



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENAPISAN ACTINOMYCETES ASAL RAJA AMPAT,
PAPUA PENGHASIL ANTIMIKROBA DAN ANTIKANKER,
DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER ISOLAT-ISOLAT
TERPILIH**

TESIS

ARIF NURKANTO

1006786341

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPOK
2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENAPISAN ACTINOMYCETES ASAL RAJA AMPAT,
PAPUA PENGHASIL ANTIMIKROBA DAN ANTIKANKER,
DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER ISOLAT-ISOLAT
TERPILIH**

TESIS

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Magister Sains

Oleh :

ARIF NURKANTO

1006786341

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM PASCASARJANA

PROGRAM STUDI BIOLOGI

DEPOK

2012

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Arif Nurkanto

NPM : 1006786341

Tanda tangan :

Tanggal : 6 Juli 2012




Judul : Penapisan Actinomycetes Asal Raja Ampat,
Papua Penghasil Antimikroba dan
Antikanker, dan Identifikasi Molekuler Isolat-Isolat Terpilih


Nama : Arif Nurkanto

NPM : 1006786341

MENYETUJUI,


1. Komisi Pembimbing


Wellyzar Sjamsuridzal, PhD
Pembimbing I



Dr. Andria Agusta, M.Sc.
Pembimbing II

2. Komisi Penguji


Ariyanti Octari, Ph.D.
Penguji I


Drs. Iman Santoso, M.Phil.
Penguji II

**3. Ketua Program Studi Biologi
Program Pascasarjana FMIPA**


Dr. Luthfirda Sjahfirdi, M. Biomed.

**4. Ketua Program Pascasarjana
FMIPA Universitas Indonesia**


Dr. Adi Basukriadi, M.Sc.

Tanggal Lulus : 6 Juli 2012




HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Arif Nurkanto
NPM : 1006786341
Program studi : Mikrobiologi
Judul Tesis : Penapisan Actinomycetes Asal Raja Ampat, Papua
Penghasil Antimikroba dan Antikanker, dan Identifikasi
Molekuler Isolat-Isolat Terpilih

Telah berhasil saya pertahankan di hadapan dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. ()
Pembimbing II : Dr. Andria Agusta, M.Sc. ()
Penguji : Ariyanti Oetari, Ph.D. ()
Penguji : Drs. Iman Santoso, M.Phil. ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 6 Juli 2012

**HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK
KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika Universitas Indonesia, Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Arif Nurkanto

NPM : 1006786341

Program Studi : Biologi

Departemen : Biologi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Jenis Karya : Tesis

Dalam pengembangan ilmu pengetahuan. Menyetujui untuk memberikan kepada Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia dan Universitas Indonesia. Hak bebas royalti noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Penapisan Actinomycetes Asal Raja Ampat, Papua Penghasil Antimikroba dan Antikanker, dan Identifikasi Molekuler Isolat-Isolat Terpilih.

Beserta perangkatnya yang ada jika diperlukan. Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia dan Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengolah dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya dan mendapat persetujuan saya sebagai penulis/ pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal: 6 Juli 2012

Yang menyatakan,



(Arif Nurkanto)

