paling umum diketahui adalah sitokrom monooxygenase P450 (CYP450), flavin dependen mono-dan dioksigenase, dan antron oksigenase, dan yang luar biasa adalah karena keduanya tidak membutuhkan NADPH/NADH atau kofaktor lainnya. Kebanyakan antibiotik makrolida yang dihasilkan oleh bakteri mengandung satu atau lebih sitokrom P450 monooxygenases terlarut dalam kelompok gen antibiotik, dimana sitokrom individu menunjukkan spesifisitas substrat yang relatif luas. Reaksi klasik sitokrom P450 monooxygenases adalah memindahkan atom oksigen dari O<sub>2</sub> untuk berbagai substrat dengan menggunakan elektron yang dipasok dari NAD(P)H melalui ferredoxin (FDX) dan ferredoxin oxidoreductase (FDR).

### ✓ **Kelompok transferase**

Istilah kelompok transferase merujuk pada enzim yang memiliki aktivitas transferase yang mengantarkan gugus fungsional baru pada produk. Kelompok enzim ini mengandung enzim penting seperti amino transferase, alkil (biasanya metil) transferase, asil (biasanya asetil) transferase, glycosyltransferase (GTS) dan kinase. Metil dan glycosyltransferases merupakan enzim modifikasi pasca PKS yang paling penting.

Glycosyltransferase mungkin merupakan enzim biotransformasi paling penting di alam, setidaknya dalam hal kuantitatif. GT bertanggung jawab terhadap pencantelan gugus gula, paling sering gula-deoxy, yang menambahkan fitur penting pada molekul dan seringkali memainkan peran penting dalam bioaktivitas pada banyak produk natural berbasis obat. Beberapa GT juga menunjukkan fleksibilitas yang tak terduga terhadap substrat baik dengan substrat akseptor (biasanya alkohol atau fenol) maupun gula(deoksi) donor co-substrat, atau bahkan kadang-kadang untuk keduanya.

Methyltransferase menggunakan S-adenosylmethionine (SAM) sebagai kofaktor dan dapat pula metilasi atom O, N atau C. Metilasi O dan N meningkatkan lipofilisitas molekul dan juga menghilangkan sisi donor ikatan hidrogen. Reaksi metilasi dapat terjadi baik pada bagian aglikon poliketida atau pada residu gula, baik sebelum atau setelah pemindahan glikosil

Penggunaan enzim modifikasi pasca-PKS ini terjadi dalam biosintesis kombinasi. Biosintesis kombinasi diperkenalkan oleh C. Khosla sebagai "suatu cara yang melibatkan rekayasa genetik jalur biosintesis sedemikian rupa sehingga memungkinkan rekonstruksi kombinasi untuk menghasilkan perpustakaan molekul kecil baru yang sesuai untuk digunakan dalam skrining obat baru".

Tahap-tahap sulaman pasca PKS diperlukan guna menambahkan gugus fungsional penting untuk bioaktivitas senyawa sehingga hal ini sangat penting dalam proses biosintesis tersebut. Inaktivasi gen target dari enzim-enzim pasca PKS tidak hanya

menjadi instrumen penting terhadap elucidasi jalur biosintesis, tetapi dapat pula digunakan dalam konteks biosintesis kombinasi untuk menghasilkan produk "tidak alami" dengan sifat biologis yang berubah.

Peningkatan keragaman biokimia dapat dilakukan melalui perubahan substrat spesifik untuk enzim seperti sitokrom P450 oxidoreductases, transferase metil dan glycosyltransferase serta ekspresi heterolog jalur gula-deoxy secara menyeluruh sehingga dapat memperbesar kemungkinan menemukan senyawa bioaktif poliketida baru dengan sifat-sifat yang diinginkan.

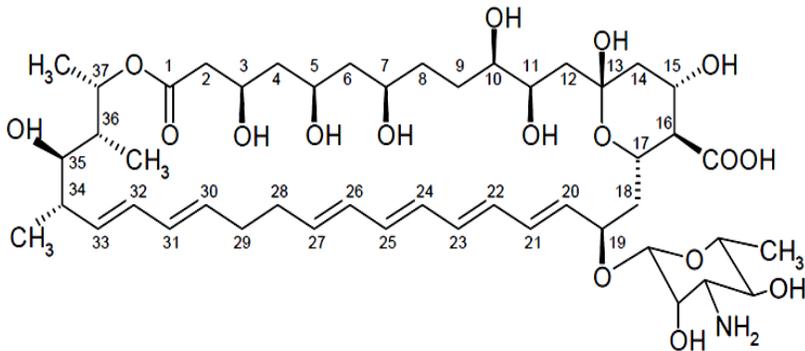
GT merupakan hal yang sangat penting sebagai instrumen untuk pendekatan biosintesis kombinasi. GT dapat digunakan sendiri atau gugus glikosidik dapat dimodifikasi melalui perubahan biosintesis gugus gula-deoxy.

Manipulasi genetik gen oxygenase memberikan informasi penting terhadap fungsi dan karakteristik enzim-enzim terprogram tersebut; tujuan akhirnya menjadikan desain yang rasional dengan hasil berupa produk natural hibrida baru. Adapun GTS, juga penting untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi monooxygenases guna meningkatkan jumlah target poliketida baru yang diperoleh melalui teknik kombinasi tersebut.

## **E. Mekanisme Biosintesis Nystatin**

Salah satu senyawa poliketida yang cukup penting dalam bidang kesehatan adalah nystatin yaitu untuk pengobatan penyakit yang disebabkan oleh fungi. Nystatin yang juga dikenal dengan nama fungicidin merupakan anggota dari kelompok makrolida polyene pertama dari antibiotik antifungi yang ditemukan oleh Hazer dan Brown pada tahun 1950. Strain *Streptomyces* yang ditemukan sebagai penghasil nystatin pertama kali di karakterisasi pada tahun 1953 oleh Ettliger dan menamakannya *S. noursei*. Kemudian nystatin dinamakan berdasarkan tempat penemuan lokasi sampel yaitu di New York State (Gambar 3.8). Selanjutnya strain lainnya yang dilaporkan menghasilkan juga nystatin adalah *S. fungicidicus* ATCC 27432 dan *S. albus* ATCC 12757. Akan tetapi produksi nystatin secara komersil sejauh ini hanya dari *S. noursei*.

Berdasarkan uraian diatas, maka berikut dijelaskan mekanisme pembentukan senyawa nystatin:



Gambar 3.8. Struktur kimia Nystatin

### 1. Kluster gen biosintesis nystatin

Gen-gen biosintesis antibiotik makrolida pada *Streptomyces* diorganisir di dalam bentuk kluster (tandan). Kloning dan sekuensing DNA secara lengkap dari spesies tersebut telah diketahui adanya beberapa antibiotik makrolida yang dihasilkan oleh *Streptomyces*, termasuk avermectin, pikromycin, rapamycin, pimaricin dan nystatin.

Pada DNA *S. noursei* diketahui mengandung gen untuk proses biosintesis nystatin, dan ditemukan ada enam gen yang mengkode suatu modul sintase poliketida (PKS), gen untuk thioesterase, gula-deoxy biosintesis dan pencantelan, modifikasi pasca-PKS, transportasi dan protein regulasi. Produk gen dari kluster nystatin dan fungsi putatif atau eksperimental tercantum pada Tabel 3.

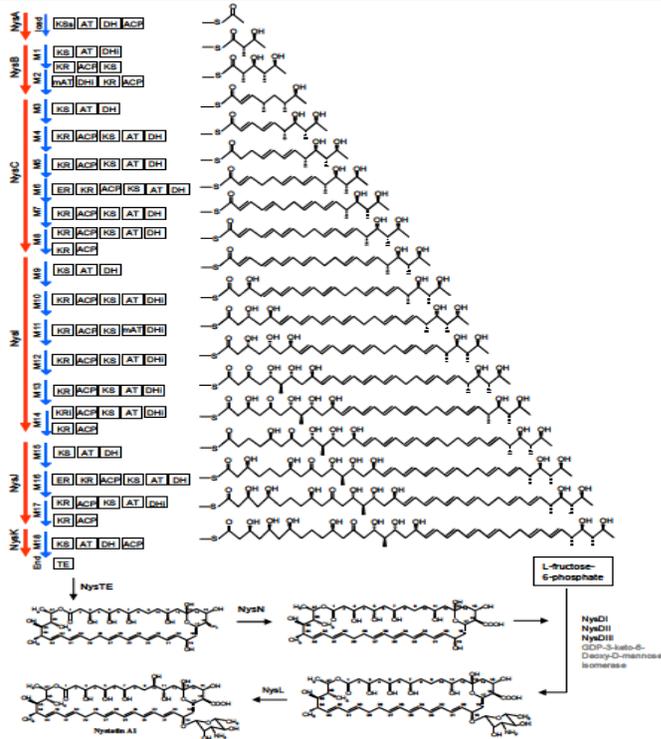
### 2. Modul PKS

Berdasarkan *alignment* (pensejajaran) urutan asam amino, perbandingan dengan gen PKS yang telah diketahui serta hasil penelitian perusakan gen tersebut, diketahui bahwa gen *nysA*, *nysB*, *nysC*, *nysI*, *nysJ* dan *nysK* mengkode modul-modul PKS yang diperlukan untuk perakitan dan siklisasi cincin makrolakton nystatin (Tabel 3.1, Gambar 3.9)

Tabel 3.1: Gen-gen PKS, gen modifikasi Post-PKS dan gen regulasi serta gen transpor yang diketahui pada kluster gen dalam biosintesis nystatin dari *S. noursei*

Gen	Produk	Fungsi
<b>Gen PKS</b>		
<i>nysA</i>	PKS Tipe I	Nystatin PKS (loading modul)
<i>nysB</i>	PKS Tipe I	Nystatin PKS (modul 1 dan 2)
<i>nysC</i>	PKS Tipe I	Nystatin PKS (modul 3-8)
<i>nysI</i>	PKS Tipe I	Nystatin PKS (modul 9-14)
<i>nysJ</i>	PKS Tipe I	Nystatin PKS (modul 15-17)
<i>nysK</i>	PKS Tipe I	Nystatin PKS (modul 18 + TE)
<i>nysE</i>	Thioesterase	Pelepasan rantai poliketida dari PKS
<b>Gen modifikasi Post-PKS</b>		
<i>nysDI</i>	Glycosyltrans ferase	Penyantelan mycosamine pada macrolactone
<i>nysDII</i>	Aminotrans ferase	Biosintesis Mycosamine
<i>nysDIII</i>	GDP-mannose-4,6-dehidratase	Biosintesis Mycosamine
<i>nysF</i>	4'-Phosphopantheteine transferase	Modifikasi Post-translasi PKS
<i>nysL</i>	P450 monooxygenase	Hidroksilasi pada C-10
<i>nysM</i>	Ferredoxin	Pemindah elektron pada sistem P450
<i>nysN</i>	P450 monooxygenase	Oksidasi gugus metil pada C-16 makrolakton
<b>Gen Regulasi dan Transpor</b>		
<i>nysRI</i>	Aktivator transkripsi	Regulator positif biosintesis nystatin
<i>nysRII</i>	Aktivator transkripsi	Regulator positif biosintesis nystatin
<i>nysRIII</i>	Aktivator transkripsi	Regulator positif biosintesis nystatin

<i>mysRIV</i>	Aktivator transkripsi	Regulator positif biosintesis nystatin
<i>mysG</i>	ABC transporter	Efflux nystatin
<i>mysH</i>	ABC transporter	Efflux nystatin



Gambar 3.9: Biosintesis makrolakton nystatin pada *S. noursei* ATCC 11455.

Keterangan: Panah merah menunjukkan protein PKS, dan panah biru adalah modul dalam modul PKS. KSS adalah ketosynthase dengan Cys → Ser substitusi sisi aktif; KS adalah ketosynthase; AT adalah asetiltransferase; ACP adalah protein pembawa asil; KR adalah ketoreduktase; DH adalah dehidratase; ER enoyl reduktase; TE thioesterase dan domain diawali dengan "i" adalah mungkin tidak aktif (Nedal, 2007)

## F. Mekanisme Biosintesis Herkimycin A

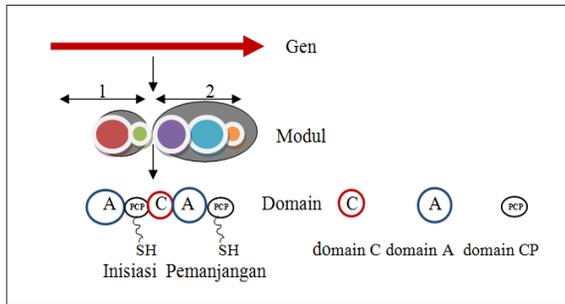
Contoh lain proses biosintesis senyawa kelompok poliketida adalah pembentukan *herkimycin* A (Gambar 3.10).



PKS mempolimerisasi asam-asam lemak menjadi suatu ragam struktur kimia yang disebut *poliketida*. Informasi genetik dari 3 gen, yang diorganisir menjadi 6 modul (setiap modul mengandung domain fungsional ganda) yang ditentukan setiap 2 unit karbon dari produk akhir dirakit. Domain fungsional mengkatalisis pemanjangan rantai (KS=*ketosynthase*; AT=*acyltransferase*; ACP= *acyl carrier protein*), mengubah tingkat oksidasi (KR= *ketoreductase*; DH=*dehydratase*; ER=*enoyl reductase*) dan makrosiklisasi (TE=*thioesterase*). Modul dalam rantai polipeptida dipisahkan oleh *linker* peptida pendek yang memfasilitasi rekayasa genetika untuk mematikan modul. Interaksi rantai-rantai polipeptida dengan yang lainnya di dalam urutan yang benar melalui interaksi protein-protein yang di mediasi secara parsial oleh *linker intermodular* dan peptida *linker* interpolipeptida kecil. Unit fungsional terakhir yaitu TE mengkatalisis pelepasan dan siklisasi rantai poliketida (Komaki & Harayama, 2006).

PKS diorganisir ke dalam unit-unit ulangan atau “*module*”. Setiap module bertanggungjawab mengkatalisis satu siklus lengkap/utuh dari pemanjangan rantai poliketida atau polipeptida serta modifikasi rantai. Penggunaan teknologi genetika molekuler memungkinkan dilakukan perubahan jumlah, kandungan atau urutan module ini, sehingga menyebabkan pula perubahan struktur molekul sehingga membentuk produk natural yang tidak alamiah (Hughes, 2003).

Gen yang mengkode PKS telah diidentifikasi dan dikarakterisasi untuk mempercepat penemuan jumlah senyawa aktif. PKS tipe I merupakan enzim multifungsi, sedangkan PKS tipe II terdiri atas enzim-enzim fungsi tunggal yang berasosiasi untuk membentuk kompleks seperti pada Gambar 3.11. (Ayuoso *et al.*, 2005).



Gambar 3.11. Gen membentuk modul yang bertanggung jawab terhadap penggabungan asam amino yang dikenali pada aras protein.

**Keterangan:** Modul dapat dibagi lagi menjadi domain yang membawa aktivitas katalitik untuk aktivasi substrat (Domain A), pembawa kovalen (domain CP), pembentukan ikatan peptida (Domain C). Modul tanpa domain C digunakan untuk mengawali sintesis peptida nonribosom, dengan demikian pemuatan C domain tersebut memenuhi syarat untuk pemanjangan (Dikutip dari: Finking & Marahiel, 2004)

Semua enzim tipe II dan beberapa tipe I merupakan iteratif, yang berarti bahwa suatu enzim tunggal melakukan rentetan kondensasi ganda untuk menghasilkan produk poliketida. Akan tetapi, beberapa produk poliketida memerlukan fungsi terkoordinasi dari beberapa enzim tipe I di dalam suatu proses pembentukan secara berurutan (Mayer *et al.*, 2007). Domain asetiltransferase menyeleksi starter atau *unit extender*, yang kemudian diikatkan secara kovalen pada pembawa pospopantethein dari domain yang berdekatan.

Kondensasi unit tersebut pada rantai dilakukan pada sisi aktif sistein dari domain ketosintase (KS). Rantai poliketida yang terbentuk biasanya diakhiri oleh suatu domain tioesterase atau siklase. Domain opsi PKS meliputi c-metilase, ketoreduktase, dehidratase, dan enoil reductase. Sebagai contoh, PKS nonreduksi tidak memiliki domain dehidrase, ketoreduktase, dan enoil reductase, dan kemudian menghasilkan poliketida yang dioksidasi secara penuh (Ketela *et al.*, 2002).

## G. Metabolit Actinobacteria Laut (Marine)

Laut merupakan lingkungan yang sangat kompleks dan menjadi rumah bagi berbagai jenis mikrobia yang memiliki keragaman akan lingkungan ekstrem seperti tekanan, salinitas dan suhu. Sekitar 70% permukaan bumi ini ditutupi oleh laut sehingga beberapa tempat yang menjadi habitat mikrobia belum pernah dilakukan kajian. Mikrobia laut memiliki kerumitan dan keragaman bentuk-bentuk kehidupan mikroskopik, yang menurut perkiraan baru 1% yang diketahui dan berhasil diidentifikasi (Bernan *et al.*, 2004).

Selain itu, bakteri laut seperti Actinobacteria ditemukan hidup berasosiasi secara simbiosis dengan berbagai invertebrata laut khususnya spon. Kajian menunjukkan bahwa Actinobacteria laut mendapat perhatian besar karena menghasilkan metabolit dan fisiologis yang unik. Metabolit tersebut tidak hanya menjamin kelangsungan hidupnya dalam kondisi ekstrem tapi juga potensi senyawa yang dihasilkan misalnya antitumor dan aktivitas farmakologik menarik lainnya yang tidak ditemukan pada mikrobia teresterial (Piel, 2004).

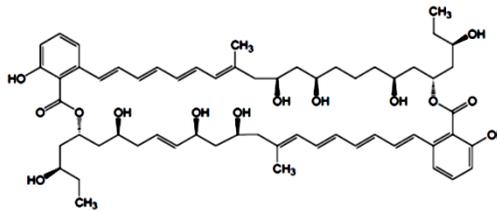
Menjelang seperempat akhir abad ke 20, penelitian Actinobacteria telah dilakukan pada lingkungan laut seperti sedimen pantai dan laut dalam. Hal ini menunjukkan bahwa meski bumi tertutupi 70% laut, ternyata memiliki keragaman ekosistem yang besar dan dikenal sebagai sumber habitat Actinobacteria baru. Actinobacteria membentuk spora resisten yang dapat tumbuh kembali setelah dorman selama bertahun-tahun dan hal ini menguatkan alasan bahwa Actinobacteria laut berasal dari spora-spora Actinobacteria tanah lalu tercuci masuk ke dalam lingkungan perairan laut.

Berbagai senyawa telah dilaporkan diperoleh dari Actinobacteria laut antara lain: Senyawa antitumor dari Actinobacteria marine strain *Salinispora arenicola* CNR-005 menghasilkan senyawa kelompok poliketida yaitu *Arenicolide*. Strain ini diisolasi dari sampel sedimen yang diambil dari sedimen laut pada kedalaman 20 m di pulau Guam. *Arenicolide* A diketahui bersifat



senyawa tersebut mampu menghambat sintesis protein *cell line carcinoma servic* HeLa.

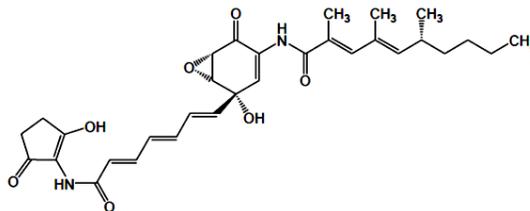
Kelompok senyawa poliketida baru yang dinamakan *marinomycin* dihasilkan oleh *Marinospora* sp. CNQ-140 hasil isolasi dari sampel sedimen yang diambil di Lajolla California (Gambar 3.13). Senyawa ini dapat menghambat proliferasi sel kanker [LC<sub>50</sub> 0,2-2,7 μM] terhadap *cell line* kanker. *Marinomycin* A diketahui aktif terhadap *cell line* melanoma manusia LOX IMVI, M14, SK-MEL-5, UACC-257 dan UACC-62. Selanjutnya *marinomycin* B dan C (Gambar 3.14) diketahui memiliki potensi aktivitas terhadap *cell line* yang sama dengan rata-rata aktivitas masing-masing LC<sub>50</sub> 0,9 dan 0,2 μM (Li *et al.*, 2005)



Marinomycin A

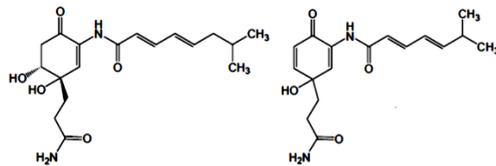
Gambar 3. 13. Struktur kimia senyawa Marinomycin A

*Daryamide* A sampai C yang juga merupakan familia senyawa *manumycin* (Gambar 3.14 dan Gambar 3.15) diisolasi dari *Streptomyces* strain CNQ-085 bersifat sitotoksik terhadap *cell line* karsinoma usus besar manusia (Asolkar *et al.*, 2006).



Manumycin A

Gambar 3.14. Struktur kimia senyawa Manumycin A

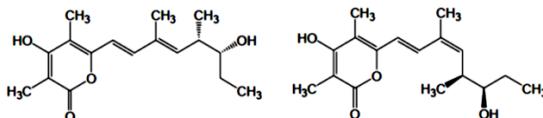


Daryamide A

Daryamide B

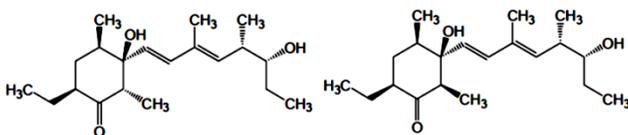
Gambar 3.15. Struktur kimia senyawa Daryamide

*Salinispora pacifica* CNS-237 yang diisolasi dari pulau Palau, Samudera Pasifik diketahui menghasilkan 4 senyawa poliketida baru yaitu *Salinipyron* (A-B), dan *Pacificanone* (A-B).