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **Penapisan Actinomycetes Asal Raja Ampat, Papua Penghasil Antimikroba dan Antikanker, dan Identifikasi Molekuler Isolat-Isolat Terpilih**. Dalam menyelesaikan tesis ini, penulis banyak menerima bantuan, dukungan dan kerjasama yang baik dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Dr. Andria Agusta dan Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D. selaku pembimbing tesis yang telah banyak meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga untuk membimbing dan mengarahkan penelitian yang dikerjakan penulis.
2. Kementerian Riset dan Teknologi Republik Indonesia, atas dukungan dana beasiswa dan dana penelitian.
3. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, atas dukungan dana penelitian.
4. Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) yang memberi dukungan tempat, peralatan, dan bahan penelitian.
5. Dr. Luthfirda Sjahfirdi, M.Biomed. selaku Ketua Program Studi Biologi, Program Pascasarjana, FMIPA Universitas Indonesia (UI) dan Penasihat Akademik, yang telah memberikan arahan pada penulis.
6. Ariyanti Oetari, Ph.D. dan Drs. Iman Santoso, M.Phil. sebagai penguji tesis atas kritik, saran, dan masukan selama penulisan tesis.
7. Prof. Dr. Bambang Pontjo dari Laboratorium Kultur Sel Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor (IPB) atas bantuan selama penelitian uji sitotoksik.
8. Dr. Pratiwi, Dr. Heddy Julistiono, Agustinus Joko, Dian Alfian, dan Ahmad Fatoni dari Puslit Biologi LIPI atas kerjasama dan bantuan penelitiannya.
9. Dr. Tomohiko Tamura, Dr. Mashohito Suzuki, dan Prof. Dr. Ken Ichiro Suzuki dari NITE Biological Resource Center (NBRC) Jepang atas dukungan mikroba uji standar dan diskusinya.
10. Mbak Evi Setiawati yang banyak membantu urusan administrasi dalam pengerjaan penelitian.

11. Dina Fatmawati dan Juanna Nurshanti dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (UGM) untuk bantuan selama uji sitotoksik antikanker.
12. Istri tercinta, Citra Kusuma Asthi, dan anaku tersayang, Aqila Khirina Nareswari, atas doa, kasih sayang tulus, dan semangat yang tak pernah padam. Kalian berdua adalah inspirasiku.
13. Almarhum Ayahanda dan Ibu Mertua, karya ini saya dedikasikan sepenuhnya kepada beliau.
14. Ibu dan ayah mertua untuk semua doa dan perhatian kepada penulis.
15. Teman-teman laboratorium Kultur Koleksi Bidang Mikrobiologi LIPI, atas bantuan selama identifikasi.
16. Teman-teman program Pascasarjana Biologi UI untuk diskusi dalam penelitian dan penyusunan tesis.
17. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu-persatu atas semua bantuan dan dukungan dalam penelitian.

Penulis menyadari bahwa tesis yang telah disusun belum sempurna. Penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun dari semua pihak. Penulis berharap hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi semua pihak dan pengembangan ilmu pengetahuan.

Depok, Juli 2012

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
SUMMARY	xvi
PENGANTAR PARIPURNA	1
MAKALAH I : PENAPISAN ACTINOMYCETES YANG BERASAL DARI TANAH DAN SERASAH DI RAJA AMPAT, PAPUA PENGHASIL ANTIMIKROBA DAN ANTIKANKER	4
Abstract	4
Pendahuluan	5
Bahan dan Cara Kerja	9
Hasil dan Pembahasan	18
Kesimpulan	45
Saran	45
Ucapan Terimakasih	45
Daftar Acuan	46
MAKALAH II : IDENTIFIKASI ISOLAT-ISOLAT ACTINOMYCETES POTENSIAL PENGHASIL ANTIMIKROBA DARI RAJA AMPAT, PAPUA	54

Abstract	55
Pendahuluan	55
Bahan dan Cara Kerja	58
Hasil dan Pembahasan	62
Kesimpulan	90
Saran	90
Ucapan Terimakasih	90
Daftar Acuan	91
DISKUSI PARIPURNA	95
RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN	98
DAFTAR ACUAN	99
LAMPIRAN	103