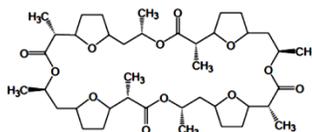
Salinipyron A

Salinipyron B



Pacificanone A

Pacificanone B



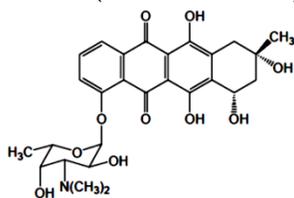
Nonactin

Gambar 3.16. Struktur kimia Salinipyron, Pacificanone, Nonactin

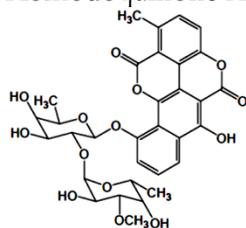
Keempat senyawa tersebut menunjukkan aktivitas biologik terhadap sel kanker usus besar sebagaimana yang dilaporkan oleh (Oh *et al.*, 2008). Isolat lainnya yang diperoleh dari sampel sedimen laut dalam di barat Samudera Pasifik dan diberi kode *Streptomyces* sp. KORDI-3238 diketahui menghasilkan *nonactin* (Jeong *et al.*, 2006).

Poliketida aromatik yang disintesis oleh PKS tipe II dan selanjutnya dibagi menjadi kelompok struktural yang berbeda seperti *anthracycline*, *angucycline*, dan *tetracycline*. Salah satu kelompok anthracycline adalah *komodoquinone* A-B yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. KS3 (Itoh *et al.*, 2003). Senyawa lainnya adalah

*chartreusin* yang diisolasi dari strain *Streptomyces* sp.QD518 yang ditemukan di Quinadao China. *Chartreusin* merupakan senyawa poliketida aromatik glikosilat (Wu *et al.*, 2006).



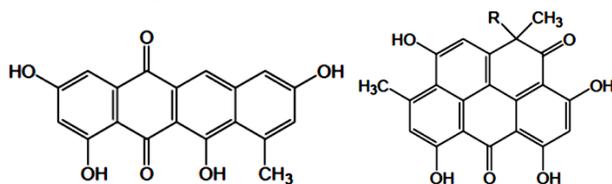
Komodoquinone A



Chartreusin

Gambar 3.17. Struktur kimia Komodoquinone dan Chartreusin

Senyawa lainnya yang dihasilkan oleh Actinobacteria adalah *tetracenomycin* D dan *resistomycin* oleh *Streptomyces* sp.B8005 sebagaimana yang dilaporkan oleh (Kock *et al.*, 2005).

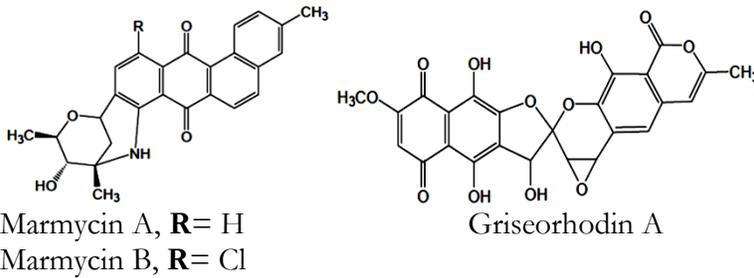


Tetracenomycin D

Resistomycin

Gambar 3.18. Struktur kimia Tetracenomycin dan Resistomycin

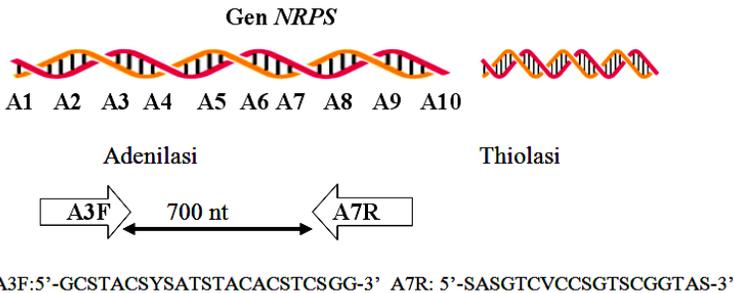
Struktur kelompok angucycline yang juga dihasilkan oleh Actinobacteria, strain CNH990 dinamakan *marmycin* A dan B. Senyawa lainnya adalah *griseorhodin* A yang diisolasi dari *Streptomyces* sp.JP95 yang berasosiasi dengan *Aplidium lenticulum* di pulau Queensland Australia (Tresselt *et al.*, 1978).



Gambar 3.19. Struktur kimia senyawa Marmycin dan Griseorhodin

## Kelompok Senyawa Peptida Non Ribosom (NRPS)

Sintesis peptida nonribosomal juga membutuhkan paling tidak 3 protein. Domain A menyeleksi asam amino lalu mengkatifkan asam amino tersebut menjadi asil adenilat, seperti halnya aa-tRNA sintetase, tetapi secara struktural tidak terkait dari kelompok enzim ini. Asam amino yang teraktivasi tersebut kemudian ditransfer ke PCP, yang dianggap memiliki fungsi yang mirip dengan tRNA karena sebagai unit transpor pada intermediat teraktivasi. Domain C yang pada langkah akhir mengkatalisis pembentukan ikatan peptida. Hal ini dianggap bahwa enzim ini memiliki sisi akseptor untuk nukleofil dan sisi donor untuk elektrofil yang jika dibandingkan dengan istilah dari fungsi tersebut menunjukkan beberapa analogi terhadap sisi A dan P pada ribosom. Akan tetapi kedua sintesis peptida tersebut memiliki perbedaan yang sangat berbeda.

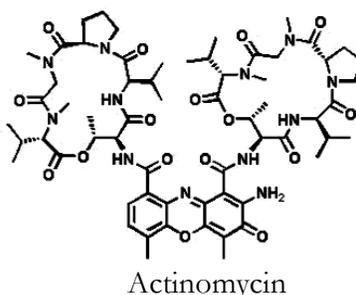


Gambar 3.20. Gen NRPS dan primer PCR *degenerated* target terhadap gen NRPS pada sekuen dari *Actinobacteria*.

Sintesis peptida melalui ribosom memiliki tingkat keakuratan dalam metabolisme primer karena adanya mekanisme baca ulang,

sedangkan pada sistem nonribosomal tidak ditemukan. Demikian pula jumlah asam amino hanya 20 sebagai kerangka pembentuk protein, namun pada sistem NRPS diketahui sampai saat ini ada ratusan. Oleh karena itu ditemukan adanya keragaman struktural peptida yang dihasilkan oleh sistem NRPS tersebut (Finking & Marahiel, 2004)

Selanjutnya beberapa senyawa kelompok peptida yang dihasilkan oleh Actinobacteria antara lain *Actinomycin* seperti pada Gambar 3.21.

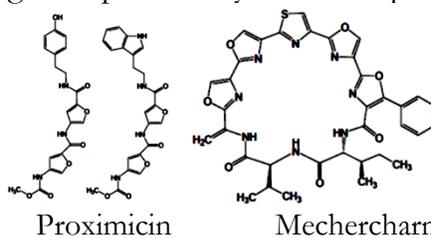


Actinomycin

Gambar 3.21. Struktur kimia senyawa Actinomycin

Senyawa kelompok NRPS yang juga dihasilkan oleh Actinobacteria laut diantaranya *Proximicin* yang merupakan antibiotik aminofuran (Fiedler *et al.*, 2008 dan Schneider *et al.*, 2008). Senyawa ini diketahui disintesis oleh sistem NRPS yang dihasilkan oleh *Verrucosisspora* sp.

Selanjutnya sebagaimana yang dilaporkan oleh (Kano *et al.*, 2005) bahwa strain *Thermoactinomyces* sp menghasilkan senyawa *Mechercharmycin* yang merupakan senyawa kelompok NRPS.

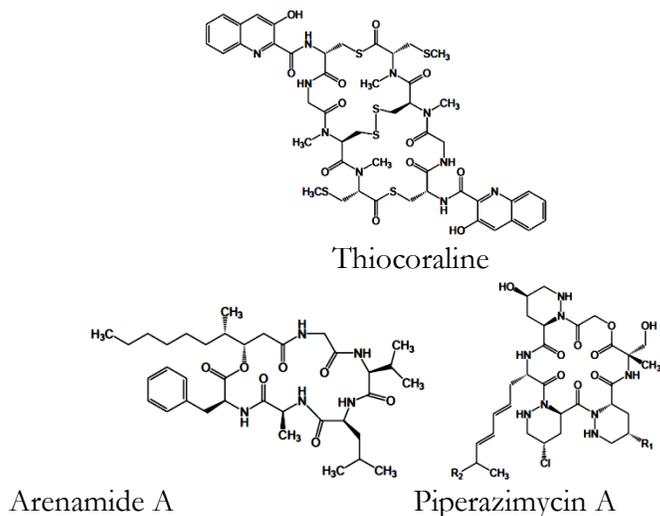


Proximicin

Mechercharmycin

Gambar 3.22. Struktur kimia Proximicin dan Mechercharmycin

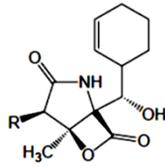
*Micromonospora* sp.L-13-ACM2-092 merupakan strain yang diketahui menghasilkan senyawa *thiocoraline* (Pérez *et al.*, 1997). Strain ini diperoleh dari hasil isolasi sampel yang dikumpulkan di Samudera Hindia.



Gambar 3.23. Struktur kimia Thiocoraline, Arenamide, Piperazimycin

Ditemukan pula 3 senyawa cyclohexadepsipeptida yang dinamakan *arenamida* yang dihasilkan oleh strain *Streptomyces arenicola* CNT-088 (Azolkar *et al.*, 2009). Selanjutnya *piperazimycin* merupakan hexadepsipeptida siklik yang diidentifikasi dari hasil isolasi strain *Streptomyces* sp. Strain CNQ-593 (Miller *et al.*, 2007).

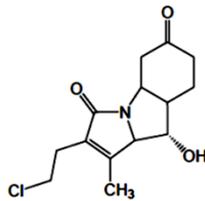
Senyawa lainnya yang dihasilkan oleh Actinobacteria merupakan gabungan antara PKS dengan NRPS. Salah satu senyawa yang merupakan kelompok gabungan ini adalah *salinosporamide*. Senyawa ini dihasilkan oleh *Streptomyces tropica* strain CNB-392 dan beberapa strain lainnya diketahui juga menghasilkan senyawa yang sama (Feling *et al.*, 2003). *Lajollamycin* yang juga merupakan gabungan poliketida dan non-ribosomal peptida dihasilkan oleh *Streptomyces nodosus* strain NPS007994 (Manam *et al.*, 2005).



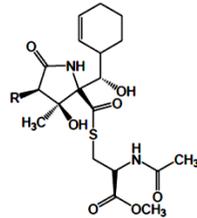
Salinosporamide A

A T1

(R=CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Cl)  
CH<sub>2</sub>-Cl)

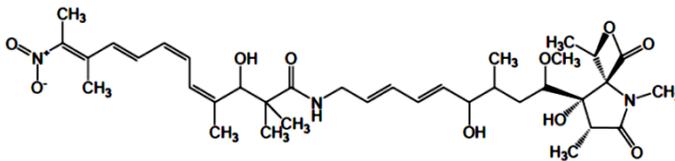


Salinosporamide C



Salinosporamide

(R=CH<sub>2</sub>-



Lajollamycin

Gambar 3.24. Struktur kimia Salinosporamide dan Lajollamycin



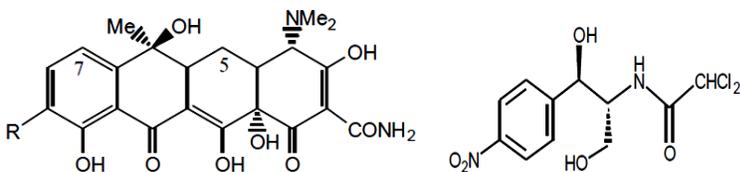
# BAB IV

## TEKNOLOGI HAYATI ACTINOBACTERIA

### A. Actinobacteria penghasil senyawa obat

Sejarah menunjukkan bahwa alam merupakan sumber utama obat yang umum digunakan oleh manusia. Obat asal bahan alam telah digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit pada berbagai negara. Bahan alam merupakan metabolit sekunder dari organisme seperti hewan, tumbuhan dan mikrobia.

Banyak bahan alam baik dari darat maupun dari laut telah digunakan untuk pengobatan infeksi oleh bakteri maupun fungi juga berbagai infeksi parasit. Mikrobia merupakan sumber paling banyak dibanding organisme lainnya, misalnya untuk pengobatan penyakit infeksi (penicillin, erythromycin, streptomycin, tetracycline, vancomycin, amphotericin B), Kanker (daunorubicin, doxorubicin, mitomycin, bleomycin), penolakan transplan (cyclosporin, FK-506, rapamycin) dan penurun kolesterol (lovastatin dan mevastatin).



Gambar 4.1. Struktur tetrasiklin dan kloramfenicol

Senyawa bioaktif yang digunakan dalam bidang kesehatan banyak yang diproduksi oleh mikrobia. Pencarian mikrobia terutama

Actinobacteria menjadi fokus banyak periset. Beberapa genus dari Actinobacteria yang mampu menghasilkan senyawa antimikrobia misalnya *Frankia* sp (Myers dan Tisa, 2004); *Actinomadura* sp (Kim et al., 2000; Badji et al., 2006); *Nocardia* sp (Lemriss et al., 2003).

Saat ini, bakteri asal laut dianggap sebagai sumber potensil penemuan struktur kimia yang menjanjikan untuk produk farmakologi. Senyawa asal bakteri tersebut selain memiliki aktivitas biologik juga menjadi senyawa penuntun untuk penemuan obat-obatan. Diantara bakteri asal laut tersebut, Actinobacteria merupakan sumber paling utama yang memiliki daya tarik sebagai senyawa dengan beragam aktivitas biologis untuk tujuan klinis. (Fenical and Jensen 2006; Solanki *et al.* 2008; Olano *et al.* 2009; Asolkar *et al.* 2010; Kekuda *et al.* 2010; Orhan *et al.* 2010). Sebagai contoh, baru-baru ini ditemukan obat yang berasal dari Actinobacteria yaitu marinomycin A-D yang merupakan kelas baru poliketida. Senyawa ini diisolasi dari *Marinospora* dan menunjukkan aktivitas antibakteri (Gram positif) dan juga patogen yang resisten obat MRSA dan VRE. Bahkan senyawa ini menunjukkan aktivitas yang potensil dan aktiivtas selektif tinggi terhadap cell line misalnya sel melanoma (Fenical *et al.* 2009).

Urauchimycin merupakan anggota kelompok antimycin, yang diketahui bersifat antifungi (Barrow *et al.*, 1997). Senyawa ini aktif menghambat aliran elektron pada rantai respirasi mitokondria. Antimycin diproduksi oleh *Streptomyces* yang diisolasi dari integumen semut attine (Schoenian *et al.*, 2011).

Urauchimycin A dan B diperoleh strain *Streptomyces* sp. yang diisolasi dari spon laut. Pada tahun 2006, berhasil ditemukan dua urauchimycin baru yaitu urauchimycin C, diisolasi dari *Streptomyces* sp. B1751 asal sedimen laut, sedangkan urauchimycin D, di isolasi dari *Streptomyces* sp. AdM21 yang diperoleh dari sampel tanah (Yao *et al.*, 2006). Kajian yang dilakukan oleh Imamura dan timnya 1993 mengungkap bahwan urauchimycin A dan B menekan diferensiasi morfologi *C.albicans* pada konsentrasi 10 µg/mL.

## B. Lingkungan dan Actinobacteria

*Actinobacteria* berperan penting di lingkungannya karena mampu melakukan biotransformasi dan proses metabolisme dalam kisaran sangat luas (Bentley *et al.*, 2002). Populasi *Actinobacteria* di alam dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu, pH, kandungan organik dan kedalaman. *Actinobacteria* tumbuh pada tanah yang lembab karena untuk pertumbuhannya memerlukan air. Selain itu *Actinobacteria* banyak ditemukan pada permukaan tanah lembab karena pada daerah ini terdapat kombinasi pH dan kandungan air yang cocok untuk pertumbuhan. Umumnya *Streptomyces* tumbuh baik pada pH yang agak basa, tetapi ada pula pada pH kurang dari 5. Lee & Hwang, (2002) mendapatkan isolat *Actinobacteria* dengan kisaran pH pertumbuhan pada tanah, kelembaban dan kandungan bahan organik masing-masing 4,0-7,0; 2,0-20 dan 4,0-11,0%.

Lee & Hwang, (2002) mengisolasi berbagai *Actinobacteria* pada tanah-tanah di bagian barat Korea. Jumlah *Actinobacteria* yang ditemukan berkisar antara  $1,17 \times 10^6$  –  $4,20 \times 10^6$  cfu/g kering tanah. Sebanyak 1510 isolat *Actinobacteria* telah diisolasi dan sebagian besar genus *Streptomyces*. Sementara itu Nishimura *et al.* (2002) menemukan *Streptomyces* paling banyak di daerah sekitar perakaran tanaman. *Actinobacteria* tidak hanya ditemukan pada habitat tanah, namun juga pada organisme lain seperti manusia dan hewan.

Selman Waksman pada awal abad ke 20 memiliki sumbangan besar terhadap penjelasan mengenai ekologi Actinobacteria. Bahkan dia telah mempublikasi lebih dari 200 paper dan banyak buku yang terkait banyak mengenai Actinobacteria tanah.

Actinobacteria ditemukan pada habitat yang cukup luas, misalnya pada tanah-tanah beku di daerah kutub, tanah kering di gurun, minyak mentah, tanah terkontaminasi logam berat, sedimen air tawar dan air laut. Umumnya Actinobacteria bersifat sebagai saprofit dan beberapa yang membentuk asosiasi parasitik maupun simbiosis dengan hewan maupun tanaman. Penyebaran Actinobacteria di lingkungan perairan laut dan ekologiannya sangat memegang peranan penting namun belum banyak dikaji. Actinobacteria menghasilkan spora resisten yang tetap hidup dan

mampu bertahan selama bertahun-tahun. Hal ini dapat dikatakan bahwa Actinobacteria yang ditemukan diperairan laut merupakan spora-spora yang berasal dari lingkungan darat yang telah mengalami pencucian di lautan.

## C. Pertanian dan Actinobacteria

### 1. Actinobacteria rizosfer

Definisi rizosfer dipertelakan oleh Hiltner pada tahun 1904 sebagai bagian dari tanah yang dipengaruhi oleh akar, dan sebagai titik sentral terjadinya proses-proses penting terbentuknya nutrisi tanaman. Pengaruh rizosfer menggambarkan fenomena yang terjadi sebagai interaksi antara tanah, biomassa dan aktivitas mikrobia yang meningkat sebagai akibat dari eksudasi senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh akar tanaman (Berg *et al.*, 2005). Interaksi yang amat kompleks tersebut terjadi di dalam rizosfer yaitu, interaksi antara patogen tanah dan antagonisnya menjadi bagian yang sangat penting untuk ketersediaan nutrisi dan kesehatan tanaman (Whipps, 2001).

Tanah merupakan habitat kompleks sebagai tempat terjadinya interaksi berbagai macam bakteri, fungi, protozoa dan alga. Hanya 10% mikrobia tanah yang dapat dikultur sehingga masih terbuka lebar untuk dipelajari menyangkut tanah sebagai lingkungan untuk kehidupan mirobia. Mikrobia ditemukan hidup secara bebas atau menempel pada permukaan partikel-partikel tanah, tetapi sebagian besar bakteri tanah melakukan interaksi dengan akar-akar tanaman yang dikenal dengan istilah *rizosfer*. Mikrobia ini biasa dinamakan *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR).

Rizosfer merupakan bagian dari tanah yang dipengaruhi oleh akar, dan sebagai titik sentral terjadinya proses-proses penting terbentuknya nutrisi tanaman. Lynch, 1990 membagi rizosfer menjadi endorizosfer, rizoplan dan ektorizosfer berdasarkan kaitan dengan bagian jaringan akar, permukaan akar dan yang berasosiasi dengan akar. Pengaruh rizosfer menggambarkan fenomena yang terjadi sebagai interaksi antara tanah, biomassa dan aktivitas mikrobia yang meningkat sebagai akibat dari eksudasi senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh akar tanaman (Berg *et al.*, 2005). Interaksi yang amat kompleks tersebut terjadi di dalam rizosfer yaitu,

interaksi antara patogen tanah dan antagonisnya menjadi bagian yang sangat penting untuk ketersediaan nutrisi dan kesehatan tanaman (Whipps, 2001).

Penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi bakteri yang ditemukan disekitar akar tanaman umumnya lebih besar dibandingkan dengan tanah disekitarnya. Bahkan jumlah Actinomyetes rizosfer dapat mencapai dua kali lipat (Crawford *et al.*, 1993) atau tiga kali lipat (Sembiring, 2009) dibandingkan dengan daerah di luar rizosfer. Hal ini diduga karena daerah tersebut mendukung laju pertumbuhan dan aktivitas mikrobial yang lebih tinggi dibanding dengan daerah yang jauh dari akar.

Ketersediaan sumber C, N, dan energi yang berasal dari akar yang berguna untuk mikrobial patogen maupun non-patogen (Lynch, 1983). Meski demikian, maka alasan utama yang dapat diterima adalah meningkatnya laju ketersediaan senyawa organik terlarut yang berasal dari eksudasi akar tanaman. Dalam hal ini yang menjadi tipikal adalah monomer karbohidrat, asam amino dan gula-gula. Komposisi dan jumlah eksudat akar sangat tergantung pada spesies tanaman juga kondisi abiotik seperti kandungan air, dan suhu (Söderberg & Bååth 1998).

Mikrobial rizosfer meningkatkan eksudasi akar melalui pembentukan hormon tanaman atau secara langsung melalui kerusakan fisik akar (Grayston *et al.*, 1996). Secara umum, rizosfer kaya nutrisi secara alami melakukan kolonisasi oleh kemanfaatan bakteri dan fungi patogen yang berpengaruh pada pertumbuhan, perkembangan dan produktivitas tanaman. Beberapa interaksi antara bakteri, fungi dan akar dapat memberi manfaat, kerugian atau pengaruh netral terhadap tanaman yang sangat tergantung pada tipe interaksi simbiosis serta kondisi tanah (Smolander & Sundman, 1987)

*Actinobacteria* diketahui sebagai kelompok mikrobial yang tersebar luas di alam dan juga dikenal sebagai saprofit di tanah. Umumnya *Actinobacteria* di dalam tanah didominasi oleh kelompok Streptomyces. *Actinobacteria* banyak ditemukan di daerah rizosfer tanaman dan banyak mendapat perhatian karena dapat dimanfaatkan untuk menghambat pertumbuhan fungi patogen tanaman (Suzuki *et*

*al.*, 2000). Kemampuan menghambat pertumbuhan fungi patogen tersebut disebabkan oleh senyawa antifungi ataupun enzim-enzim yang dihasilkan oleh mikrobia ini yang dapat merusak dinding sel fungi (Getha *et al.*, 2005).

Tumbuhan dan mikrobia diketahui menunjukkan interaksi yang sangat kompleks dengan lingkungan dengan menghasilkan produk alami berupa senyawa-senyawa yang sangat bermanfaat terhadap kelangsungan hidup antar keduanya. Peranan senyawa tersebut menunjukkan aktivitas biologik yang cukup besar, sehingga dapat digunakan untuk pengembangan atau proses lebih lanjut untuk penemuan obat-obatan (Pupo *et al.*, 2006).

Hasil penelitian yang dilaporkan oleh Ali *et al.*, 2012 menunjukkan bahwa Actinobacteria yang diisolasi pada rizosfer tanaman kayu putih menunjukkan keragaman dan kemampuan menghasilkan antifungi. Sebanyak 20 isolat yang umumnya diduga genus *Streptomyces* diketahui menghambat berbagai jenis fungi. Satu isolat yang diberi kode strain GMR22 diketahui menghasilkan senyawa antifungi dan antibakteri (Gram positif). Senyawa antifungi yang dihasilkan merupakan kelompok geldanamycin.

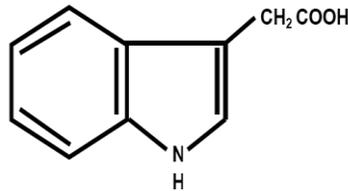
## 2. Actinobacteria endofit

Mikrobia endofit merupakan mikrobia yang hidup di dalam jaringan tumbuhan selama periode tertentu dari siklus hidupnya. Endofit membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya. Dalam suatu jaringan tanaman dapat ditemukan beberapa jenis mikrobia endofit yang memiliki asosiasi dengan tumbuhan seperti mutualisme.

Beberapa peneliti membuktikan bahwa penyakit yang disebabkan oleh fungi, bakteri, virus dan bahkan beberapa kerusakan yang disebabkan oleh serangga atau nematoda dapat dicegah dengan cara melakukan inokulasi endofit pada tanaman (Kerry, 2000; Sturz *et al.*, 2000; Ping & Boland, 2004; Berg & Hallmann, 2006). Asosiasi mikrobia pada tanaman telah dilaporkan antara lain: pada kelompok Actinobacteria seperti *Saccharopolyspora endophytica* sp. nov berhasil diisolasi dari akan tanaman *Maytenus austroyunnanensis*, suatu jenis tanaman obat tradisional di Chinese (Qin *et al.* 2008). Ezra *et al.* 2004

berhasil mengisolasi Actinobacteria dari tumbuhan semacam anggur (*Monstera* sp.) yang menghasilkan coronamycin yang menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap fungi Pythiaceus. Senyawa tersebut diketahui pula menghambat pertumbuhan jamur patogen manusia, *Cryptococcus neoformans*.

Menurut Hasegawa *et al*, 2006 Actinobacteria yang hidup bebas telah digunakan dalam bidang pertanian untuk menghasilkan senyawa pemacu pertumbuhan seperti auksin dan giberellin. Demikian juga dengan Actinobacteria endofit memiliki kemampuan menghasilkan berbagai metabolit termasuk promotor pertumbuhan tanaman, antibiotik, enzim hidrolitik. Senyawa bioaktif berupa IAA (Indol-3-Acetic Acid) yang dihasilkan oleh Actinobacteria dapat memicu pertumbuhan tanaman. IAA berfungsi sebagai pengatur proses fisiologis tanaman.



Gambar 4.2. Struktur kimia auksin, indole-3-acetic acid

Auksin merupakan kelompok senyawa cincin indol yang memiliki kemampuan meningkatkan pertumbuhan tanaman dengan cara memicu pemanjangan sel, inisiasi akar, perkecambahan dan pertumbuhan biji. Senyawa ini juga menekan pertumbuhan akar tetapi memacu pertumbuhan rambut akar sehingga meningkatkan kemampuan tanaman menyerap nutrisi tanah. Selain itu ada beberapa proses perkembangan yang disebabkan oleh pengaruh auksin, misalnya perkembangan embrio dan buah, organogenesis, diferensiasi jaringan pembuluh dan tropistik (Paciorek *et al.*, 2006; Dobbelaere *et al.*, 1999; Bennett *et al.*, 1998).

Diperkirakan sekitar 80% bakteri rizosfer mampu mensekresikan IAA. *Streptomyces* spp. yang menghuni rizosfer

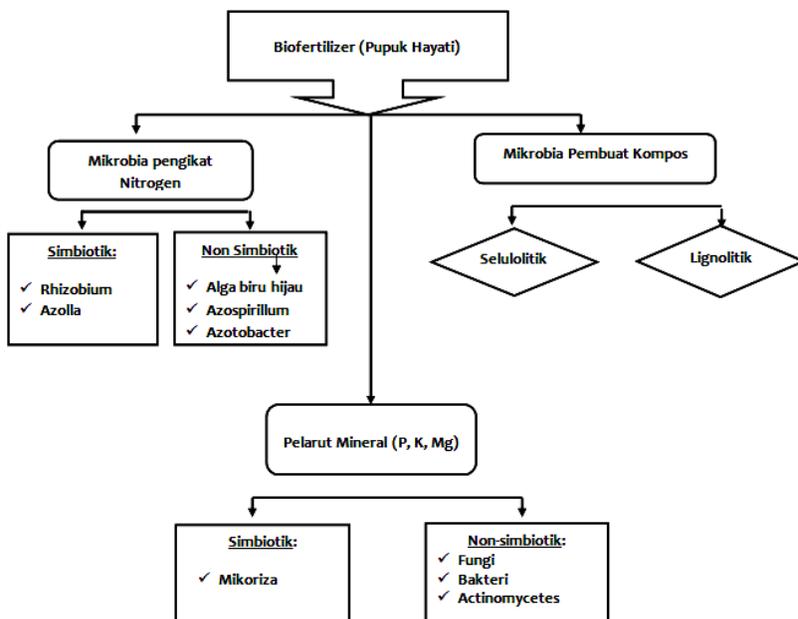
berbagai jenis tanaman dianggap sebagai mikrobia penghasil IAA paling baik.

Hasil penelitian yang dilaporkan oleh Ali *et al* 2014, menemukan isolat Actinobacteria penghasil IAA yang diisolasi dari endofit tanaman ekosistem karst. Sebanyak 15 isolat yang mampu menghasilkan IAA dengan konsentrasi rendah sampai tinggi (17,65-89,29  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). isolat tersebut memiliki keragaman warna seperti putih, merah, kuning dan hitam.

### **3. Actinobacteria sebagai Biofertilizer**

Kesuburan tanah merupakan salah satu faktor utama dalam bidang pertanian. Tanah yang miskin hara berperan penting menurunkan produksi terutama di negara berkembang. Peranan hara pada budidaya tanaman sangat penting dan terdapat 16 hara penting yang harus tersedia untuk mencapai target produksi yang diinginkan. Banyak kajian membuktikan bahwa N, P dan K merupakan unsur yang membuat tanaman tahan terhadap tekanan lingkungan. Hara penting seperti N, P, K, Ca, Mg dan S digolongkan sebagai makronutrien, sedangkan Fe, Zn, Cu, Mo, Mn, B dan Cl sebagai mikronutrien.

Penggunaan pupuk kimiawi yang terus-menerus dalam bidang pertanian menjadi penyebab kerusakan ekologis sistem pertanian. Penggunaan pupuk kimiawi dalam jangka panjang berpotensi serius mencemari lingkungan, penurunan kualitas tanah dan ketersediaan air. Oleh karena itu, berbagai upaya untuk mengganti pupuk kimia tersebut dengan bahan yang ramah lingkungan seperti biofertilizer (pupuk hayati). Biofertilizer merupakan pupuk ramah lingkungan yang tidak hanya mencegah kerusakan sumber alami tetapi lebih dari itu mampu membersihkan lingkungan dari presipitasi pupuk kimiawi (Food and Agricultural Organization, 2008).



Gambar 4.3. Aktivitas mikrobia yang berkaitan dengan biofertilizer

Pupuk hayati mengandung mikrobia hidup hasil seleksi yang berperan memicu pertumbuhan tanaman melalui mekanisme meningkatkan ketersediaan kebutuhan hara primer (nitrogen dan pospor) pada tanaman inang. Pupuk hayati juga berperan menyediakan hara yang dibutuhkan tanaman dan membantu meningkatkan kualitas tanah dengan mikrobia alami. Lingkungan bersahabat ini diciptakan oleh mikrobia untuk mengubah elemen penting dari bentuk yang tidak terpakai menjadi bentuk yang tersedia untuk digunakan dalam proses biologik. Pupuk hayati dapat pula bertindak sebagai penjaga tanah agar udara dan air bersinergi membuat tanah menjadi kompak dan mencegah erosi.

Beberapa mikrobia digunakan untuk pupuk hayati seperti kemampuan mengikat nitrogen, pelarut posfat dan mikoriza mampu mengikat nitrogen atmosferik atau melarutkan posfat di dalam tanah. Ketersediaan P dalam tanah umumnya sangat rendah karena P

biasanya terikat menjadi Fe-Posfat dan Al-Posfat pada tanah masam atau Ca-P [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] pada tanah basa. Posfor di dalam tanah diserap oleh tanaman dalam bentuk ion ortoposfat terlarut seperti  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ ,  $\text{HPO}_4^{-2}$  dan  $\text{PO}_4^{-3}$ . Secara umum, tingkat ketersediaan ion ini untuk diserap oleh tanaman meliputi  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1} > \text{HPO}_4^{-2} > \text{PO}_4^{-3}$ . Keberadaan tipe ion ortoposfat tergantung pada reaksi tanah. Pada kondisi pH rendah 4-5, maka biasanya ortoposfat berbentuk ion  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ . Meningkatnya pH maka ion  $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$  diubah menjadi ion  $\text{PO}_4^{-3}$  yang menyebabkan tanah menjadi basa.

Actinobacteria sebagai salah satu mikrobia yang dapat digunakan untuk pupuk hayati karena mikrobia ini diketahui mampu menghasilkan senyawa yang dapat melarutkan posfat. Actinobacteria menghasilkan enzim pospatase dan asam-asam organik yang dapat melarutkan posfat. Beberapa peneliti membuktikan bahwa Actinobacteria mampu melarutkan mineral/hara baik secara *in vitro* maupun aplikasi secara *in planta*.

Pencarian Actinobacteria pada daerah rizosfer pada beberapa jenis tanaman di Sulawesi Selatan dan Sulawesi Barat yang dilaporkan oleh Ali *et al*, 2014 menemukan ratusan isolat Actinobacteria dengan karakter koloni yang beragam. Hasil pengujian kemampuan melarutkan posfat ditemukan beberapa isolat yang memiliki ratio hidrolisis posfat tinggi pada uji secara *in vitro*.

Actinobacteria yang diisolasi dari endofit tumbuhan pada ekosistem karst diperoleh 11 isolat yang menunjukkan aktivitas pelarut posfat. Satu isolat yang diberi kode SBx menunjukkan aktivitas pelarut posfat tertinggi dengan nilai ratio hidrolisis sekitar 2, 27 pada uji *in vitro*. Isolat dengan kode MRS1 yang diisolasi dari sampel rizosfer tanaman ubi kayu menunjukkan aktivitas pelarut posfat yang tinggi seperti tertera pada Gambar 4.4.



**Isolat SBx**

**Isolat MRS1**

Gambar 4.4. Isolat pelarut posfat hasil isolasi dari risofer dan endofit (Dokumen Penulis).

#### **4. Actinobacteria sebagai Biokontrol (Pengendali Hayati)**

Banyak laporan peneliti membuktikan bahwa spesies Actinobacteria memiliki kemampuan secara efektif mengendalikan perkembangan fungi dan bakteri patogen pada tanaman. Dalam banyak kasus, tingkat pengendalian hayati yang ditemukan pada berbagai Actinobacteria baik kajian di laboratorium maupun pada lingkungan terkontrol lainnya diperoleh indikasi bahwa penggunaan Actinobacteria bersifat andal dan efektif. Oleh karena itu penggunaan Actinobacteria untuk pengendalian patogen tanaman dapat dijamin sebagai alternatif pengganti pestisida kimiawi.

Oleh karena itu, beberapa patogen tanaman berhasil dikendalikan oleh spesies Actinobacteria, tetapi berbagai upaya yang dilakukan untuk mengembangkan formulasi pengendalian hayati tersebut menemui kendala dalam penggunaannya di lapangan. Untuk mengembangkan Actinobacteria sebagai bahan biokontrol untuk tujuan komersil, maka konsistensi formula ini harus terus dikembangkan. Untuk mencapai hal tersebut, maka dibutuhkan penelitian dalam area yang lebih beragam. Hal ini disebabkan pengendalian secara hayati memiliki interaksi yang rumit diantara inang, patogen, antagonis dan lingkungan.

Kasugamycin merupakan metabolit dari *Streptomyces kasugaensis* yang bersifat antibakteri dan antifungi. Antibiotik ini sifat toksikologiknya sangat unggul yaitu bertindak sebagai suatu inhibitor biosintesis protein pada mikrobia, tetapi tidak toksis pada mamalia. Senyawa ini telah dikembangkan oleh industri kimiawi Hokko yang memformulasi produk berbahan aktif kasugamycin untuk pengendalian *Pyricularia oryzae* penyebab penyakit karat padi dan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas* pada tanaman.

Polyoxin B dan D yang diisolasi dari metabolit *Streptomyces cacaoi* var *asoensis* pada tahun 1965 oleh Isono sebagai kelompok baru fungisida alami. Cara kerja polyoxin yang bagus ini memungkinkan senyawa tersebut diterima sebagai bahan yang lebih ramah lingkungan. Senyawa ini bekerja dengan cara mengganggu proses sintesis dinding sel fungi melalui penghambatan secara spesifik kitin sintase. Polyoxin B dapat juga digunakan untuk mengendalikan beberapa fungi yang merusak buah-buahan dan sayuran, sedangkan Polyoxin D dipasarkan oleh beberapa perusahaan untuk tujuan pengendalian *Rhizoctonia solani*.

Familia Validamycin yang ditemukan oleh peneliti, Takeda pada tahun 1968 digunakan untuk menghambat trehalase pada sel fungi. Senyawa ini cukup selektif karena tidak mengganggu aktivitas fisiologik vertebrata. Senyawa lainnya adalah mildiomycin yang diisolasi dari *Streptoverticillium rimofaciens* cukup kuat mengendalikan penyakit powdery mildew pada beberapa tanaman pangan. Cara kerja senyawa ini adalah menghambat biosintesis protein fungi.

Contoh utama bahan pengendali hayati dari *Streptomyces* adalah *Streptomyces griseoviridis*. Strain ini diisolasi dari Sphagnum peat dan dilaporkan digunakan untuk pengendalian patogen tanaman seperti *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinerea* Pers., *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*, *Pythium debaryanum*, *Phomopsis sclerotioidea*, *Rhizoctonia solani* dan *Sclerotinia sclerotiorum* (Tahvonen and Avikainen 1987).

*Streptomyces griseoviridis* strain K61 telah digunakan pada nutrisi tumbuh bunga potong, tanaman dalam pot, timun serta berbagai tanaman sayuran. Bahkan strain ini telah diproduksi dengan nama Mycostop™ sebagai biofungisida berbahan aktif *S. griseoviridis*

Suatu mikrobia yang memiliki sifat mampu melakukan kolonisasi pada akar dipandang sangat ideal digunakan sebagai bahan pengendali hayati penyakit asal tanah. *S. griseoviridis* merupakan contoh baik Actinobacteria yang mampu berkolonisasi pada akar tanaman. Strain ini bersifat antagonis terhadap mikrobia dan efektif menghambat penyakit tanaman seperti layu *Fusarium*, *damping-off* pada kol dan penyakit busuk akar timun.

Banyak spesies *Streptomyces* yang bersifat dekomposer lignoselulosa dan penghasil antibiotik. Strain dengan dua kemampuan sekaligus tersebut misalnya mampu mengurai lignoselulosa dan penghambat fungi patogen akar berpotensi baik digunakan untuk pengembangan produk pengendali hayati. (Chamberlain dan Crawford 2000).

Protein yang diproduksi oleh Actinobacteria dapat juga digunakan sebagai bahan pengendali hayati. Sebagai contoh, Vernekar *et al.*, 1999 menemukan penghambat protease alkalin (API) suatu kelompok baru protein antifungi yang menghambat fungi fitopatogenik seperti *Alternaria*, *Fusarium*, and *Rhizoctonia*. Aktivitas API terjadi dengan cara menghambat serine alkalin protease dari fungi, yang sangat diperlukan oleh fungi untuk pertumbuhannya.

*Streptomyces violaceusniger* YCED9 merupakan salah satu model yang baik sebagai contoh potensi *Streptomyces* sebagai bahan pengendali hayati. Strain diisolasi pada tahun 1990 pada tanah rizosfer. Strain ini digunakan untuk menekan *damping off* pada selada yang disebabkan oleh *Pythium ultimum* (Crawford *et al.*, 1993). Kajian lebih lanjut menunjukkan bahwa strain ini menghasilkan 3 senyawa antimikrobia yaitu nigericin, geldanamycin dan suatu fungisida kompleks yang menyerupai senyawa polyene yang disebut AFA (*Anti-Fusarium Activity*).

Riset yang dilakukan oleh Ali *et al* 2015 terhadap kemampuan actinomycetes yang berasosiasi dengan tumbuhan, terutama markisa diperoleh beberapa strain *streptomyces* yang menghambat pertumbuhan fungi penyebab layu markisa, *Fusarium* sp. Pengujian secara *in vitro* menunjukkan bahwa strain tersebut selain

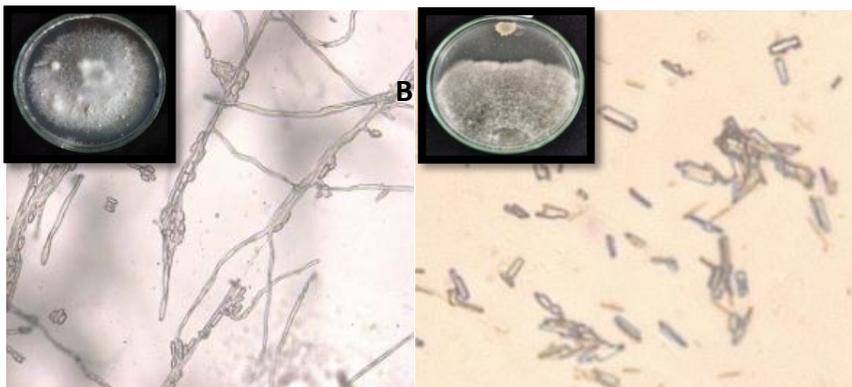
menghambat fungi juga menunjukkan kemampuan menghasilkan senyawa Plant Growth Promoting (IAA).

Hasil uji antagonis antara isolat *Actinomycetes* terhadap fungi uji *Fusarium oxysporum f. sp. Passiflorae* diketahui bahwa isolat *Actinomycetes* EML-D<sub>1</sub>A<sub>5</sub> menghambat fungi uji sebesar 83%; isolat EML-A<sub>1</sub>N<sub>3</sub> (81%); isolat EML-A<sub>2</sub>P<sub>1</sub> (70%); isolat EML-D<sub>1</sub>A<sub>3</sub> (66%) dan isolat *Actinomycetes* EML-A<sub>1</sub>L<sub>1</sub> (53%) seperti tertera pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Uji antagonis strain *Streptomyces* spp yang direcovery dari tumbuhan Markisa ungu

No	Kode isolat	Diameter zona hambatan (%)
		<i>Fusarium oxysporum</i>
1.	EML-D <sub>1</sub> A <sub>5</sub>	83
2.	EML-A <sub>1</sub> N <sub>3</sub>	81
3.	EML-A <sub>2</sub> P <sub>1</sub>	70
4.	EML-D <sub>1</sub> A <sub>3</sub>	66
5.	EML-A <sub>1</sub> L <sub>1</sub>	53

Pengamatan secara mikroskopik miselium fungi *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae* yang diambil disekitar zona hambatan pada uji antagonis secara in vitro tertera pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 A. Miselium *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae* tanpa diberi strain *Streptomyces*, B Miselium *Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae* yang diberi strain *Streptomyces* setelah uji antagonis. (Dokumen Penulis)

## 5. Actinobacteria penghasil pestisida

Berbagai jenis mikrobia seperti fungi, bakteri, nematoda dan virus yang telah diteliti menunjukkan aktivitas antagonistik terhadap serangga. Salah satu kelompok bakteri yang memegang peranan penting dalam pengendalian serangga secara hayati adalah Actinobacteria.

Selama kurun waktu tahun 1988 sampai 1992 telah ditemukan lebih dari 1000 metabolit sekunder yang dihasilkan oleh Actinobacteria. Berkisar 60% dari insektisida dan herbisida baru yang dilaporkan justru dihasilkan oleh *Streptomyces*.