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
I.1. Alur kerja proses pencarian senyawa obat dan purifikasi senyawa murni dari mikroba	6
I.2. Presentase antimikroba dari isolat uji berdasarkan jenis pelarut yang digunakan	22
I.3a. Kromatogram HPLC senyawa utama F.5.1 hasil purifikasi	24
I.3b. Spektrum massa senyawa utama F.5.1 hasil analisis LC-MS	24
I.4. Tingkat kebocoran asam nukleat dan protein pada <i>E. coli</i>	26
I.5. Tingkat kebocoran asam nukleat dan protein pada <i>B. subtilis</i>	27
I.6. Tingkat kebocoran asam nukleat dan protein pada <i>C. albicans</i>	28
I.7. Tingkat kebocoran asam nukleat dan protein pada <i>S. cerevisiae</i>	28
I.8. Tingkat kebocoran asam nukleat dan protein pada <i>A. niger</i>	29
I.9. Kurva standar urasil konsentrasi 5 ppm pada analisis HPLC	31
I.10. Hasil analisis HPLC kebocoran urasil pada <i>E. coli</i>	31
I.11. Hasil analisis HPLC kebocoran urasil pada <i>B. subtilis</i>	32
I.12. Hasil analisis HPLC kebocoran urasil pada <i>C. albicans</i>	32
I.13. Hasil analisis HPLC kebocoran urasil pada <i>S. cerevisiae</i>	33
I.14. Hasil analisis HPLC kebocoran urasil pada <i>A. niger</i>	33
I.15. Morfologi <i>E. coli</i> setelah perlakuan dengan senyawa F.5.1 dan kloramfenikol dengan pengamatan SEM	37
I.16. Morfologi <i>B. subtilis</i> setelah perlakuan dengan senyawa F.5.1 dan kloramfenikol dengan pengamatan SEM	39
I.17. Morfologi <i>C. albicans</i> setelah perlakuan dengan senyawa F.5.1 dan nistatin dengan pengamatan SEM	40
I.18. Morfologi <i>A. niger</i> setelah perlakuan dengan senyawa F.5.1 dan nistatin dengan pengamatan SEM	42
II.1. Hasil elektroforesis produk PCR gen 16S rRNA dari sembilan isolat actinomycetes terseleksi	63
II.2. Pohon filogenetik isolat actinomycetes yang diidentifikasi berdasarkan <i>full sequence</i> gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000	

replikasi <i>bootstrap</i>	66
II.3. Pohon filogenetik isolat BL-36-1 yang diidentifikasi berdasarkan <i>full sequence</i> gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi <i>bootstrap</i>	68
II.4. Pohon filogenetik isolat BL-20-2 yang diidentifikasi berdasarkan <i>full sequence</i> gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi <i>bootstrap</i>	70
II.5. Pohon filogenetik isolat BL-14-2 yang diidentifikasi berdasarkan <i>full sequence</i> gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi <i>bootstrap</i>	73
II.6. Pohon filogenetik isolat RC-SS-37-4 yang diidentifikasi berdasarkan <i>full sequence</i> gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi <i>bootstrap</i>	75
II.7. Pohon filogenetik isolat RC-SS-37-16 yang diidentifikasi berdasarkan <i>full sequence</i> gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi <i>bootstrap</i>	78
II.8. Pohon filogenetik isolat BL-22-1 yang diidentifikasi berdasarkan <i>full sequence</i> gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi <i>bootstrap</i>	80
II.9. Pohon filogenetik isolat BL-06-5 yang diidentifikasi berdasarkan <i>full sequence</i> gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi <i>bootstrap</i>	82
II.10. Pohon filogenetik isolat BL-22-3 yang diidentifikasi berdasarkan <i>full sequence</i> gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi <i>bootstrap</i>	84
II.11. Pohon filogenetik isolat BL-22-5 yang diidentifikasi berdasarkan <i>full sequence</i> gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi <i>bootstrap</i>	86

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
I.1. Perbandingan senyawa aktif yang dihasilkan oleh actinomycetes, Fungi, dan bakteri	5
I.2. Aktivitas antimikrobadari 100 isolat actinomycetes asal Raja Ampat, Papua	19
I.3. Nilai MIC senyawa murni dari isolat BL-22-5	25
I.4. Konsentrasi kebocoran urasil berdasarkan analisis HPLC	35
I.5. Nilai IC ₅₀ ekstrak F.5.1 dan doxorubicin terhadap sel kanker	43
II.1. Kalkulasi panjang basa hasil sekuensing gen 16S rRNA terhadap sembilan isolat actinomycetes terseleksi	63
II.2. Hasil identifikasi actinomycetes berdasarkan gen 16S rRNA	64
II.3. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-36-1 dan isolat terdekatnya	69
II.4. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-20-2 dan isolat terdekatnya	71
II.5. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-14-2 dan isolat terdekatnya	74
II.6. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat RC-SS-37-4 dan isolat terdekatnya	77
II.7. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat RC-SS-37-16 dan isolat terdekatnya	79
II.8. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-22-1 dan isolat terdekatnya	81
II.9. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-06-5 dan isolat terdekatnya	83
II.10. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-22-3 dan isolat terdekatnya	85
II.11. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-22-5 dan isolat terdekatnya	87