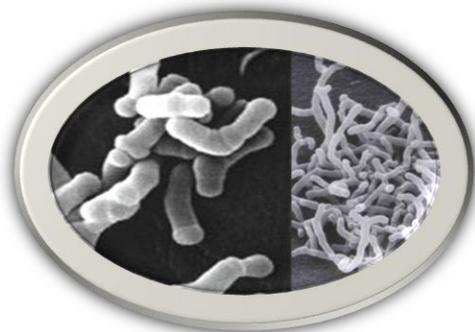
Actinobacteria diketahui memproduksi senyawa yang bersifat insektisida terhadap lalat rumah *Musa domestica*. Mortalitas larva dan pupa mencapai 90% lebih setelah diberi perlakuan dengan Actinobacteria (Hussain *et al.*, 2002). Demikian juga Actinobacteria diketahui efektif memberantas *Culex quinquefasciatus* (Sundarapandian *et al.*, 2002). Chitinase merupakan enzim yang dihasilkan oleh strain Actinobacteria. Enzim ini mampu memecah struktur kitin polisakarida selama proses molting dari serangga sehingga dimanfaatkan untuk mengendalikan fungsi patogen tanaman.

Menurut Okazaki, beberapa strain Actinobacteria menghasilkan herbisida. *Herbicidin* H merupakan suatu metabolit yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. strain SANK 63997 yang diisolasi dari daun *Setaria viridis* var. *pachystachys*. *Microbispora* sp. Strain SANK 62597 yang diisolasi dari *Carex kobomugi* menghasilkan *g*-glutamylmethionine sulfoximine pada cairan kultur fermentasi.

## D. PANGAN DAN ACTINOBACTERIA

Actinobacteria merupakan bakteri yang dapat digunakan dalam industri pangan (susu probiotik atau yoghurt) seperti: Bifidobacteria.

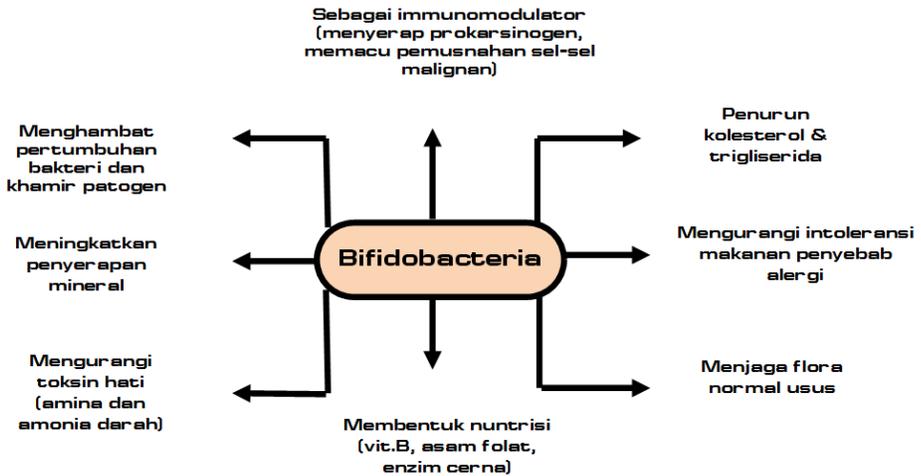
Secara alamiah *Bifidobacteria* sp merupakan mikrobia yang mendominasi mikrobiota yaitu mencapai 26% lebih pada orang dewasa dan 80% pada bayi (sekitar  $10^8$  sampai  $10^9$  cfu/g). Bakteri ini memiliki karakteristik Gram positif, bersifat anaerobik, tidak bergerak (non motil), berbentuk batang tanpa spora. Bakteri ini memiliki persen G+C tinggi seperti pada anggota Actinobacteria lainnya yang mencapai 55-67%. Secara umum sel tampak berpasangan dan membentuk seperti huruf V atau Y (Gambar 4.6). Secara umum *Bifidobacteria* sp tumbuh pada kisaran suhu optimal mencapai 37 sampai 41°C dan pH 6,5-7.



Gambar 4.6. Karakteristik morfologi sel *Bifidobacteria* sp

Secara fisiologik *Bifidobacterium* bersifat sakarolitik dan mampu menghasilkan asam laktat dan asam asetat tanpa CO<sub>2</sub>. Bakteri ini termasuk organisme fastidious (rewel), sehingga tidak dapat tumbuh di sembarang media. Salah satu media yang dapat digunakan untuk menumbuhkan *Bifidobacterium* adalah agar MRS (de Man, Rogosa and Sharpe).

Penelitian menunjukkan bahwa *Bifidobacteria* sp sebagai probiotik memiliki manfaat yang sangat vital mencegah dan memelihara gangguan saluran cerna pada manusia atau hewan (Gambar 4.7)



Gambar 4.7. Peranan Bifidobacteria pada manusia dan hewan

Bakteri ini pertama kali ditemukan oleh Tissier dari feses bayi. Bakteri yang ditemukannya tersebut memiliki karakter morfologi *bifid* (artinya dapat dibagi menjadi dua bagian oleh sekat tengah), sehingga kemudian dinamakannya sebagai *Bacillus bifidus*. Bakteri ini pernah dimasukkan ke dalam genus *Bacillus*, *Bacteroides*, *Nocardia*, *Lactobacillus*, dan *Corynebacterium*. Pada tahun 1974 bakteri tersebut dipisahkan menjadi genus baru yaitu *Bifidobacteria*.

*Bifidobacterium bifidum* dominan pada membran mukus di sekitar usus besar dan saluran vagina. Spesies ini dimanfaatkan sebagai probiotik yang mampu meningkatkan asimilasi mineral yang penting untuk kesehatan tulang, contohnya besi, kalsium, magnesium, dan seng. Kajian menunjukkan bahwa pemberian secara oral B. longum berkorelasi terhadap peningkatan kekuatan tulang pada tikus model osteoporesis (Igarashi *et al.*, 1994). Peningkatan kekuatan dan kerapatan tulang tersebut diyakini akibat pengaruh peningkatan absorpsi mineral oleh pengaruh Bifidobacterium. Mekanisme ini berkaitan dengan peningkatan kelarutan mineral akibat asam lemak rantai pendek yang diproduksi bakteri. Selain itu terjadinya perluasan permukaan absorpsi oleh proliferasi enterosit yang dipengaruhi oleh produk fermentasi bakteri yaitu laktat dan butirir. Hal lainnya adalah

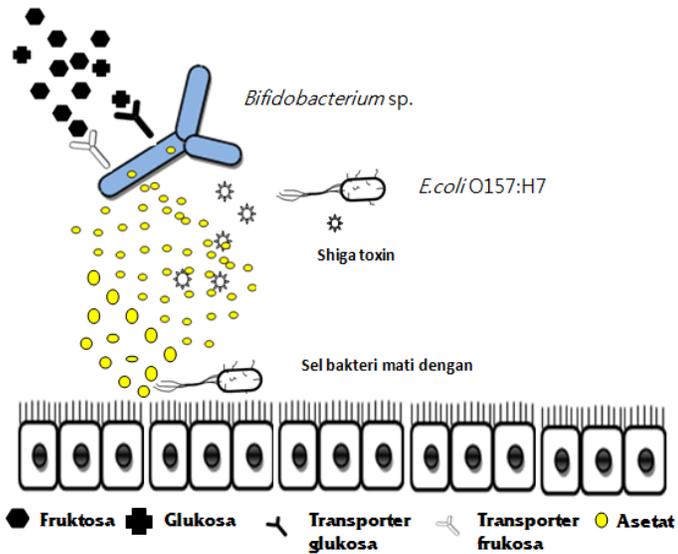
peningkatan ekspresi *calcium binding protein*. Sementara itu peningkatan kerapatan tulang disebabkan oleh pembentukan vitamin seperti C, D, K dan folate yang terlibat dalam metabolisme kalsium (Scholz-Ahrens *et al.*, 2007)

*Bifidobacterium infantis* Spesies ini memengaruhi sistem imun karena mampu menstimulasi agen imunomodulasi seperti sitokin dan memiliki efek antibakteri terhadap patogen seperti *Clostridium*, *Shigella*, dan *Salmonella*.

*Bifidobacterium lactis* ditemukan dalam jumlah besar di usus besar manusia. Spesies ini bermanfaat bagi penderita eksim, serta dapat meningkatkan imunitas tubuh dengan meningkatkan sel limfosit-T dan sel pembunuh alami (*natural kill cell*, NK). Bakteri ini sangat potensial sebagai probiotik karena tahan asam lambung dan garam empedu sehingga dapat sampai ke saluran pencernaan setelah dikonsumsi. *B. lactis* terbukti bermanfaat meringankan sejumlah masalah kesehatan termasuk alergi gluten, mengurangi risiko kanker, meningkatkan sistem pencernaan secara keseluruhan, dan meningkatkan fungsi sistem kekebalan tubuh.

*Bifidobacterium longum* memiliki aktivitas antimikroba yang efektif untuk mengobati diare dan penyakit mewabah lainnya. Spesies ini juga dapat menstimulasi sistem imun dan mencegah beberapa jenis kanker. Apabila tubuh memiliki *Bifidobacterium* dalam jumlah yang cukup, maka bakteri tersebut dapat menempel pada [usus](#) dan berkompetisi mendapatkan makanan dan tempat untuk hidup dengan organisme patogen lain. Patogen yang tidak dapat bertahan akan keluar dari dalam tubuh melalui saluran pencernaan (Gambar 7.8).

*Bifidobacterium* juga dapat hidup di tempat yang tidak ada oksigen dan di lingkungan asam karena menghasilkan asam asetat dan asam laktat. Tubuh akan terlindungi dari bakteri lain yang memerlukan oksigen atau lingkungan basa untuk hidup.



Gambar 4.8. Mekanisme peran Bifidobacteria pada usus manusia dan hewan



Gambar 4.9. Produk komersil probiotic Bifidobacterium

*Bifidobacterium* spp telah dibuat produk komersil dalam bentuk sediaan cair atau padat. Produk ini biasanya menggunakan bakteri yang diisolasi dari flora mikrobia manusia atau hewan (Gambar 4.9).

Biakan dalam produk ini dapat berupa biakan tunggal atau campuran beberapa spesies.

Bakteri ini juga memiliki beberapa manfaat positif bagi kesehatan manusia, seperti mampu menghasilkan beberapa vitamin B-kompleks yang bermanfaat bagi tubuh, membantu pengaturan diet bagi sebagian manusia yang menderita kondisi liver tertentu, dan mencegah bakteri yang mengubah nitrat (pada air dan makanan) menjadi nitrit, yang merupakan penyebab kanker. Mekanisme lainnya yang disebut *carcinogenesis*, proses pembentukan kanker tersebut memiliki hubungan dengan flora usus yang diduga sebagai konsekuensi pembentukan enzim-enzim oleh bakteri seperti  $\beta$ -glucuronidase, azoreductase dan nitroreductase. Enzim tersebut bertanggung jawab terhadap transformasi procarcinogen menjadi carcinogen aktif (Picard *et al.*, 2005).

Ditemukan pula beberapa bukti kuat bahwa bifidobacteria dapat memproteksi carcinogen pada inang dengan cara mengurangi pembentukan carsinogen melalui mekanisme penurunan aktivitas enzim spesifik. Penelitian lain membuktikan bahwa konsumsi susu fermentasi yang mengandung bifidobacterium menurunkan aktivitas enzim  $\beta$ -glucuronidase dan nitroreductase yang memicu pembentukan senyawa penyebab kanker pada manusia.

# BAB V

## METODE RISET KERAGAMAN ACTINOBACTERIA

### A. Metode Analisis Keragaman Actinobacteria

#### 1. Isolasi Actinobacteria

Bahan penelitian berupa tanah dari daerah rizosfer berbagai tanaman yang diambil dari beberapa wilayah di Sulawesi-Selatan. Tanah diambil secara aseptis dengan menggali sedalam 15cm di sekitar perakaran tanaman ubi kayu lalu dimasukkan ke dalam plastik untuk dibawa ke laboratorium. Sampel tanah sebanyak 5 g dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 mL. lalu disuspensikan dengan larutan NaCl faali. Suspensi diencerkan secara desimal sampai diperoleh pengenceran  $10^{-6}$ . Sebanyak 0,1 mL dari tiga pengenceran terakhir diinokulasikan secara sebar pada permukaan media cawan SCNA yang diberi 100  $\mu\text{g}$  nistatin/mL media. Tiga pengenceran terkahir dilakukan plating secara pour plate pada masing-masing media yaitu **Starch Nitrate Casein agar** terdiri atas [20 g soluble starch; 0,3 g Casein; 0,5 g NaCl; 1 g  $\text{KNO}_3$ ; 0,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 20 g agar, 1000 mL aquades, (pH media diatur menjadi 7,2-7,4 sebelum sterilisasi)]. Semua cawan media diinokulasikan pada suhu  $35^\circ\text{C}$  selama 7 hari sampai koloni menunjukkan pertumbuhan yang dapat dibedakan dengan koloni lainnya. Isolasi mikrobia yang menunjukkan koloni yang berbeda pada setiap cawan dilakukan pada media yang sama secara berulang-ulang sampai diperoleh koloni tunggal yang menunjukkan kemurnian isolat. Isolat yang telah murni

digoreskan pada media agar miring untuk digunakan sebagai stok penelitian selanjutnya.

## 2. Karakterisasi morfologi dan ornamen rantai spora

Actinobacteria yang telah murni dilakukan karakterisasi morfologi dan fisiologi. Pengamatan morfologi dilakukan dengan menggunakan metode *culture slide*, yaitu: isolat *Actinobacteria* ditumbuhkan pada medium SNA, selanjutnya pada medium ditancapkan kaca slide steril pada media dengan posisi kemiringan 45° berdekatan dengan koloni mikrobia. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 20 hari sampai isolat tumbuh pada kaca slide. Setelah terbentuk spora, maka kaca slide diambil dan diamati pembentukan rantai spora dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400X. Untuk memperjelas hasil pengamatan morfologi dan ornamen rantai spora, maka isolat dilakukan pengamatan dengan menggunakan SEM (*Scanning Electrone Micrograph*).

### Warna miselium

Isolat ditumbuhkan pada medium Oatmeal agar selama 7-10 hari pada suhu 30°C. Pengamatan warna miselium dilakukan dengan mengamati secara visual bagian tepi koloni (miselium udara) dan bagian tengah koloni (substrat miselium) diamati dengan cara membalikkan petri untuk melihat pembentukan *reverse side pigment*. Pengamatan pigmen terlarut dilakukan dengan melihat adanya pembentukan warna terdifusi medium. Isolat yang menghasilkan warna terdifusi pada medium dinyatakan sebagai isolat pembentuk pigmen terlarut sedangkan sebaliknya dinyatakan tidak membentuk pigmen terlarut.

## 3. Karakterisasi biokimiawi

Karakterisasi fisiologis dari *Actinobacteria* dilakukan berdasarkan karakteristik penggunaan sumber C, suhu, pH dan cekaman terhadap NaCl (Shirling dan Gottlieb, 1966) meliputi warna koloni (*color grouping*) diamati pada berbagai medium antara lain ISP2, ISP3, ISP4 dan ISP5, NA, Gzapeks Agar, Bennett Medium, sedangkan pembentukan pigmen melanoid dilakukan uji pada media

pepton-extract yeast-iron agar (ISP6) dan Tyrosine agar (ISP7) (Nishimura *et al.*, 2006).

**Penggunaan sumber karbon dan nitrogen:** Isolat ditumbuhkan pada medium ISP9 (g/L) (sumber karbon 10,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,64;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,38;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5,65;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,0;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,1;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,1;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,0015; Agar 15,0; akuades 1,0 liter; pH 6.8 – 7 dalam tabung reaksi yang diberi sumber karbon atau nitrogen sebanyak 0,1% (w/w).

Sumber karbon dan nitrogen disterilisasi terpisah dengan menggunakan dietileter sebelum dicampur dengan media tumbuh. Medium ISP9 dengan sumber karbon dan nitrogen yang berbeda dibuat media agar miring dalam tabung-tabung reaksi yang bertutup ulir. Satu perlakuan tabung yang tidak diberi sumber karbon sebagai kontrol negatif, sedangkan 1 perlakuan yang diberi D-glukosa sebagai kontrol positif. Selanjutnya isolat ditumbuhkan dengan cara *streak* pada permukaan media, lalu diinkubasi selama 20 hari pada suhu 30°C.

Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan koloni pada media tumbuh pada masing-masing sumber karbon atau nitrogen berbeda. Masing-masing isolat ditumbuhkan dalam tabung-tabung reaksi yang dibuat dengan 5 ulangan.

Keterangan pengamatan dinyatakan sebagai berikut: penggunaan karbon/nitrogen sangat positif dengan tanda (++), yaitu jika pertumbuhan pada media sumber karbon/ nitrogen satu-satunya sama dengan kontrol positif (D-glukosa). Penggunaan karbon/nitrogen positif/moderat dengan tanda (+), jika pertumbuhan isolat kurang baik dibanding dengan kontrol positif, tapi lebih baik dibandingkan dengan medium basal tanpa sumber karbon/nitrogen.

Penggunaan karbon/nitrogen meragukan (+/-), jika pertumbuhan isolat pada sumber karbon yang diuji tidak lebih baik dibandingkan dengan medium basal tanpa karbon/nitrogen dan secara tidak nyata lebih sedikit dari kontrol positif. Selanjutnya penggunaan karbon/nitrogen negatif (-), jika pertumbuhan isolat

mirip atau tidak tumbuh pada media basal tanpa sumber karbon atau nitrogen.

**Hidrolisis pati**, dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat pada medium *Starch agar* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari. Selanjutnya media digenangi dengan larutan J-KJ dan diamati terjadinya zona jernih disekitar koloni yang menunjukkan adanya hidrolisis pati.

**Hidrolisis gelatin**, dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat pada medium *Nutrien Gelatine agar* pada tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari. Isolat diinokulasi secara tusukan (*stab*) pada media tegak, lalu diinkubasi selama 4-5 hari pada suhu optimum. Setelah inkubasi, diamati terjadinya pencairan gelatine setelah dimasukkan ke dalam refrigator selama 2 jam.

**Hidrolisis casein**, dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat pada medium *Casein agar* steril yang telah ditambahkan skim milk yang telah dipanasi pada suhu 115 selama 10 menit. Media dituang ke dalam cawan petri dan biarkan memadat, lalu diinokulasi isolat secara gores. Pengamatan terbentuknya zona bening disekitar koloni isolat yang menunjukkan terjadinya hidrolisis casein.

**Hidrolisis Tween**, media peptone agar disterilisasi terpisah dengan tween-80 yang telah diatur menjadi pH 5,4. Isolat diinokulasikan secara goresan, lalu diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C, lalu diamati perubahan media menjadi warna pink menunjukkan terjadinya hidrolisis tween.

**Uji produksi melanin**, pengujian ini digunakan untuk menentukan apakah suatu isolat menghasilkan pigmen melanin atau tidak. Pengujian dilakukan dengan menggunakan media ISP7 agar miring (g/L) (gliserol 15; L- tyrosine 0,5; L-asparagine 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhidrat) 5,0; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 5,0; NaCl 5; FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 0,1; larutan *trace* garam 1 ml; agar 20; akuades 1,0 liter; pH 7.0. Langkah yang dilakukan adalah: isolat diinokulasi pada tabung reaksi yang berisi

media tersebut diatas dengan cara goresan (digunakan kultur yang berumur kurang dari 3 minggu, kecuali isolat yang lambat membentuk spora). Pengamatan produksi melanin dilakukan setelah inkubasi 2 atau 4 hari pada suhu 30°C, media yang tidak diinokulasi isolat (gunakan sebagai kontrol). Pembentukan pigmen coklat kehijauan atau coklat tua yang terbentuk pada media dinyatakan sebagai positif (+) dan negatif (-) jika tidak terbentuk warna tersebut.

**Ketahanan terhadap senyawa kristal violet**, isolat diinokulasi pada medium ISP2 cair yang mengandung 0 sampai 0,01g/L kristal violet. Selanjutnya isolat diinkubasi selama 10 hari pada suhu 30°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan pada masing-masing konsentrasi kristal violet. Isolat yang mampu tumbuh pada konsentrasi tertinggi dinyatakan sebagai isolat tahan terhadap kristal violet pada konsentrasi tersebut.

**Ketahanan terhadap senyawa NaCl**, isolat diinokulasi pada medium ISP2 cair yang mengandung 0 sampai 15g/L NaCl. Selanjutnya isolat diinkubasi selama 10 hari pada suhu 30°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan pada masing-masing konsentrasi NaCl. Isolat yang mampu tumbuh pada konsentrasi tertinggi dinyatakan sebagai isolat tahan terhadap NaCl pada konsentrasi tersebut.

**Ketahanan terhadap senyawa lizosim**, isolat diinokulasi pada medium ISP2 cair yang mengandung 0 sampai 0,1g/L lizosim. Selanjutnya isolat diinkubasi selama 10 hari pada suhu 30°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan pada masing-masing konsentrasi lizosim. Isolat yang mampu tumbuh pada konsentrasi tertinggi dinyatakan sebagai isolat tahan terhadap lizosim pada konsentrasi tersebut.

**Ketahanan terhadap senyawa fenol**, isolat diinokulasi pada medium ISP2 cair yang mengandung 0 sampai 1g/L fenol. Selanjutnya isolat diinkubasi selama 10 hari pada suhu 30°C.

Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan pada masing-masing konsentrasi fenol. Isolat yang mampu tumbuh pada konsentrasi tertinggi dinyatakan sebagai isolat tahan terhadap fenol pada konsentrasi tersebut

**Ketahanan terhadap senyawa natrium telurit**, isolat diinokulasi pada medium ISP2 cair yang mengandung 0 sampai 0,1g/L natrium telurit. Selanjutnya isolat diinkubasi selama 10 hari pada suhu 30°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan pada masing-masing konsentrasi natrium telurit. Isolat yang mampu tumbuh pada konsentrasi tertinggi dinyatakan sebagai isolat tahan terhadap natrium telurit pada konsentrasi tersebut

**Ketahanan terhadap senyawa natrium azide**, isolat diinokulasi pada medium ISP2 cair yang mengandung 0 sampai 0,2g/L natrium azide. Selanjutnya isolat diinkubasi selama 10 hari pada suhu 30°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan pada masing-masing konsentrasi natrium azide. Isolat yang mampu tumbuh pada konsentrasi tertinggi dinyatakan sebagai isolat tahan terhadap natrium azide pada konsentrasi tersebut.

**Ketahanan terhadap antibiotik (mg/L)**, isolat diinokulasi pada medium ISP2 cair yang mengandung 5 sampai 100mg/L antibiotik. Selanjutnya isolat diinkubasi selama 7 hari pada suhu 30°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan pada masing-masing konsentrasi antibiotik. Isolat yang mampu tumbuh pada konsentrasi tertinggi dinyatakan sebagai isolat tahan terhadap antibiotik pada konsentrasi tersebut.

**Optimasi pH pertumbuhan**, isolat diinokulasi pada medium ISP2 cair yang telah diatur pHnya dari 3 sampai 12. Selanjutnya isolat diinkubasi selama 10 hari pada suhu 30°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan pada masing-masing pH pertumbuhan. Isolat yang mampu tumbuh pada pH terendah dan tertinggi dinyatakan sebagai kisaran pH pertumbuhan isolat.

**Optimasi suhu pertumbuhan**, isolat diinokulasi pada medium ISP2 cair yang telah diatur pH optimumnya. Selanjutnya isolat diinkubasi selama 10 hari pada suhu 0°C sampai 50°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan pada masing-masing suhu pertumbuhan. Isolat yang mampu tumbuh pada suhu terendah dan tertinggi dinyatakan sebagai kisaran suhu pertumbuhan isolat.

#### 4. Analisis Molekular Isolat

Isolat terpilih dilakukan ekstraksi genom sebelum dilakukan amplifikasi gen PKS dan gen 16S rRNA. Isolat ditumbuhkan pada medium TS broth selama 24 jam pada suhu 35°C pada shaker inkubator. Biomassa diunduh dengan menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 20 menit. Pellet yang diperoleh dicuci dua kali dengan aquabides. Selanjutnya pellet tersebut digunakan untuk ekstraksi DNA dengan mengikuti langkah sebagai berikut: sampel dicampur dalam 800  $\mu$ L larutan lisis cair (100 mmol/L Tris-HCl, pH7; 20 mmol/L EDTA; 250 mmol/L NaCl; 2% m/v SDS; 1 mg/mL Lysozyme), 5  $\mu$ L larutan 50 mg/mL RNase ditambahkan, selanjutnya suspensi diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah itu ditambahkan 10  $\mu$ L larutan proteinase K (50 mg/mL) dan larutan lisis diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit. Lisat diekstraksi dengan fenol dengan volume yang sama dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Lapisan cairan (supernatan) diekstraksi kembali dengan fenol (50%-50%v/v), kemudian dengan kloroform (50%-50%v/v). DNA diperoleh dari fase cair melalui penambahan NaCl (150 mmol/L konsentrasi akhir) dan 2 kali volume etanol 95% v/v dingin sebelum disentrifugasi. Presipitat DNA dibersihkan dengan 50  $\mu$ L etanol 70% v/v, lalu disentrifugasi (13.000 rpm 10 menit), diresuspensi dengan 50  $\mu$ L buffer TE (10 mmol/L Tris-HCl pH 7,4; 1 mmol/L EDTA, pH 8) dan disimpan pada suhu -20°C. Kemurnian larutan DNA dicek dengan menggunakan spektrofotometer pada  $\lambda_{260}$  dan  $\lambda_{280}$  nm.

## **Amplifikasi sekuens gen PKS dan 16S rRNA**

Sekuen gen PKS diamplifikasi dengan menggunakan primer K1F (5'TSAAGTCSAACATCGGBCA3'), M6R (5'CGCAGGTTSCSGTACCAGTA3'), sedangkan gen 16S rRNA diamplifikasi dengan menggunakan primer 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Kondisi termal siklus diatur sebagai berikut: denaturasi DNA target pada suhu 95oC selama 3 menit dilanjutkan dengan 30 siklus pada suhu 94oC selama 1 menit, annealing primer pada suhu 56oC selama 1 menit (untuk gen PKS), dan suhu 57oC (untuk gen 16S rRNA) dan ekstensi primer pada suhu 72oC selama 5 menit. Pada akhir siklus, reaksi pencampuran diatur pada suhu 72oC selama 5 menit dan selanjutnya didinginkan pada suhu 4oC. Hasil amplifikasi PCR dideteksi dengan menggunakan gel elektroforesis agarosa dan divisualisasi dengan UV flouorescen setelah diberi warna dengan etidium bromida.

Data sekuen gen PKS dan 16S rRNA isolat terpilih dilakukan alignment sequence dengan menggunakan program CLUSTAL-X versi 1.6 (Thompson et al., 1997). Pohon filogeni dikonstruksi dengan membandingkan sekuen gen yang diperoleh dari Genebank DNA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Pohon filogeni dikonstruksi dengan menggunakan program Phylip versi 3.5 dengan algoritma neighbour joining (Saitou & Nei, 1987). Pohon filogeni divisualisasi dengan program Treeview. Posisi akar pada pohon tanpa akar (unrooted) ditentukan berdasarkan metode neighbour joining. Selanjutnya matrik similaritas dan perbedaan jumlah nukleotida gen ribosomal antar tipe spesies dari database dianalisis dengan program Phytit (The Phylogenetic Molecular Sequences Editor) versi 3,0 (Chun, 1999).

## **B. Keragaman Actinobacteria dari Rizosfer Tanaman**

### **Tanaman ubi kayu**

Hasil isolasi actinobacteria dianalisis keragamannya berdasarkan kategori perbedaan warna dan morfologi koloni. Isolat tersebut diberi kode berdasarkan lokasi sampling (Tabel 5.1)

Tabel 5.1. Isolat kelompok Actinobacteria rizosfer tanaman ubi kayu

No	Kode sampel	Jumlah Isolat
1	TKLR3	3
2	TKLR1A	2
3	TKLR1B	4
4	PTLS2	1
5	SDR1	2
6	SDR2	3
7	GW1	4
8	GW3	6
9	PRG2	3
10	PRG3	2
11	PR1	3
12	PR2	2
13	LRPG 2	3
14	PGKP1	4
15	JNPT1	2
16	JNPT2	1
17	MRS2	1
18	SKG 1	4
<b>TOTAL</b>		50

Terdapat 50 isolat yang menunjukkan karakter koloni dan warna yang berbeda yang diperoleh dari rizosfer tanaman ui kayu. Perbedaan tersebut diduga sebagai perbedaan genus atau spesies. Secara umum, warna koloni yang ditemukan cukup variatif yaitu merah, hijau, coklat, kuning dan putih. Namun secara umum warna putih lebih dominan dibanding warna lainnya. Diduga genus yang diperoleh umumnya kelompok *Streptomyces* spp.

### Tanaman Markisa

Keragaman actinobacteria pada tanaman markisa ditunjukkan pada Gambar 5.1 berikut. Tampak bahwa rizosfer markisa

khususnya markisa ungu menunjukkan keragaman tinggi pada kelompok actinobacteria anggota *Streptomyces* spp. Hal ini ditunjukkan oleh beragamnya warna dan kenampakan koloni yang tumbuh pada media yang sama. Hasil membuktikan bahwa daerah rizosfer tanaman markisa di dominasi oleh kelompok *Streptomyces* dengan ragam strain atau bahkan mungkin ragam spesies. Kehadiran mikroba pada daerah perakaran tanaman menjadi faktor penting dalam proses pertumbuhan tanaman. Beberapa tanaman mengambil keuntungan baik secara langsung maupun tidak terhadap metabolit mikroba tersebut.



Gambar 5.1. Isolat *Actinobacteria* yang di isolasi dari rizosfer tanaman markisa ungu (*Passiflora edulis*)

## Tanaman karst

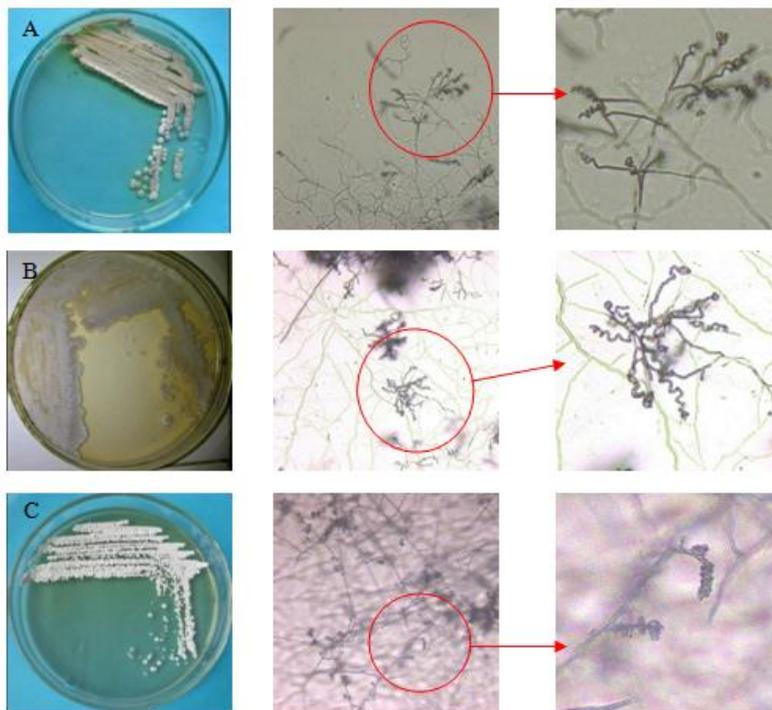
Keragaman Actinobacteria pada tanaman yang tumbuh pada ekosistem karst juga ditemukan cukup tinggi khususnya Actinobacteria penghasil senyawa pemacu tumbuh (hormon) seperti IAA. Hal ini menunjukkan bahwa potensi sumber mikroba pada tanaman untuk diterapkan sebagai agen penghasil senyawa yang bermanfaat bagi pengembangan bioteknologi tanaman cukup potensial. Keragaman Actinobacteria yang diisolasi pada tanaman karst tersebut tertera pada Tabel 5.2

Tabel 5.2. Keragaman Actinobacteria pada tanaman ekosistem karst

No	Kode Isolat	Tanaman	Ciri-ciri	Morfologi Isolat					
1	KMR.1a	<i>Cinnamomum sp</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat</li> <li>Berwarna putih</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>		5	KMR.11	<i>Ficus benjamina</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat</li> <li>Berwarna krem</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>	
2	KMR.1b	<i>Cinnamomum sp</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat</li> <li>Berwarna putih-krem</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>		6	KMR.12	<i>Mitrasa nitida</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat</li> <li>Berwarna putih</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>	
3	KMR.4a	<i>Piper betle</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat</li> <li>Berwarna putih</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>		7	KMR.15	<i>Araceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat</li> <li>Berwarna putih</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>	
4	KMR.4b	<i>Piper betle</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat</li> <li>Berwarna abu-abu mengkilat</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>		8	KMR.22	Tidak teridentifikasi	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat</li> <li>Berwarna kuning</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>	
9	KMR.23	<i>Platanus sp</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat lonjong</li> <li>Berwarna kuning</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>		13	KMR.26c	<i>Asrophis curat</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat</li> <li>Berwarna putih</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>	
10	KMR.26a	<i>Asrophis curat</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat</li> <li>Berwarna krem</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>		14	KMR.26d	<i>Asrophis curat</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat</li> <li>Berwarna hitam</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>	
11	KMR.26b	<i>Asrophis curat</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat</li> <li>Berwarna abu-abu mengkilat</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>		15	KMR.26e	<i>Asrophis curat</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat</li> <li>Berwarna kuning</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>	
12	KMR.26f	<i>Asrophis curat</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Berbentuk bulat</li> <li>Berwarna kuning</li> <li>Permukaan berkerak</li> <li>Melakat erat pada media</li> </ul>						

Keterangan: KMR: Karst Maree, Angka: nomor sampel, Huruf: kode isolat

Selanjutnya isolat yang memiliki kemampuan menghasilkan senyawa antibakteri dikarakterisasi berdasarkan karakteristik morfologi dan ornamen rantai spora. Hasil pengamatan ditampilkan pada Gambar 5.2 berikut ini.



Gambar 5.2. .Morfologi rantai spora berdasarkan hasil pengamatan secara mikroskopik (perbesaran 400×). (A) isolat KMR 1E<sub>2</sub>, (B) isolat SDR 2a, (C) isolat SDR 9.9 dan (D) isolat SMT 1

### 1. Karakterisasi warna miselium isolat

Isolat *Actinobacteria* selanjutnya dikarakterisasi yang meliputi kemampuan pembentukan warna miselium pada beberapa medium pertumbuhan. Isolat terpilih ditumbuhkan pada medium ISP (*International Streptomyces Project*) 1, ISP 2, ISP 3, ISP 4, ISP 5, SCA, SNA, PDA, NA, TSA, *Zcapeks-Dox*, dan *Bennets Agar* medium. Parameter pengamatan yang dilakukan meliputi karakterisasi warna koloni, warna aerial miselium dan substrat miselium serta ada atau

tidak pigmen terlarut (*Soluble pigment*). Adanya perbedaan warna yang beragam pada media yang berbeda disebabkan perbedaan kemampuan dari masing-masing *Actinobacteria* dalam mencerna komponen-komponen media tersebut juga karena perbedaan kandungan pigmen dalam selnya, sesuai dengan masing-masing *Actinobacteria*. Hasil pengamatan karakterisasi warna miselium disajikan pada Tabel 5.3 berikut.

Tabel 5.3 Karakteristik isolat *Actinobacteria* pada berbagai media tubuh

No	Medium	Kode Isolat	Miselium Udara		Miselium Substrat		Tumbuh (P)	Soluble Pigment (SP)
			Kode Harmonika warna	Warna Pengamatan	Kode Harmonika warna	Warna Pengamatan		
1	ISP1	KMR 1E <sub>2</sub>	RAL 1013	Oyster White	RAL 8000	Green Brown	+	-
		SDR 2a	RAL 9002	Grey White	RAL 2000	Yellow Orange	+	-
		SDR 9.9	RAL 1015	Light Ivory	RAL 1002	Sand Yellow	+	-
2	ISP2	SMT 1	RAL 9010	Pure White	RAL 1023	Traffic Yellow	++	-
		KMR 1E <sub>2</sub>	RAL 9001	Cream	RAL 3005	White Red	++	+
		SDR 2a	RAL 9001	Cream	RAL 1003	Signal Yellow	++	+
3	ISP4	SDR 9.9	RAL 1012	Lemon Yellow	RAL 1012	Lemon Yellow	+	-
		SMT 1	RAL 9010	Pure White	RAL 1018	Zink Yellow	+	-
		KMR 1E <sub>2</sub>	RAL 9003	Signal White	RAL 1032	Broom Yellow	++	-
4	ISP5	SDR 2a	RAL 9003	Signal White	RAL 2004	Pure Orange	++	-
		SDR 9.9	RAL 1013	Oyster White	RAL 1011	Brown Beige	+	-
		SMT 1	RAL 9000	Cream	RAL 1000	Green Beige	+	-
5	SCA	KMR 1E <sub>2</sub>	RAL 1023	Traffic Yellow	RAL 1002	Sand Yellow	+	-
		SDR 2a	RAL 7030	Stone Grey	RAL 7044	Silk Gray	+	-
		SDR 9.9	RAL 1013	Oyster White	RAL 1024	Ochre Yellow	+	-
6	PDA	SMT 1	RAL 9010	Pure White	RAL 1006	Maize Yellow	+	-
		KMR 1E <sub>2</sub>	RAL 1001	Beige	RAL 2008	Bright Red Orange	++	-
		SDR 2a	RAL 9003	Signal White	RAL 1032	Broom Yellow	++	-
7	NA	SDR 9.9	RAL 9002	Grey White	RAL 1023	Traffic Yellow	++	-
		SMT 1	RAL 9010	Pure White	RAL 1007	Chrome Yellow	++	-
		KMR 1E <sub>2</sub>	RAL 9001	Cream	RAL 1012	Lemon Yellow	+	-
8	Oatmeal	SDR 2a	RAL 1002	Sand Yellow	RAL 1006	Maize Yellow	++	-
		SDR 9.9	RAL 9001	Cream	RAL 1005	Honey Yellow	+	-
		SMT 1	RAL 9010	Pure White	RAL 1014	Ivory	+	-
9	TSA	KMR 1E <sub>2</sub>	RAL 1013	Oyster White	RAL 3020	Traffic Red	++	-
		SDR 2a	RAL 9010	Pure White	RAL 1007	Chrome Yellow	++	-
		SDR 9.9	RAL 9001	Cream	RAL 1016	Traffic White	+	-
10	SNA	SMT 1	RAL 9000	Cream	RAL 1018	Zinc Yellow	+	-
		SDR 2a	RAL 1013	Oyster White	RAL 1006	Maize Yellow	+	+
		SDR 9.9	RAL 1013	Oyster White	RAL 1007	Chrome Yellow	+	+
11	Czapek's-Dox Agar	SMT 1	RAL 1024	Ochre Yellow	RAL 1027	Curry	+	-
		KMR 1E <sub>2</sub>	RAL 9003	Signal White	RAL 7039	Quartz Grey	+	-
		SDR 9.9	RAL 9016	Traffic White	RAL 1006	Maize Yellow	+	+
12	Bennets	SDR 2a	RAL 9003	Signal White	RAL 8024	Beige Brown	+	-
		SMT 1	RAL 1016	Sulfur Yellow	RAL 1016	Sulfur Yellow	+	-
		KMR 1E <sub>2</sub>	RAL 9010	Pure White	RAL 1023	Traffic Yellow	+	-
13	Bennets	SDR 2a	RAL 9000	Cream	RAL 1003	Signal Yellow	++	+
		SDR 9.9	RAL 7044	Silk Grey	RAL 2004	Pure Orange	++	+
		SMT 1	RAL 9002	Grey White	RAL 1018	Zinc Yellow	++	-
14	Bennets	SDR 2a	RAL 9010	Pure White	RAL 8007	Fawn Brown	+	-
		KMR 1E <sub>2</sub>	RAL 9016	Sulfur Yellow	RAL 7036	Platinum Grey	+	-
		SDR 2a	RAL 7032	Pebble Grey	RAL 1005	Honey Yellow	+	-
15	Bennets	SDR 9.9	RAL 7035	Light Grey	RAL 7044	Silk Grey	+	-
		SMT 1	RAL 9010	Pure White	RAL 1018	Zinc Yellow	+	-
		KMR 1E <sub>2</sub>	RAL 1005	Honey Yellow	RAL 1027	Curry	+	-
16	Bennets	SDR 2a	RAL 1005	Honey Yellow	RAL 1004	Golden yellow	+	-
		SDR 9.9	RAL 1016	Sulfur Yellow	RAL 1016	Sulfur Yellow	+	-

Keterangan:

++ : Pertumbuhan isolat sangat baik

+ : Pertumbuhan isolat baik/positif adanya soluble pigmen

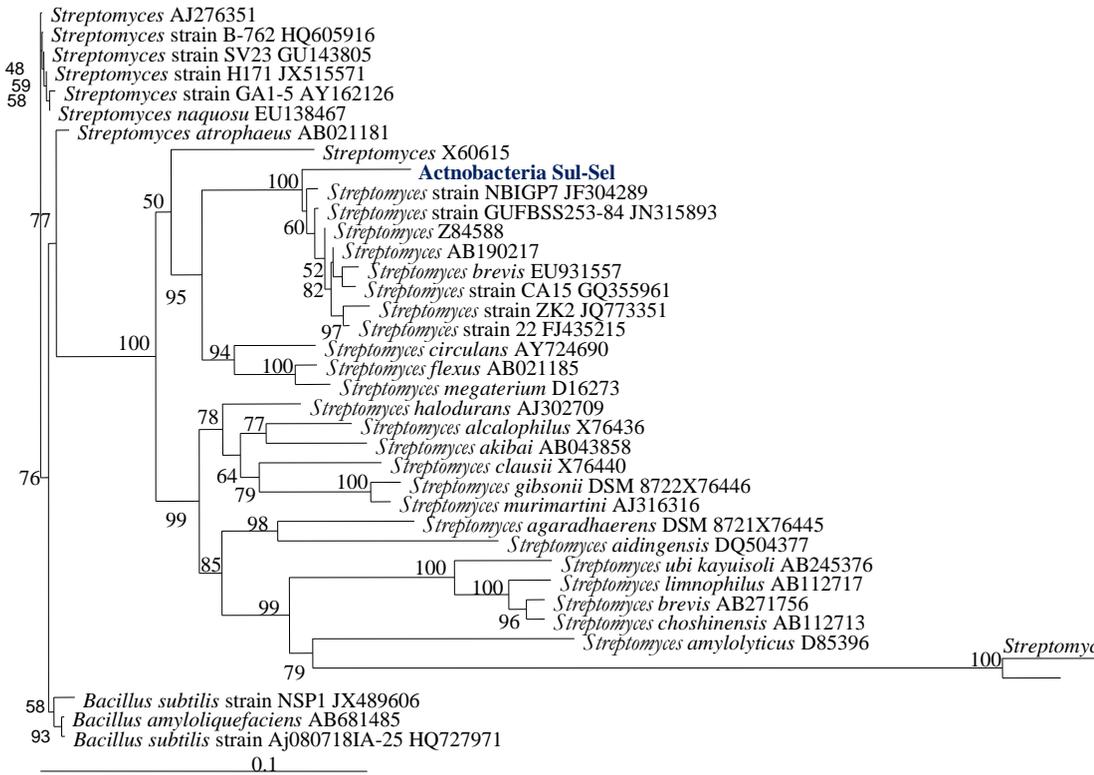
- : Isolat tidak tumbuh/negatif adanya soluble pigmen

Semua isolat *Actinobacteria* yang diperoleh pada tegakan tersebut diduga adalah genus *Streptomyces* spp. Kesimpulan ini diperoleh dari hasil pengamatan morfologi koloni dan morfologi sel secara mikroskopik. Meski karakter ini tidak dapat membedakannya dengan kelompok lain seperti *Kitatospora* dengan *Streptomyces*, namun perbedaan morfologi keduanya harus dilakukan analisis dinding sel untuk menentukan perbedaan tersebut. Lee dan Hwang (2002) mendapatkan 50% dari 1510 *Actinobacteria* yang diisolasi dari berbagai lokasi di Korea adalah *Streptomyces* spp. Lebih lanjut dilaporkan oleh Lemriss *et al* (2003) bahwa genus *Streptomyces* merupakan genus yang paling dominan dari semua sumber *Actinobacteria* yang mencapai 49% dari 54 isolat menunjukkan aktivitas sebagai antifungi. Dominansi populasi yang ditunjukkan oleh *Actinobacteria* khususnya genus *Streptomyces* spp disebabkan oleh kemampuan tumbuh yang cepat dan memiliki keragaman metabolit sehingga mampu melakukan adaptasi dan kompetisi di lingkungan atau habitatnya. Selain itu *Actinobacteria* memegang peranan penting dalam siklus karbon dan mampu tumbuh pada konsentrasi senyawa berkarbon rendah (Rifaat, 2003).