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil penapisan antimikroba isolat actinomycetes asal Raja Ampat	103
2. Kontrol negatif dan positif yang digunakan pada pengujian antimikroba..	105
3. Standar urasil pada analisis HPLC	105
4. Pengujian fisiologi isolat dengan API-20®	106
5. Foto isolat actinomycetes terseleksi asal Raja Ampat pada medium YSA .	107
6. Urutan basa hasil <i>contiq</i> isolat BL-36-1	108
7. Urutan basa hasil <i>contiq</i> isolat BL-20-2	108
8. Urutan basa hasil <i>contiq</i> isolat BL-14-2	108
9. Urutan basa hasil <i>contiq</i> isolat RC-SS-37-4	109
10. Urutan basa hasil <i>contiq</i> isolat RC-SS-37-16	109
11. Urutan basa hasil <i>contiq</i> isolat BL-22-1	109
12. Urutan basa hasil <i>contiq</i> isolat BL-06-5	110
13. Urutan basa hasil <i>contiq</i> isolat BL-22-3	110
14. Urutan basa hasil <i>contiq</i> isolat BL-22-5	110
15. Hasil identifikasi gen 16S rRNA actinomycetes dengan kemampuan antimikroba tertinggi	111
16. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat actinomycetes terseleksi asal Raja Ampat, Papua	115

ABSTRAK

Nama : Arif Nurkanto
Program studi : Pascasarjana Biologi
Judul tesis : Penapisan Actinomycetes Asal Raja Ampat, Papua Penghasil Antimikroba dan Antikanker, dan Identifikasi Molekuler Isolat-Isolat Terpilih.

Penelitian bertujuan memperoleh identitas isolat-isolat actinomycetes dari Raja Ampat, Papua penghasil antimikroba dan antikanker dengan aktivitas tertinggi. Penapisan aktivitas antimikroba dilakukan menggunakan metode difusi agar terhadap bakteri (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*) dan khamir (*Candida albicans* dan *Saccharomyces cerevisiae*). Metabolit dari isolat terpilih yang memiliki aktivitas antimikroba tertinggi dianalisis lanjut. Nilai *Minimum inhibitor concentration* (MIC) dari senyawa murni yang diproduksi isolat terpilih terhadap mikroba diukur menggunakan metode mikrodilusi. Kebocoran asam nukleat dan protein dari mikroba uji dideteksi dengan menggunakan metode spektrofotometri pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Kebocoran urasil dianalisis menggunakan HPLC. Perubahan morfologi diamati menggunakan *scanning electron microscope* (SEM). Uji sitotoksik dilakukan terhadap 6 sel kanker (MCM-B2, Leukemia, T47D, HeLa, A549, dan WiDr) dan satu sel normal (Vero) menggunakan metode *trypan blue* dan MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*). Sebanyak sembilan isolat potensial penghasil antimikroba tertinggi (BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, RC-SS-37-4, RC-SS-37-16, BL-22-1, BL-06-5, BL-22-3, dan BL-22-5) diidentifikasi berdasarkan data sekuen penuh gen 16S rRNA (± 1.500 PB). Hasil penelitian menunjukkan 44 % isolat actinomycetes memiliki aktivitas antimikroba. Senyawa F.5.1 merupakan senyawa murni yang diproduksi oleh isolat terpilih BL-22-5. Nilai MIC senyawa tersebut terhadap mikroba uji berkisar 16 -- 64 $\mu\text{g/ml}$. Aktivitas antifungi senyawa F.5.1 lebih tinggi dibandingkan antibakteri. Senyawa F.5.1 menyebabkan kebocoran protein, asam nukleat, dan urasil pada mikroba uji. Nilai IC_{50} senyawa F.5.1 berkisar 0,02 -- 3,81 $\mu\text{g/ml}$ terhadap sel kanker dan ≥ 30.000 $\mu\text{g/ml}$ untuk sel normal. Isolat RC-SS-37-4, RC-SS-37-16, BL-22-3, dan BL-22-5 teridentifikasi sebagai *Streptomyces costaricanus* (100 %), *Streptomyces costaricanus* (99,8 %), *Streptomyces parvulus* (98,6 %), dan *Streptomyces badius* (98,9 %). Lima isolat teridentifikasi sebagai *Streptomyces* spp. (BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, BL-22-1 dan BL-06-5) dan menjadi kandidat spesies baru karena memiliki nilai homologi yang rendah terhadap spesies terdekatnya (93,9% -- 97,4 %).