## 5. Analisis Molekular *Actinobacteria*

### Analisis gen 16S rRNA isolat

Karakterisasi pendahuluan melalui pendekatan *profile matching*, yaitu karakter kunci sebagai acuan dasar untuk mendeksripsikan strain/isolat yang digunakan. Isolat *Actinobacteria* menunjukkan kesamaan dengan ciri genus *Streptomyces* sp yaitu Gram positif, dengan rantai spora spiral. Hasil analisis sekuen gen 16S rRNA isolat tersebut digunakan untuk melakukan konstruksi filogenetik dengan membandingkan sekuen gen 16S rRNA dari semua *type species* anggota genus seperti terlihat pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3. Pohon filogeni yang dikonstruksi berdasarkan algoritma *Neighbour-joining* gen 16S rRNA isolat. Angka pada percabangan mengindikasikan nilai *bootstrap* (%) dengan 1000 kali replikasi. Jarak skala mengindikasikan jumlah perubahan yang diharapkan 1 per 100 nukleotida per posisi *sequence* gen

Analisis filogenetik menunjukkan bahwa sekuen gen 16S rRNA isolat tersebut mengelompok dengan genus *Streptomyces* spp dan lebih dekat dengan *Streptomyces* strain NBIGP7 JF304289. Hal ini memperkuat kesimpulan bahwa isolat terpilih tersebut merupakan strain dari anggota genus *Streptomyces*. Janda dan Abbot, 2007 menyatakan bahwa strain mikrobial diidentifikasi sebagai satu

spesies jika nilai similaritas sekuen gen 16S rRNA dengan *type strain* minimal 99%. Analisis similaritas menunjukkan bahwa isolat terpilih memiliki nilai similaritas dengan *type strain* yang berkerabat kurang dari 99%.

Berdasarkan jumlah nukleotida yang berbeda antara *Streptomyces akibai* AB043858 dengan *Streptomyces alcalophilus* X76436 ada 57 dari 1497 nukleotida yang dibandingkan sudah menunjukkan sebagai spesies baru. Dengan demikian, maka isolat terpilih dapat dinyatakan status kebaruannya. Adanya perbedaan jumlah nukleotida 80 yang berbeda diantara 1352 nukleotida yang dibandingkan dengan *Streptomyces* strain NBIGP7 JF304289 mengindikasikan pula bahwa isolat Actinobacteria yang ditemukan dinyatakan juga sebagai spesies baru. *Streptomyces brevis* pertama kali dideskripsikan pada tahun 1990 (Baek *et al.*, 2006) dan diklassifikasi ulang sebagai spesies baru sebagai *Streptomyces* dengan genus baru yaitu *Brevibacillus*. Selanjutnya ditemukan spesies baru seperti *Streptomyces invocatus* (Logan *et al.*, 2002) dan *Streptomyces limnophilus* (Goto *et al.*, 2004)

Masih terbatasnya proses karakterisasi yang dilakukan yaitu analisis fisiologi dan biokimiawi dan sekuen gen 16S rRNA menyebabkan sulitnya menentukan secara pasti spesies isolat atau strain tersebut (Angel *et al.*, 2005; Jurado *et al.*, 2005).

Pendekatan molekuler untuk isolasi dan karakterisasi *Streptomyces* endofit dilaporkan oleh (Zinniel *et al.*, 2002; Franks *et al.*, 2006). Komunitas mikrobial yang ditemukan pada akar, batang dan umbi berbagai varietas tanaman yang dianalisis berdasarkan gen 16S rRNA menunjukkan keragaman genus seperti *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas* dan *Microbacterium*.

# **BAB VI**

## **METODE RISET ACTINOBACTERIA PELARUT POSFAT**

Kesuburan tanah dan tanaman mempengaruhi hasil produksi pertanian. Untuk meningkatkan produksi pertanian masih terdapat banyak kendala dalam kesuburan tanah terutama ketersediaan unsur hara esensial dalam tanah. Kekurangan fosfor (P) merupakan salah satu kendala utama dalam produksi pertanian di Indonesia. Masalah penting dari pupuk P adalah efisiensi yang rendah karena fiksasi P yang cukup tinggi pada tanah terutama tanah masam. Salah satu upaya dalam mengatasi ketersediaan P pada tanah terutama tanah masam adalah pemanfaatan mikrobial (Premono, 1994).

Fosfor merupakan unsur esensial kedua setelah N yang berperan penting dalam proses pertumbuhan tanaman, serta metabolisme dan proses mikrobiologi tanah. Fosfor dalam tanah, 70% berada dalam keadaan tidak larut (Ilmer & Schinner, 1995), hal tersebut sangat berpengaruh terhadap serapan hara lain, khususnya pada saat unsur P menjadi faktor pembatas (Foth dan Ellis, 1988). Ketersediaan unsur P dalam tanah ternyata sangat bergantung pada aktivitas mikrobial dalam tanah, seperti adanya aktivitas dari kelompok bakteri pelarut fosfat/BPF (Goldstein, 1986).

Bakteri pelarut fosfat (BPF) merupakan bakteri tanah yang bersifat non patogen dan termasuk dalam kategori bakteri pemacu pertumbuhan tanaman. Bakteri tersebut menghasilkan vitamin dan fitohormon yang dapat memperbaiki pertumbuhan akar tanaman dan meningkatkan serapan hara (Glick, 1995). Bakteri pelarut fosfat merupakan satu-satunya kelompok bakteri yang dapat melarutkan P yang terjerap permukaan oksida-oksida besi dan aluminium sebagai senyawa Fe-P dan Al-P (Hartono, 2000). Bakteri tersebut berperan juga dalam transfer energi, penyusunan protein, koenzim, asam

nukleat dan senyawa-senyawa metabolik lainnya yang dapat menambah aktivitas penyerapan P pada tumbuhan yang kekurangan P (Rao, 1994).

Hasil penelitian Ali, A *et al.*, 2006 menunjukkan bahwa beberapa mikrobia tanah yang berhasil diisolasi dari beberapa tempat di Kabupaten Sidrap berpotensi digunakan sebagai mikrobia pelarut posfat dan kalium. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok jamur *Aspergillus* sp dan *Penicillium* sp memiliki kemampuan melarutkan kedua unsur tersebut. Hal ini terlihat dari uji secara kualitatif pada media tertentu. Hasil yang sama yang ditunjukkan oleh genus *Bacillus* sp dan *Pseudomonas* sp. Menurut hasil penelitian Bolton *et al.*, 1992 mikroba yang diinokulasikan kedalam rhizosfer mereka dapat memberikan dampak positif (*mutualisme* atau *komensalisme*), dampak negatif (*parasitisme*, *kompetisi* atau *amensalisme*) atau tidak memberikan pengaruh apa-apa (*netralisme*). BPF memerlukan karbohidrat dan protein untuk pertumbuhannya yang diambil dari hasil fotosintat tanaman inangnya.

Integrasi kemampuan untuk mengaplikasikan potensi penggunaan teknologi rekayasa lingkungan tanah meniru kemampuan humus menjadi penting dilakukan. Humus merupakan bahan yang berfungsi sebagai penjerat ion atau hara dalam tanah. Schmuhl, 2001 melaporkan bahwa kitosan memiliki kemampuan berikatan dengan logam krom. Sifat interaksi secara kovalen antara kitosan dengan beberapa logam tersebut bahkan telah diaplikasikan dalam bidang biomedis (Berger, 2004). Kemampuan menjerat ion oleh *kitosan* menjadikan bahan ini perlu dikembangkan sebagai humus sintetik. Penelitian untuk mencari sumber kitin selain dari hewan bercangkang seperti udang dan kepiting telah dilaporkan oleh Ali, A dan Hasri (2006) pada jamur isolat lokal. Kemampuan mengikat ion tertentu seperti K, P, Mg dan Al telah dibuktikan melalui konversi membentuk jembatan untuk ion-ion tersebut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan menjerat ion tidak sama antara semua ion yang diuji (Hasri dan Ali, A, 2007)

Rizosfer merupakan lingkungan biologik unik yang mendukung keragaman mikrobia karena besarnya input senyawa organik yang dihasilkan oleh akar tanaman dan eksudat akar

(Merckx *et al.*, 1987). Lebih lanjut Hasegawa *et al* (2006) menyatakan bahwa keberadaan *Actinobacteria* pada daerah rizosfer justru memegang peranan penting karena mampu mempengaruhi pertumbuhan dan asimilasi nutrisi oleh metabolit sekunder yang dihasilkannya.

Penelitian yang berkaitan dengan isolasi mikrobial pada rizosfer telah dilaporkan oleh banyak peneliti antara lain kelompok *Actinobacteria* (Pandey dan Palni, 2007; Khamna *et al* (2009), sedangkan isolasi fungi daerah rizosfer tanaman kayu putih dilaporkan oleh Rosruen dan Pornpakakul (2008). Menurut Gheseva (2002) bahwa daerah rizosfer dipengaruhi oleh banyak faktor seperti jumlah dan kualitas eksudat yang disekresikan akar pada tanaman spesies tertentu. Pengaruh eksudat tersebut dapat menstimulasi ataupun menghambat pertumbuhan mikrobial tertentu tergantung umur tanaman. *Actinobacteria* tanah yang mengkolonisasi akar akan mempengaruhi dan meningkatkan asimilasi besi serta nutrisi tanah pada tanaman.

Menurut Chamberlain dan Crawford (1999) bahwa *Actinobacteria* terutama spesies *Streptomyces* sering bertindak sebagai komunitas rizobakteri. Beberapa strain mampu menghasilkan antibiotik baik yang terdapat pada tanah maupun pada dedaunan tanaman yang bersifat antagonis terhadap fungi patogen. Kompetisi lainnya dapat pula berupa kompetisi nutrisi melalui proses pengkhlatan, misalnya pembentukan *sideropore* untuk mengikat ion Fe. Kekurangan ion ini menyebabkan mikrobial lainnya yang membutuhkan ion tersebut dalam proses metabolismenya dalam proses pertumbuhan dan perkembangbiakan tidak mampu tumbuh.

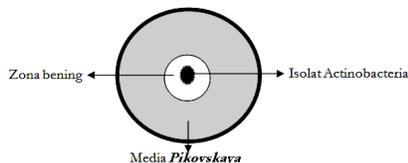
### **A. Pengujian *Actinobacteria* Pelarut P**

Isolat *Actinobacteria* yang berpotensi melarutkan posfat tak larut menjadi posfat larut dilakukan seleksi pada medium *Pikovskaya* yang terdiri atas [tricalcium phosphate 2,5 g; glucose 13g; (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> 0,5 g; NaCl 0,2 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1 g; KCl 0,2 g; Yeast Extract 0,5 g; MnSO<sub>4</sub> trace; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O trace; Agar 15 g; pH 7.2 dalam 1000 mL akuades]. Koloni *Actinobacteria* dan fungi yang menunjukkan

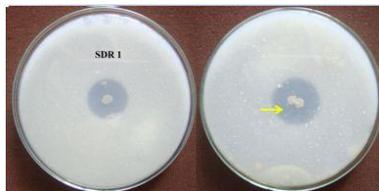
karakter morfologi berbeda diisolasi kembali sampai murni. Seleksi dilakukan berdasarkan kemampuan melarutkan P. Isolat yang menunjukkan kemampuan melarutkan P diberi kode sesuai dengan sumber *site sampling*. Isolat murni disimpan pada media agar miring untuk digunakan pada penelitian selanjutnya.

## B. Seleksi kandidat Actinobacteria

Isolat yang diperoleh dilakukan seleksi terhadap kemampuan dari 3 parameter uji. Untuk kemampuan melarutkan P dilakukan penentuan rasio antara diameter zona bening dengan diameter koloni. Isolat yang menunjukkan rasio tinggi pelarut P dipilih untuk dilakukan berikutnya. Skematis pengujian isolat pelarut P dapat dilihat pada Gambar 6.1.

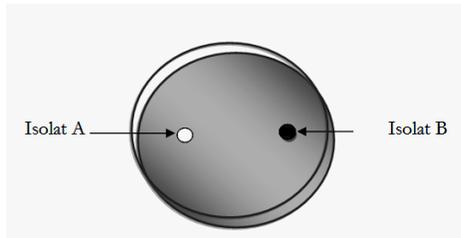


Gambar 6.1. Skematis pengujian mikroba pelarut posfat. Isolat mikroba ditumbuhkan pada media yang mengandung P tak larut. Isolat pelarut P jika terbentuknya zona bening disekitar koloni isolat

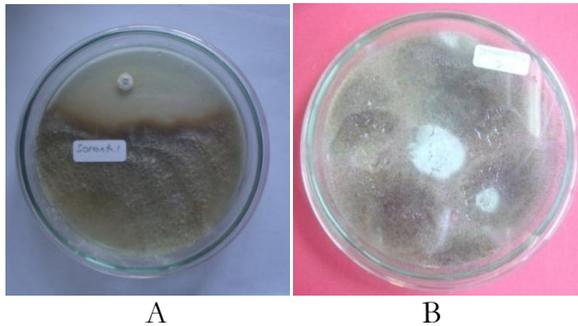


Gambar 6.2. Hasil uji isolat Actinobacteria pelarut posfat

Beberapa pengujian yang dilakukan antara lain uji sinergi antar isolat. Isolat yang menunjukkan kemampuan tinggi (rasio besar) diuji kemampuan sinergi dengan cara menumbuhkan isolat pada 2 sisi yang berlawanan. Skema pengujian dapat dilihat pada Gambar 6.3.



Gambar 6.3. Skematis pengujian sinergi antar isolat. Isolat sinergi jika diantara keduanya tidak saling menghambat pertumbuhan.



Gambar 6.4. Hasil uji sinergi antar isolat terpilih (A) tidak sinergis (B) sinergis

Isolat akan tumbuh ke semua arah dan jika salah satu isolat mendapat tekanan pertumbuhan yang ditandai dengan terhambatnya pertumbuhan koloni ke arah isolat lainnya, maka dinyatakan isolat tidak sinergi, dan sebaliknya. Isolat yang menunjukkan sinergi antar isolat dicatat untuk dilakukan pengujian berikutnya.

### **Formulasi pupuk hayati pelarut P**

Pupuk hayati dibuat dari bahan aktif isolat Actinobacteria yang menunjukkan kemampuan melarutkan posfat tinggi dan sinergi antar isolat lainnya. Proses pembuatan pupuk hayati dilakukan dengan cara sebagai berikut:

#### **a. Perbanyak biomassa Actinobacteria**

Isolat Actinobacteria terpilih yang menunjukkan kemampuan dari 3 parameter uji ditumbuhkan dalam cawan petri yang berisi

media SCA. Isolat berumur 14 hari yang ditandai dengan terbentuknya spora digunakan sebagai sumber inokulum. Inokulum dibuat dengan cara mensuspensikan spora Actinobacteria pada larutan NaCl fis, selanjutnya inokulum dihitung sporanya dengan metode hitungan langsung (hemasitometer). Sebanyak 1% inokulum yang berisi  $10^6$  spora/mL diinokulasikan ke dalam 150 mL media SCB dalam labu erlenmeyer 500mL.

Campuran media dengan inokulum diinkubasi selama 2 minggu dalam shaker kecepatan 150 rpm (*batch culture*). Setelah 2 minggu masa inkubasi, maka cairan hasil kultivasi disentrifuse pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pellet dicuci dengan akuades steril lalu disentrifuse kembali pada kecepatan yang sama selama 10 menit. Supernatan dibuang, dan pellet dikumpulkan lalu dikeringkan pada suhu 40°C selama 2 hari dalam oven. Setelah kering, maka biomassa telah siap digunakan untuk produksi pupuk hayati Actinobacteria.

Pembuatan pupuk hayati dilakukan dengan cara sebagai berikut: mencampurkan biomassa Actinobacteria ke dalam bahan yang terdiri dari abu gosok 70g; tepung tapioka 25%;  $\text{CaCO}_3$  1,5%; Actinobacteria 2,5g berat kering dan gum arab 3% (dari 15% larutan stok). Semua bahan dicampur secara merata, lalu dibuat adonan sampai bahan tidak mudah berhambur setelah dikepal. Selanjutnya dibuat butiran dengan menggunakan alat molem mini plat berputar. Selanjutnya butiran dikeringkan dalam oven selama semalam pada suhu 45°C.

## 6. Aplikasi pupuk hayati secara in planta

Aplikasi secara *in planta* dilakukan dengan sistem tunggal dan kombinasi antara kedua terseleksi. Tanaman ubi kayu ditumbuhkan pada plot yang dibagi ke dalam 9 perlakuan. Aplikasi dilakukan pada tanaman ubi kayu umur 1 bulan sejak tanam. Perlakuan diberikan dengan cara menebar pupuk pada sekitar perakaran tanaman. Setiap tanaman diberi sebanyak 50g disekitar perakaran dengan cara membenam (bukan ditebar dipermukaan tanah). Respon tanaman berdasarkan data pertumbuhan dan produksi digunakan sebagai parameter untuk menyeleksi kandidat setelah 4 bulan masa tanam.

## **Analisis data**

Analisis data penelitian dibedakan atas dua kelompok yaitu secara kuantitatif berupa jumlah berat/volume ( $\mu\text{g}$  atau mg elemen dalam tiap berat atau volum) dari pupuk hayati yang dibuat. Analisis secara statistik untuk mengetahui respon paling tinggi dari tiap jenis pupuk hayati yang dibuat. Respon tanaman dilakukan dengan rancangan acak kelompok pola faktorial untuk mengetahui perlakuan paling signifikan data dianalisis dengan DMRT pada level kepercayaan 95%.



## BAB VII

# APLIKASI PUPUK HAYATI ACTINOBACTERIA PELARUT POSFAT PADA TANAMAN

Rizosfer merupakan lingkungan biologik unik yang mendukung keragaman mikrobial karena besarnya input senyawa organik yang dihasilkan oleh akar tanaman dan eksudat akar (Merckx *et al.*, 1987). Lebih lanjut Hasegawa *et al.* (2006) menyatakan bahwa keberadaan *Actinobacteria* pada daerah rizosfer justru memegang peranan penting karena mampu mempengaruhi pertumbuhan dan asimilasi nutrisi oleh metabolit sekunder yang dihasilkannya.

Penelitian yang berkaitan dengan isolasi mikrobial pada rizosfer telah dilaporkan oleh banyak peneliti antara lain kelompok *Actinobacteria* (Pandey dan Palni, 2007; Khamna *et al.* (2009), sedangkan isolasi fungi daerah rizosfer tanaman kayu putih dilaporkan oleh Rosruen dan Pornpakakul (2008). Menurut Gheseva (2002) bahwa daerah rizosfer dipengaruhi oleh banyak faktor seperti jumlah dan kualitas eksudat yang disekresikan akar pada tanaman spesies tertentu. Pengaruh eksudat tersebut dapat menstimulasi ataupun menghambat pertumbuhan mikrobial tertentu tergantung umur tanaman. *Actinobacteria* tanah yang mengkolonisasi akar akan mempengaruhi dan meningkatkan asimilasi besi serta nutrisi tanah pada tanaman.

Menurut Chamberlain dan Crawford (1999) bahwa *Actinobacteria* terutama spesies *Streptomyces* sering bertindak sebagai komunitas rizobakteri. Beberapa strain mampu menghasilkan antibiotik baik yang terdapat pada tanah maupun pada dedaunan tanaman yang bersifat antagonis terhadap fungi patogen. Kompetisi

lainnya dapat pula berupa kompetisi nutrisi melalui proses pengkkelatan, misalnya pembentukan *sideropore* untuk mengikat ion Fe. Kekurangan ion ini menyebabkan mikrobia lainnya yang membutuhkan ion tersebut dalam proses metabolismenya dalam proses pertumbuhan dan perkembangbiakan tidak mampu tumbuh.

Banyak mikroba yang telah dilaporkan mampu melarutkan posfat sehingga digunakan sebagai bahan aktif dalam formula pupuk hayati. Hasil penelitian yang dilakukan ditemukan beberapa isolat actinobacteria yang mampu melarutkan P berdasarkan uji secara in vitro seperti tertera pada Tabel 7.1

Tabel 7.1 Rasio kemampuan melarutkan posfat isolat *Actinobacteria* pada media Pikovskaya, masa inkubasi 2 minggu, suhu 37°C

No	Kode Isolat	Diameter Zona Bening (mm)	Diameter Koloni (mm)	Rasio DZB/DK
1	TKLR 3A	6	3	2
2	TKLR 3B	5	2	2,5
3	TKLR 3C	8	2	4
4	TKLR 1A	4	2	2
5	TKLR 1A1	4	2	2
6	TKLR1B1	5	3	1,7
7	TKLR1B2	4	3	1,3
8	TKLR1B3	6	3	2
9	TKLR1B4	0	3	0
10	PTLS2	3	2	1,5
<b>11</b>	<b>SDR1</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
12	SDR1A	0	4	0
13	SDR2A	0	2	0
14	SDR2B	3	2	1,5
15	SDR2C	7	3	2,3
16	GW1A	5	2	2,5
17	GW1B	0	4	0

18	GW1C	0	3	0
19	GW1D	5	3	1,7
20	GW3A	0	4	0
21	GW3B	0	2	0
22	GW3C	4	2	2
23	GW3D	7	3	2,3
24	GW3E	7	2	3,5
25	GW3F	0	3	0
26	PRG2A	6	3	2
27	PRG2B	5	2	2,5
28	PRG2C	0	4	0
29	PRG3D	0	3	0
30	PRG3E	0	4	0
31	PR1A	3	2	1,5
32	PR1B	5	2	2,5

Tabel 3. *Lanjutan.....*

No	Kode Isolat	Diameter Zona Bening (mm)	Diameter Koloni (mm)	Rasio DZB/DK
33	PR1C	3	2	1,5
34	PR2A	0	3	0
35	PR2B	0	4	0
36	LRPG 2A	5	4	1,25
37	LRPG 2B	6	3	2
38	LRPG 2C	4	2	2
39	PGKP1A	3	2	1,5
40	PGKP1B	0	4	0
41	PGKP1C	0	3	0
42	PGKP1D	0	4	0
43	JNPT1A	7	4	1,75
44	JNPT1B	6	2	3
45	JNPTO2C	5	3	1,7

46	MRS2	4	2	2
47	SKG 1A	0	1	0
48	SKG 1B	0	3	0
49	SKG 1C	5	2	2,5
50	SKG 1D	6	4	1,5

Kemampuan melarutkan posfat pada kelompok Actinobacteria mencapai 62% dari seluruh isolat yang diuji (31 isolat), sedangkan rasio pelarutan posfat yang menunjukkan nilai rasio 2 atau lebih mencapai 38% (19 isolat). Hal ini menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh memiliki kemampuan melarutkan posfat lebih dari separuh dari total isolat Actinobacteria yang diperoleh. Dua isolat yang menunjukkan kemampuan melarutkan posfat secara *in vitro* yang lebih besar dibandingkan dengan isolat lainnya (rasio mencapai 4) digunakan sebagai kandidat terpilih.

Hasil uji sinergi antar isolat menunjukkan bahwa semua isolat yang diujikan memiliki sifat saling menghambat atau tidak sinergi kecuali 2 kelompok isolat yaitu isolat yang diberi kode SDR 1 dan TKLR 1 (Actinobacteria) yang tidak saling menghambat. Kedua isolat tersebut dilakukan pengujian sinergi untuk menentukan isolat kandidat untuk pupuk hayati. Tiga isolat yaitu SDR1, Sengkang 17 dan Jeneponto II menunjukkan kategori terbaik. Akan tetapi isolat TKLR 1 menunjukkan adanya kecenderungan menghambat pertumbuhan JNPT II dan SKG 17. Penghambatan diduga tidak dilakukan melalui sekresi senyawa antifungi, tetapi kemungkinan sekresi sideropore. Hal ini ditandai tidak adanya zona hambatan yang ditunjukkan jika dilakukan uji blok agar.

### **A. Aplikasi pupuk hayati skala in planta**

Aplikasi dilakukan pada lahan terbatas sebagai uji *in planta* terhadap tanaman ubi kayu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan respon tanaman yang diberi perlakuan pupuk hayati dan pupuk kimiawi dengan kelompok kontrol (tanpa diberi

perlakuan). Hasil ini ditandai dengan pertumbuhan vegetatif pada kelompok perlakuan lebih cepat dibandingkan dengan kontrol. Jumlah tangkai daun, tinggi tanaman (dari pangkal batang terbentuknya tunas) dan jumlah tunas menunjukkan bahwa tinggi tanaman antara kontrol dengan perlakuan berbeda nyata, sedangkan jumlah tangkai dan jumlah tunas berbeda tidak nyata dengan perlakuan. Hal ini disebabkan oleh singkatnya waktu aplikasi (2 minggu) sehingga data penelitian belum dapat disimpulkan. Meski demikian, terdapat kecenderungan adanya pengaruh perlakuan dengan kontrol yang digunakan.

Hasil penelitian ini dapat dianalisis produktivitas tanaman ubi kayu karena masa tanaman baru mencapai sekitar 2 bulan. Oleh karena itu, sampai penelitian ini dilaporkan, data produktivitas ubi kayu belum dapat ditentukan.

Tabel 7.2. Pertumbuhan vegetatif ubi kayu secara *in planta* yang diberi perlakuan pupuk hayati, aplikasi selama 3 minggu pertama

Perlakuan	Tinggi tanaman (cm)	Jumlah tangkai daun	Jumlah Tunas
<b>Kontrol</b>	25,12 <sup>a</sup>	7,63 <sup>a</sup>	2,12 <sup>a</sup>
<b>PH-SDR 1</b>	36,12 <sup>b</sup>	7,78 <sup>a</sup>	4,51 <sup>b</sup>
<b>PH-SKG 17</b>	38,78 <sup>b</sup>	8,98 <sup>a</sup>	2,09 <sup>a</sup>
<b>PH-JNPT II</b>	38,08 <sup>b</sup>	6,97 <sup>a</sup>	3,24 <sup>a</sup>
<b>PUPUK KIMIA</b>	38,98 <sup>b</sup>	7,88 <sup>a</sup>	3,56 <sup>a</sup>

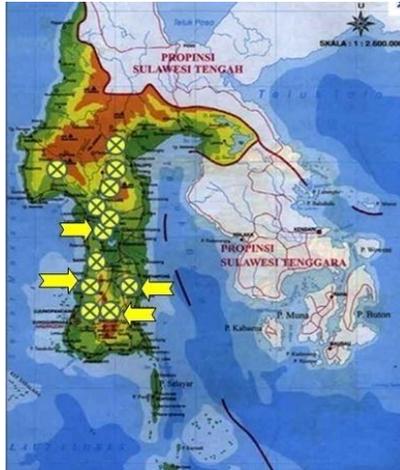
Keterangan: Perlakuan yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama berarti berbeda tidak nyata pada  $\alpha_{0,05}$



Gambar 71. Plot percobaan setelah aplikasi 2 minggu secara *in planta*

### **Aplikasi pupuk hayati pada skala lapang**

Penelitian aplikasi skala lapang terbatas dilakukan pada lokasi penelitian di 4 kabupaten yang ada di Sulawesi Selatan yaitu Sidrap I, Sidrap II, Gowa dan Maros. Keempat lokasi penelitian ini memiliki karakter tanah yang berbeda dengan lokasi lainnya. Karakter tanah di kabupaten Sidrap I berbatu tapi masih cocok ditanamai ubi kayu berdasarkan pengalaman masyarakat disana yang memang tanam ubi kayu. Hal berbeda dengan karakter tanah di kab. Sidrap II yang berpasir. Hal yang sama juga terlihat karakter tanah di kabupaten Gowa, meski tidak berbatu/pasir tetapi secara umum karakter tanahnya coklat tapi kurang subur. Sementara itu karakter tanah di kabupaten Maros, berpasir dengan warna tanah abu-abu. Penanaman ubi kayu dilakukan pada awal Maret 2015 untuk Kab. Gowa dan akhir Januari untuk Kab. Sidrap dan Maros. Lokasi penanaman didasarkan pada perbedaan karakteristik tanah. Karakter tanah bermacam-macam antara lain berpasir, bebatuan, coklat dan abu-abu (Gambar 7.2)



Gambar 7.2. Lokasi pengambilan sampel penelitian

### **Pembuatan dan Aplikasi Pupuk HS**

Pembuatan pupuk hayati mengacu pada proses yang dilakukan pada penelitian sebelumnya, meski dilakukan modifikasi. Modifikasi dilakukan berdasarkan hasil percobaan uji terbatas sebelumnya. Berdasarkan uji tersebut menunjukkan bahwa penambahan 1 isolat Actinobacteria penghasil IAA (zat pengatur tumbuh) dan 3 (tiga) isolat Actinobacteria pelarut posfat mampu meningkatkan pertumbuhan vegetatif tanaman ubi kayu hampir 2x lipat dari kontrol.

Pembuatan pupuk hayati yang dihasilkan masih dalam bentuk pellet (dengan ukuran diameter 2-3 mm). Pupuk hayati yang dihasilkan berwarna abu-abu seperti tertera pada Gambar 7.3.



Gambar 7.3. Pupuk hayati hasil rakitan yang digunakan dalam penelitian

Produksi hayati mengacu pada kemampuan produk untuk mengikat ion-ion penting dalam tanah sebagai pengaruh dari pelarutan senyawa oleh isolat. Pupuk yang dihasilkan merupakan paduan antara arang sekam sebagai core dan kitosan dan hidrotalsit sebagai pengikat. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ketiga bahan tersebut dapat dibuat dalam bentuk pelet. Penggunaan senyawa pengikat gum arabic dan cmc cukup bagus digunakan pada konsentrasi 8% karena terbentuk pelet yang tidak mudah pecah. Persiapan lahan untuk uji coba pada masing-masing daerah tertera pada Gambar 7.4. Lokasi penanaman yang dipilih adalah sesuai dengan lokasi tempat budidaya tanaman ubi kayu yang banyak ditanam masyarakat setempat.



Gambar 7.4. Lahan persiapan penanaman ubi kayu di Kabupaten Gowa

Varietas ubi kayu yang ditanam menyesuaikan dengan varietas tiap wilayah penanaman. Lahan penanaman pada minggu pertama pertumbuhan ubi kayu dapat dilihat pada Gambar 7.5. Secara umum tanaman ubi kayu pada minggu pertama tampak masih seragam dalam hal tinggi dan performance tanaman. Daun yang tumbuh rata-rata 5 tangkai daun untuk setiap tanaman dan tinggi berkisar 20-25 cm dari pangkal batang tempat tumbuhnya daun muda.



Gambar 7.5. Areal penanaman ubi kayu pada minggu pertama (sebelum aplikasi pupuk hayati)

Penggunaan pupuk hayati dilakukan setelah satu sampai dua bulan masa tanam. Pemberian dilakukan dengan cara mengubur sedalam 10-15 cm di sekitar perakaran (Gambar 7.6). Pemberian pupuk hayati yang tidak seragam antar lokasi tanam karena perbedaan musim hujan antar daerah yang tidak memungkinkan aplikasi bersamaan antar satu lokasi dengan lokasi lainnya.



Gambar 7.6. Aplikasi pupuk hayati pada tanaman ubi kayu setelah 2 bulan masa penanaman

## A. Hasil Pertumbuhan Tanaman Ubi Setelah Aplikasi pupuk hayati 3 Bulan

Hasil pertumbuhan vegetatif tanaman setelah aplikasi dengan pupuk hayati pada 3 bulan setelah masa tanam berturut-turut dapat dilihat pada Gambar 7.7. Tampak bahwa pertumbuhan tanaman antar satu lokasi penanaman dengan yang lainnya berbeda dalam hal performance tanaman. Hal ini disebabkan oleh varietas dan jenis tanah lokasi penanaman yang berbeda-beda. Meski demikian yang menjadi tujuan dari aplikasi ini adalah untuk mengetahui perbedaan pertumbuhan vegetatif dan produksi tanaman yang menggunakan pupuk hayati dengan kontrol.

Gambar 6. Areal penanaman ubi kayu pada 3 bulan (tanpa aplikasi pupuk hayati) di Kab. Gowa



A



B

Gambar 7.7. Areal penanaman ubi kayu pada 3 bulan (setelah aplikasi pupuk hayati) di Kab. Gowa (A), tidak diberi pupuk hayati (B)

Tampak bahwa pertumbuhan vegetatif ubi kayu untuk kedua perlakuan sangat berbeda dalam hal tinggi tanaman. Pertumbuhan tanaman seperti ditunjukkan pada Gambar 7.7 mencapai rata-rata

80 cm (sebatas pinggang orang dewasa). Hal berbeda ditunjukkan oleh perlakuan yang mencapai 170 sampai 180 cm.

Kemampuan isolat-isolat terpilih yang digunakan dalam formula pupuk hayati tersebut diyakini mampu meningkatkan ekosistem tanah yang dapat menunjang aktivitas pertumbuhan ubi kayu. Konsorsium isolat yang memiliki kemampuan melarutkan posfat, kalium serta penghasil zat pemacu pertumbuhan tanaman (IAA) menjadi faktor utama respon tanaman tersebut dibandingkan kontrol.

Produktivitas ubi kayu hasil panen (umur 7 bulan) masa penanaman menunjukkan hasil yang berbeda antara perlakuan dengan kontrol (Tabel 7.3). Berdasarkan hasil panen tersebut diperoleh berat ubi kayu untuk lahan perlakuan berbeda 1 sampai 3,5 ton per hektar dengan lahan kontrol. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa perlakuan bahan pupuk yang diberi konsorsium Actinobacteria mampu memacu pertumbuhan dan produktivitas ubi kayu.

Tabel 7.3. .Produktivitas ubi kayu lahan yang diberi perlakuan dan kontrol

Lokasi	Rata-Rata Berat Ubi Kayu (Kg/Ha)		Selisih Rata- Rata (Kg)
	Perlakuan	Kontrol	
Kab. Gowa	19.175	17.051	2.124
Kab. Sidrap I	21.556	18.035	3.521
Kab. Sidrap II	19.017	18.005	1.102
Kab. Maros	19.945	17.033	2.912



A



B

Gambar 7.8. Profil tanaman ubi kayu umur 6 bulan yang tidak diberi perlakuan (Kontrol) pada lahan pertanaman Kab. Gowa (A), dan yang diberi pupuk hayati (B)



Gambar 7.9. Profil umbi tanaman ubi kayu umur 6 bulan yang tidak diberi perlakuan (Kontrol) pada lahan pertanaman Kab. Gowa (A); yang diberi pupuk hayati (B)

Hasil yang sama ditunjukkan pada lokasi berbeda juga terjadi perbedaan respon pertumbuhan tanaman antara perlakuan dengan kontrol (Gambar 7.10). Performance pertumbuhan tanaman tampak berbeda meski ditanam pada lokasi yang sama.

Penanaman yang dilakukan pada setiap lokasi berbeda masa tanam sesuai dengan kesiapan lahan yang digunakan sebagai lokasi penelitian. Lokasi penanaman di Kab. Sidrap I dan II lebih dulu menanam karena persiapan lokasi penanaman lebih awal sesuai dengan jadwal yang diberikan oleh petani. Hal berbeda ditunjukkan

oleh Kab. Gowa yang agak terlambat menyiapkan lahan. Hal ini akibat masa panen tanaman palawija yang belum dilakukan sehingga menunggu sampai panen berakhir untuk dapat digunakan sebagai lokasi percobaan penanaman ubi kayu. Selain itu, kesiapan petani untuk mengolah lahan juga molor dari jadwal yang disepakati.



Gambar 7.10. Profil umbi tanaman ubi kayu yang diberi perlakuan pupuk hayati 7 bulan masa tanam di Kab. Sidrap I (A), tidak diberi pupuk hayati (B)



Gambar 7.11. Areal penanaman ubi kayu pada 5 bulan (setelah aplikasi pupuk hayati) di Kab. Sidrap II (Tanda panah yang diberi arsir: aplikasi pupuk hayati)(Tanda panah tidak diberi arsir: kontrol)

Berdasarkan uji coba yang dilakukan, tampak bahwa tidak ada perbedaan respon pertumbuhan tanaman terhadap varietas ubi yang digunakan. Hal yang sama ditunjukkan oleh jenis tanah pada lahan penanaman ubi juga tidak menunjukkan respon yang berbeda terhadap pertumbuhan tanaman yang diaplikasi dengan yang kontrol.



A

B

Gambar 7.13. Areal penanaman ubi kayu pada 5 bulan (setelah aplikasi pupuk HS/MOT) di Kab. Maros (A), tidak diberi pupuk hayati (kontrol) (B)

Respon pertumbuhan vegetatif tanaman justru berbeda dengan lokasi penanaman ubi di Kab. Maros. Tampak bahwa antara perlakuan (aplikasi pupuk hayati) tidak berbeda dengan kontrol. Kedua tanaman tidak terlihat adanya perbedaan yang signifikan dalam hal tinggi tanaman. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh keterlambatan aplikasi pupuk hayati yang dilakukan oleh petani. Perlakuan diberikan setelah 3 bulan masa tanam. Keterlambatan disebabkan oleh kesibukan petani menggarap lahan lainnya (Lahan palawija) sehingga respon positif tanaman tidak tampak. Meski demikian, diharapkan adanya perbedaan dalam produktivitas nantinya. Profil produk pupuk hayati berbahan aktif Actinobacteria terlihat pada Gambar 7.13



Gambar 7.13. Profil pupuk hayati berbahan aktif Actinobacteria yang dipacking dalam bentuk padat dan cair



# Daftar Pustaka

- Ali, A dan Rante, H. 2011. Karakterisasi Mikrobial Rizosfer asal Tanaman Ginseng Jawa (*Talinum triangulare*) Berdasarkan Gen Ribosomal *16S rRNA* dan *18S rRNA*. *Jurnal Biologi Papua* 3 (2): 74-81
- Ali, A. 2012. Actinobacteria penghasil antifungi asal rizosfer tegakan kayu putih hutan Wanagama I Yogyakarta: Isolasi, optimasi dan karakterisasi Actinobacteria serta isolasi senyawa antifungi. Disertasi Program Studi Bioteknologi, UGM Yogyakarta, Tidak Dipublikasi.
- Ali, A., Junda, M., Dini, I. 2013. Revitalisasi lahan marginal untuk budidaya ubi kayu melalui inovasi teknologi humus sintetik dan augmentasi MOT ramah lingkungan. Laporan Penelitian MP3EI. DIKTI
- Ali, A., Junda, M., Dini, I. 2014. Revitalisasi lahan marginal untuk budidaya ubi kayu melalui inovasi teknologi humus sintetik dan augmentasi MOT ramah lingkungan. Laporan Penelitian MP3EI. DIKTI
- Ali, A., Junda, M. 2016. Pengembangan Formula Inokulan Berbahan Aktif Actinomycetes Endofit Tropika Unggul untuk Penyediaan Bibit Tanaman Markisa Ungu Resisten Jamur Patogen. Laporan Penelitian HIKOM. RISTEKDIKTI
- Angel, V., Encarna, V., Félix, F.S., Nieves, V., Raúl, R., Pedro, F.M, Eustoquio, M.M., José, M.I., Anne, W. 2005. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1985-1989.
- Asolkar, R.N., Freel, K.C., Jensen, P.R., Fenical, W., Kondratyuk, T.P., Park, E.J., Pezzuto, J.M. 2009. Arenamides A-C, cytotoxic NF- $\kappa$ B inhibitors from the marine Actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Nat. Prod.* 72: 396-402

- Ayuso-Sacido A. and Genilloud, O., 2005. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in Actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbiol. Ecol.*, 49: 10-24.
- Badji, B., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A and Sabaou, N. 2006. Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp AC104 isolated from an Algerian Sahara soil. *Can J Microbiol*, 55 (4): 373-382
- Baek, S.H., Im, W.T., Oh, H.W., Lee, J.S., Oh, H.M., and Lee, S.T. 2006. *Brevibacillus ubi kayuisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a *ubi kayu* field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 56: 2665–2669
- Barrow, C.J., Oleynek, J.J., Marinelli, V. 1997. Antimycins, inhibitors of ATP-citrate lyase, from a *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* 50:729-733.
- Behal, V. 2000. Bioactive products from Streptomyces. *Adv. Appl. Microbiol.* 47: 113-157
- Bendl, B.J., Mackey, D., Al-Saati, F., Sheth, K.V., Ofole, S.N. & Bailey, T.M. 1987. Mycetoma in Saudi Arabia. *J Trop Med Hyg* 90(2): 51-9.
- Bennett, M., Marchant, A., May, S.T., Swarup, R., 1998. Going the distances with auxin: Unrevealing the molecular basis of auxin transport. *Philos. Trans. R. Soc, London, Ser. B.* 353: 1511-1515
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Tarraga, A.M.C., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D. 2002. Complete genome sequence of the model Actinomycetes *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, 417: 141-147.
- Berg, G., Opelt, K., Zachow, C., Lottmann, J., Monika, G, Costa, R dan Smalla, K. 2006. The rhizosphere selection bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiol Ecol*, 56: 250–261
- Bernan, V.S., Greenstein, M., Carter, G.T. 2004. Mining marine microorganisms as a source of new antimicrobials and antifungals. *Curr. Med. Chem. Anti-Infective Agents* 3: 181-195.

- Challis, G.L., Hopwood, D.A. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(Suppl 2):14555–14561
- Chamberlain, K. and D.L. Crawford, 1999. *In vitro* and *in vivo* antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 641-646.
- Chamberlain, K. & Crawford, D.L. 2000. Thatch biodegradation and antifungal activities of two lignocellulolytic *Streptomyces* strains in laboratory cultures and in golf green turfgrass. *Can J Microbiol* 46(6): 550-8.
- Cheng, Y.Q., Tang, G.L., and Shen, B. 2003. Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis. *PNAS* 100(6):3149–3154 ([www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0537286100](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0537286100)).
- Chun, J. 1999. *PHYDIT (The Phylogenetic Editor) Version 3.0. User's Manual*
- Crawford, D.L., Lunch, J.M., Whipps, J.M. & Ousley, M.A. 1993. Isolation and characterization of *Actinomycetes* antagonists of fungal root pathogen. *Appl Environ Microbiol* 59: 3899–3905
- Demain AL, 1989. Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in *Actinomycetes*. In: Shapiro S, editor. *Regulation of actinomycetes*, Boca Raton, FL: CRC Press: 127-34.
- Dewick, P.M. 2002. *Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach*, Second Edition. John Wiley & Sons, Ltd
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Broek, A. V., Vanderleyden, J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*. 155-164
- Dutkiewicz, J., Krysinska-Traczyk, E., Skorska, C., Sitkowska, J., Prazmo, Z. & Golec, M. 2001. Exposure to airborne microorganisms and endotoxin in herb processing plants. *Ann Agric Environ Med*, 8(2): 201-11.

- Euverink, G.J.W. 1999. Aromatics amino acid biosynthesis in *Actinomycetes*. *Reviews* :11-34
- FAO. (2008). <http://www.fao.org/organicag>
- Fiedler, H.P.; Bruntner, C.; Riedlinger, J.; Bull, A.T.; Knutsen, G.; Goodfellow, M.; Jones, A.; Maldonado, L.; Pathom-aree, W.; Beil, W.; Schneider, K.; Keller, S.; Sussmuth, R.D. 2008. Proximicin A, B and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds isolated from marine strains of the actinomycete *Verrucosispora*. *J. Antibiot.*, 61: 158-163
- Finking, R. and Marahiel, M.A. 2004. Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58:453–488.
- Feling, R.H., Buchanan, G.O., Mincer, T.J., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. 2003. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42: 355-357.
- Fenical, W & Jansen, P.R. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology*. 2: 666 - 673
- Fenical, W., Jensen, P.R., Palladino, M.A., Lam, K.S., Lloyd, G.K and Potts, B.C. 2009. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorg Med Chem* 17: 175-2180.
- Foth, H.D. and B.G. Ellis. 1988. *Soil Fertility*. New York: John Wiley & Sons.
- Franks, A., Ryan, P.R., Abbas, A., Mark, G.L and O’Gara, F. 2006. Molecular Tools for Studying Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Molecular Techniques for Soil and Rhizosphere Microorganisms. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK
- Gesheva, V. 2002. Rhizosphere microflora of some citrus as a source antagonistic *Actinomycetes*. *Eur J Soil Biol*, Vol 33:85-88
- Getha, K., Vikineswary, S. 2005. Evaluation of *Streptomyces* sp. Strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J Ind Microbiol Biot*, 32(1):24-32

- Glick, BR. 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian Journal Microbiology* 41: 109-117.
- Goodfellow, M. 1989. Suprageneric classification of Actinomycetes. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4, Williams and Wilkins Company, Baltimore : 2333-2339
- Goto, K., Fujita, R., Kato, Y., Asahara, M. & Yokota, A. 2004. Reclassification of *Brevibacillus brevis* strains NCIMB 13288 and DSM 6472 (=NRRL NRS-887) as *Aneurinibacillus danicus* sp. nov. and *Brevibacillus limnophilus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 419–427
- Grayston, S.J., Vaughan, D and Jones, D. 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl Soil Ecol*, 5:29-56.
- Hartono, A. 2000. Pengaruh pupuk fosfor, bahan organik dan kapur terhadap pertumbuhan jerapan P pada tanah masam latosol Darmaga. *Gakuryoku* 6 (1): 73-78
- Hasegawa, S., Meguro, A., Shimizu, M., Nishimura, T, and Kunoh, H. 2006. Endophytic Actinomycetes and their interaction with host plants. *Actinomycetologica*, 20, 72-81
- Hasri., Ali, A. 2008. Pengaruh konsentrasi asam terhadap pembentukan jembatan ion pada kitosan. Laporan Penelitian DIKTI
- Hoskisson, P.A., Hobbs, G., Sharples, G.P. 2001. Antibiotic production, accumulation of intracellular carbon reserves, and sporulation in *Micromonospora echinospora* (ATCC 15837). *Canadian Journal of Microbiology*, 47(2): 148-152
- Hughes, D. 2003. Exploiting genomic genetis and chemistry to combat antibiotics resistance. *Nat Rev*, 4:432-439.
- Hussain, A.A., S.A. Mostafa, S.A. Ghazal and S.Y. Ibrahim, 2002. Studies on antifungal antibiotic and bioinsecticidal activities of some Actinomycete isolates. *African J. Mycol. Biotechnol.* 10: 63-80.

- Ilmer, P. and F. Schinner. 1995. Solubilization of organic calcium phosphates solubilization mechanisms. *Soil Biology Biochemistry* 27 (3): 257-263.
- Jurado, V., Laiz, L., Gonzalez, J.M., Hernandez-Marine, M., Valens, M., Saiz-Jimenez, C. 2005. *Phyllobacterium catacumbae* sp. nov., a member of the order 'Rhizobiales' isolated from Roman catacombs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1487-1490
- Igarashi, M., Liyama, Y., Kato, R., Tomita, M., Asami, N & Ezawa, I. 1994. Effect of *Bifidobacterium longum* and lactulose on the strength of bone in ovariectomised osteoporosis model rats. *Bifidus* 7:139 - 147
- Itoh, T., Kinoshita, M., Wei, H., Kobayashi, M. 2003. Stereostructure of komodoquinone A, a neurotogenic anthracycline, from marine *Streptomyces* sp. KS3. *Chem. Pharm. Bull.* 51: 1402-1404.
- Janse JD. 2005. *Phytobacteriology: Principle and Practice*. Cambridge: CAB International Publishing
- Jeong, S.Y., Shin, H.J., Kim, T.S., Lee, H.S., Park, S.K., Kim, H.M. 2006. Streptokordin, a new cytotoxic compound of the methylpyridine class from a marine-derived *Streptomyces* sp. KORDI-3238. *J. Antibiot.* 59: 234-240
- Jørgensen, O.B., Karlsen, L.G., Nielson, N.B., Pederson, S., Rugh, S. 1988. A new immobilized glucose isomerase with high productivity produced by a strain of *Streptomyces murinus*. *Starch Staerke* 40: 307-313
- Kansoh, A.L., Nagieb, Z.A. 2004. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Anton Leeuw Int J G* 85: 103–114
- Kanoh, K., Matsuo, Y., Adachi, K., Imagawa, H., Nishizawa, M., Shizuri, Y. 2005. Mechercharmycins A and B, cytotoxic substances from marine-derived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251. *J. Antibiot.* 58: 289-292
- Kekuda TRP, Shobha KS, Onkarappa R. 2010. Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites. *J Pharm Res.* 3(2): 250-256

- Kerry, B. R., 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 38: 423-441.
- Ketela, M.M., Halo, L., Munukka, E., Hakala, J., Mantsala, P, and Ylihonko, K. 2002. Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequences analysis of polyketide ketosynthase and 16S rDNA genes from various *Streptomyces* species. *Appl Environ Microbiol*, 69 (9):4472-4479
- Khamna, S., Yokota, A, and Lumyong, S.2009. *Actinomycetes* isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J Microb Biot*, 25:649–655
- Kieser T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. and Hopwood, D. A. 2000. Practical streptomyces genetics. *The John Innes Foundation* (Norwich)
- Kim, B.S., Moon, S.S, and Hwang, B.K. 2000. Structure elucidation and antifungal activity of an antracycline antibiotic, daunomycin, isolated from *Actinomadura rosela*. *J Agr Food Chem*, 48: 1875-1881.
- Klokke, A.H., Swamidasan, G., Anguli, R. & Verghese, A. 1968. The causal agents of mycetoma in South India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 62: 509-516
- Kock, I., Maskey, R.P., Biabani, M.A., Helmke, E., Laatsch, H. 2005. 1-Hydroxy-1-norresistomycin and resistoflavin methyl ether: new antibiotics from marine-derived streptomycetes. *J. Antibiot.* 58: 530-534.
- Komaki, H dan Harayama, S. 2006. Sequence diversity of type-II Polyketide Synthase genes in Streptomyces. *Actinomycetologica*, 20(2): 42-48
- Kwon, H.C., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. 2006. Marinomycins A-D, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine Actinomycete of the recently discovered genus "*Marinispora*". *J. Am. Chem. Soc.* 128: 1622-1632.

- Lee, J.P dan Hwang, B.K. 2002. Diversity of antifungal Actinomycetes in various vegetatif soils of Korea. *Can J Microbiol*, 48: 407-417
- Lehninger, A. L., 1993. Principles of biochemistry. Worth New York.
- Lemriss, S., Laurent, F., Couble, A., Casoli, E., Lancelin, J.M., Bonaccio, D.S., Rifai, S., Fassauane, A, and Boiron, P. 2003. Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of Actinomycetes. *Can J Microbiol*, 49 (11): 669-674.
- Li, F., Maskey, R.P., Qin, S., Sattler, I., Fiebig, H.H., Maier, A., Zeeck, A., Laatsch, H. 2005. Chinikomycins A and B: isolation, structure elucidation, and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. isolate M045. *J. Nat. Prod.* 68:349-353.
- Logan, N. A., Forsyth, L., Lebbe, L. & 8 other authors. 2002. Polyphasic identification of Bacillus and Brevibacillus strains from clinical, dairy and industrial specimens and proposal of Brevibacillus invocatus sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 953–966.
- Ludwig, W., Euzeby, J., Schumann, P., Busse, H., Trujillo, M. E., Kampf, P. and Whitman, W. B. 2011. Road map of the Actinobacteria, *Bergey's Manual System. Bacteriol.* 5: 25-50.
- Lynch, J.M. 1983. Soil Biotechnology: Microbiological factors in crop productivity. Blackwell Scientific Publication, London.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. 1997. *Brock Biology of Microorganisms, Eighth Edition*, Prentice Hall .
- Mahe, A., Develoux, M., Lienhardt, C., Keita, S. & Bobin, P. 1996. Mycetomas in Mali: causative agents and geographic distribution. *Am J Trop Med Hyg.* 54(1):77-9.
- Magarvey, N.A., Keller, J.M., Bernan, V., Dworkin, M., Sherman, D.H. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived Actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl Environ Microbiol* 70:7520–7529
- Manam, R.R., Teisan, S., White, D.J., Nicholson, B., Grodberg, J., Neuteboom, S.T., Lam, K.S., Mosca, D.A., Lloyd, G.K., Potts,

- B.C. 2005. Lajollamycin, a nitro-tetraene spiro-beta-lactone-gamma lactam antibiotic from the marine Actinomycete *Streptomyces nodosus*. *J. Nat. Prod.* 68:240-243.
- Mayer, K.M., Ford, J., Macpherson, G.R., Padgett, D., Kohlmeyer, B.V., Kohlmeyer, J., Muphy, C., Douglas, S.E., Wright, J.M, and Wright, J.L.C. 2007. Exploring the diversity of marine-derived fungal polyketide synthases. *Can J Microbiol*, 53: 291-302
- Merckx, R., Dijkstra, A., Hartog, A.D., and Veen, J.A.V. 1987. Production of root-derived material and associated microbial growth in soil at different nutrient levels. *Biol Fert Soils*, 5:126–132
- Miller, E.D., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. 2007. Piperazimycins: cytotoxic hexadepsipeptides from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. *J. Org. Chem.* 72: 323-330
- Money, N. P. 1997. Wishful thinking of turgor revisited: The mechanics of fungal growth. *Fungal Genet. Biol.* 21: 173-187
- Moore, B. S., Trischman, J. A., Seng, D., Kho, D., Jensen, P. R., and Fenical, W. 1999. Salinamides, anti-inflammatory depsipeptides from a marine streptomycete. *J. Org. Chem.* 64(4): 1145-1150
- Mossad S.B., Tomford J.W., Stewart, R., Ratliff, N.B. & Hall, G.S. 1995. Case report of *Streptomyces endocarditis* of a prosthetic aortic valve. *J Clin Microbiol* 33(12), 3335-7
- Myers, A.K., Tisa, L.S. 2004. Isolation of antibiotics-resistant and antimetabolite-resistant mutants of *Frankia* strains Eul1c and Cc1.17. *Can J Microbiol*, 50(4): 261-267.
- Nedal, A. 2007. Post-PKS modifications in the biosynthesis of the antifungal antibiotic nystatin. Doctoral thesis for the degree of Philosophiae Doctor (Ph.D). Norwegian University of Science and Technology
- Nishimura, T., Meguro, A., Hasegawa, S., Nakagawa, Y., Shimizu, M, and Hunoh, H. 2002. An endophytic Actinomycete, *Streptomyces sp.* AOK-30, isolated from Mountain Laurel and its antifungal activity. *J Gen Plant Pathol*, 68: 390-397.

- Oh, D.C., Gontang, E.A., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. 2008. Salinipyrones and pacificanones, mixed-precursor polyketides from the marine Actinomycete *Salinispora pacifica*. *J. Nat. Prod.* 71: 570-575
- Olano, C., Méndez, C., Salas, J.A. 2009. Antitumor compounds from marine Actinomycetes. *Mar. Drugs.* 7:210-248
- Orhan, I., Sener, B., Kaiser, M., Brun, R., Tasdemir, D. 2010. Inhibitory activity of marine sponge-derived natural products against parasitic protozoa. *Mar. Drugs.* 8: 47-58
- Oskay, M. 2009. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. *African J Biotech* 8 (13): 3007-3017
- Paciorek, T & Friml, J. 2006. Auxin signaling. *J. Cell Sci.* 119: 1199-1202
- Pandey, A., Palni, L.M. 2007. The rhizosphere effect in trees of the Indian Centra Himalaya with special reference to altitude. *Appl Ecol Env Res*, 2007 5(1): 93-102
- Paradkar, A., Trefzer, A., Chakraborty., Stassi, D. 2003. *Streptomyces* genetics: A genomic perspective. *Crit Rev Biotechnol*, 23:1-5.
- Pelaez, F. 2006. The historical derive of antibiotic from microbial natural product—can history repeat? *J. Biochem. Pharmacol.* 71: 981-990
- Pérez, B. J., Cañedo, L.M.; Fernández, P.J.L., Silva, E.M.V. 1997. Thiocoraline, a novel depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. II. Physicochemical properties and structure determination. *J. Antibiot.* 50: 738-741.
- Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. 2005. Review article: bifidobacteria as probiotic agents—physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther* 22:495-512.
- Piel, J. 2004. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 21: 519-538
- Ping, L & Boland, W. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 9: 263–266

- Pupo, M.T., Guimaraes, D.O., Furtado, N.A.J.C., Borges, W.S. 2006. Microbial natural products: *a promising source of bioactive compounds. Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry* (TaftCA, ed): 51–78
- Rascher, A. Zhihao, H, Buchanan, G.O., Reid, R and Hutchinson, R 2005. Insights into the biosynthesis of the Benzoquinone, Ansamycins, Geldanamycin and Herbimycin, obtained by gene sequencing and disruption. *Appl Environ Microbiol*, 4862–4871
- Rao, N.S.S. 1982. Phosphate solubilization by soil microorganisms. In N.S. Rao (ed.) *Advanced in Agricultural Microbiology*. New Delhi: Oxford and IBH Publishing Co.
- Robinson, J.A 1991. Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis". *Philos T Roy Soc B*. 332: 107– [DOI:10.1098/rstb.1991.0038](https://doi.org/10.1098/rstb.1991.0038).
- Rosruen, T dan Pornpakaku, S. 2008. Screening for antimicrobial from endophytic fungi isolated from *Melaleuca cajuputi* Powell. Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology, October 14th - 17th 2008
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor joining method: A new method for constructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Schneider, K., Keller, S., Wolter, F.E., Röglin, L., Beil, W., Seitz, O., Nicholson, G., Bruntner, C., Riedlinger, J., Fiedler, H.P., Süßmuth, R.D. 2008. Proximicins A, B, and C-antitumor furan analogues of netropsin from the marine actinomycete *Verrucosispora* induce upregulation of p53 and the cyclin kinase inhibitor p21. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47: 3258-3261
- Schoenian, I., Paetz, C., Dickschat, J.S., Aigle, B., Leblond, P., Spiteller, D. 2012. An unprecedented 1,2-shift in the biosynthesis of the 3-aminosalicylate moiety of antimycins. *Chem Bio Chem*. 13:769–773
- Scholz-Ahrens, K.E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Ail, Y., Gluer, C.C., Schrezenmeir, J. 2007. Prebiotics, probiotics,

- and symbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *J Nutr* 137:838S-846.
- Schmuhl R. 2001. Adsorption of Cu(II) and Cr(VI) ions by chitosan: kinetics and equilibrium studies. *Studies Water SA* 27 (1).
- Sembiring, L. 2009. Molecular phylogenetic classification of Streptomyces isolated from the rhizosphere of tropical legume (*Paraserianthes falcataria*) (L.) Nielsen. *Hayati J Bios*, 16 (3) : 100-108.
- Smolander, A. & Sundman, V. 1987. Frankia in acid soils of forests devoid of actinorhizal plants. *Plant Physiol*, 70:297-303.
- Söderberg, KH & Bååth, E. 1998. Bacterial activity along a young barley root measured by the thymidine and leucine incorporation techniques. *Soil Biol Biochem*, 30:1259-1268
- Solanki, R., Khanna, M., Lai, R. 2008. Bioactive compounds from marine Actinomycetes. *Indian J. Microbiol.* 48: 410-431
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 471–491.
- Sundarapandian, S., Sundaram, M.D., Tholkappian, P., Balasubramanian, V. 2002. Mosquitocidal properties of indigenous fungi and Actinomycetes against *Culex quinquefasciatus* Say. *J. Biol. Control.* 16: 89-91.
- Suzuki, S.I., Okuda, T, dan Komatsubara, S. 2000. Selective isolation and distribution of *Actinobispora* strain in soil. *Can J Microbiol*, 46: 708-715.
- Tahvonen, R & Avikainen, H. 1987. The biological control of seedborne *Alternaria brassicicola* of cruciferous plants with a powdery preparation of *Streptomyces* sp. *J. Agric. Sci. Fini.* 59: 199-208
- Tanaka, Y., & S. Omura. 1993. Agroactive compounds of microbial origin. *Annu. Rev. Microbiol.* 47 : 57-87
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*25: 4876-4882.

- Tresselt, D.; Eckardt, K.; Ihn, W. 1978. Antibiotics from Actinomycetes chemical composition of antibiotic griseorhodin A. *Tetrahedron* 34: 2693-2699.
- Trivedi, P.C., Pandey, S., Bhadauria, S. 2010. Text book of Microbiology, First Published in 2010 by Prem C. Bakliwal
- Trujillo, M.E & Goodfellow, M. 2003. Numerical phenetic classification of clinically significant aerobic sporoactinomycetes and related organisms. *Antonie van Leeuwenhoek*. 84(1), 39-68
- Tuncer, M., Andrew, S. B.I., Rob, A., Michael, T.W. 1999. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic Actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. *Enzyme and Microbial Technology*. 25. Issues 1-2: 38-47
- Unaogu, I. C., Gugnani, H.C. and Lacey, J.1994. Occurrence of thermophilic Actinomycetes in natural substrates in Nigeria. *Antonie van Leeuwenhoek*.,65: 1-5
- Vernekar, J.V., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, W. 2001. Novel bifunctional alkaline protease inhibitor protease inhibitory activity as the biochemical basis of antifungal activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 285(4): 1018-1024
- Vishnupriya1, B., Sundaramoorthi, C., Kalaivani, M., Selvam, K. 2010. Production of lipase from *Streptomyces griseus* and evaluation of bioparameters. *International Journal of Chem Tech Research*. 2 (3):1380-1383.
- Waksman, S. & Henrici, A. 1943. The nomenclature and classification of the Actinomycetes. *J Bacteriol* 46: 337-341.
- Williams, P.G., Miller, E.D., Asolkar, R.N., Jensen, P.R., Fenical, W. 2007. Arenicolides A-C, 26-membered ring macrolides from the marine Actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Org. Chem*. 72: 5025-5034
- Whipps, J. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* 52: 487-511

- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Macke, T. J., Fox, G. E., 1985, A phylogenetic definition of major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6:143–151.
- Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(12): 4576-9.
- Wu, S.J., Fotso, S., Li, F., Qin, S., Kelter, G., Fiebig, H.H., Laatsch, H. 2006. 39-N-carboxamidostaurosporine and selina-4(14),7(11)-diene-8,9-diol, new metabolites from a marine *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* 59: 331-337
- Wu, S.J., Fotso, S., Li, F., Qin, S., Laatsch, H. 2007. Amorphane sesquiterpenes from a marine *Streptomyces* sp. *J. Nat. Prod.* 70: 304-306.
- Yao, C.B.F., M. Schiebel, E. Helmke, H. Anke, and H. Laatsch. 2006. Prefluostatin and new urauchimycin derivatives produced by *Streptomyces* isolates, *Zeitschrift fur Naturforschung B* 61 (3): 320-325
- Yehuda, M.L. 2005. The search for novel secondary metabolites from marine obligate Actinomycetes. [myehuda@usc.edu](mailto:myehuda@usc.edu)
- Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Harris, B.N. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl Environ Microbiol* 68: 2198–2208.

# Riwayat Hidup



**Alimuddin Ali**, lahir di Sidrap pada tanggal 31 Desember 1969. Menyelesaikan pendidikan SD sampai SMA di Kabupaten Sidrap, Sul-Sel. Tahun 1996 mendapat ijazah Sarjana Sains (S.Si) dalam Ilmu Biologi (Mikrobiologi) dari FMIPA Universitas Hasanuddin Makassar. Tahun 1997,

diterima sebagai staf dosen di Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Makassar. Tahun 2000 melanjutkan pendidikan pada Program Pascasarjana UGM Yogyakarta dan mendapat ijazah Magister Sains (M.Si) tahun 2002. Pendidikan tingkat doktoral (S3) diselesaikan pada Program Studi Bioteknologi, UGM Yogyakarta Tahun 2012

Pengalaman mengajar meliputi: bertugas sebagai Asisten Dosen Tahun 1990-1996 di Jurusan Biologi dan Farmasi FMIPA UNHAS. Dosen Luar Biasa pada Universitas Indonesia Timur dan Akademi Kebidanan Muhammadiyah Makassar dan Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Kebangsaan Makassar sampai sekarang. Saat ini mengasuh mata kuliah *Mikrobiologi Dasar*, *Mikrobiologi Analitik* dan *Dasar-Dasar Teknik Fermentasi*, *Bioteknologi* di Jurusan Biologi FMIPA UNM dan Program Pascasarjana UNM. Tahun 2002 mendapat penghargaan dari PPS UGM sebagai lulusan terbaik Prodi MIPA dengan Predikat *Cum Laude*. Tahun 2012 menyelesaikan program S3 di Program Studi Bioteknologi UGM dan mendapat penghargaan sebagai lulusan Doktor (S3) dengan predikat *Cum Laude*. Tahun 2005 dan 2016 mendapat penghargaan sebagai Dosen Teladan dari FMIPA UNM. Sampai saat ini tercatat sebagai anggota Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia (PERMI) dan Perhimpunan Biologi Indonesia. Berbagai grant penelitian telah diterima baik dari RISTEK-DIKTI seperti: Dosen Muda, Program Riset MIPA, Hibah Bersaing, Hibah Kompetensi dan MP3EI serta dari Rooseno Awards (Akademi Ilmu Pengetahuan Indonesia) tahun 2013. Hasil penelitian telah dipublikasikan pada jurnal Nasional Terakreditasi (Berkala Penelitian Hayati, Indonesian Journal of Biotechnology, Biota) maupun pada jurnal Internasional Bereputasi (Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences, Microbes and Environment, Soil and Plant , dsb)