Kata kunci : actinomycetes, antikanker, antimikroba, gen16S rRNA, Raja Ampat

ABSTRACT

Name : Arif Nurkanto
Study of programe : Magister Biology
Thesis title : Screening of Antimicrobial and Anticancer Activities of Actinomycetes Isolated from Raja Ampat, Papua and Molecular Identification of Selected Isolates.

The objective of this research was to obtain the identity of actinomycetes isolates from Raja Ampat, Papua-producing antimicrobial and anticancer with the highest activity. Antimicrobial screening was conducted based on agar diffusion method against bacteria (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*) and yeast (*Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*). Metabolite from selected isolates with the highest antimicrobial activity was chosen for subsequent analysis. Minimum inhibitor concentration (MIC) value against microbial tested of pure bioactive compound was determined using microdilution method. Leakages of nucleic acids and proteins from microbial tested were detected using UV-vis spectrophotometer method on 260 and 280 nm wavelengths. Uracil Leakage was analyzed using HPLC. Morphological changes were observed using a scanning electron microscope (SEM). Determination of cytotoxic activity was conducted in 6 cell lines (MCM-B2, Leukemia, T47D, HeLa, A549, and WiDr) and normal cell (Vero) using trypan blue and MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) methods. Nine selected isolates with the highest antimicrobial activity (BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, RC-SS-37-4, RC-SS-37-16, BL-22-1, BL-06-5, 22-3-BL and BL-22-5) were identified based on full sequence of 16S rRNA gene (1,500 bp). The results showed 44% of isolates of actinomycetes have antimicrobial activity. F.5.1 is a compound produced by the selected isolate (BL-22-5). MIC values of this compound against tested microbes in range of 16 -- 64 µg/ml. Antifungal activity from F.5.1 compound was higher than antibacterial activity. F.5.1 compound caused leakage of proteins, nucleic acids, and uracil on tested microbes. Inhibitor concentration 50% (IC₅₀) value in the range of 0.02 -- 3.81 µg/ml against cancer cells and ≥ 30,000 µg/ml for normal cells. Isolate RC-SS-37-4, RC-SS-37-16, BL-22-3, and BL-22-5 have been identified as *Streptomyces costaricanus* (100%), *Streptomyces costaricanus* (99.8%), *Streptomyces parvulus* (98.6%), and *Streptomyces badius* (98.9%), respectively. Five isolates (BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, BL-22-1 and BL-06-5) were identified as *Streptomyces* spp. and can be presumed as candidates for new species because of the low homology value to their closest related species (93.9 % -- 97.4%).

Keywords : actinomycetes, anticancer, antimicrobial, Raja Ampat, 16S rRNA gene.

Name : Arif Nurkanto (NIM : 1006786341)

Date : July 6th 2012

Thesis title : SCREENING OF ANTIMICROBIAL
AND ANTICANCER ACTIVITIES OF
ACTINOMYCETES ISOLATED FROM RAJA AMPAT,
PAPUA AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF
SELECTED ISOLATES

Thesis supervisor : Wellyzar Sjamsuridzal, Ph.D.; Dr. Andria Agusta, M.Sc.

SUMMARY

Diseases caused by infection of microorganisms and cancers have been increasing progressively for the past decades. However, the number and variety of drugs available in the market are not enough to overcome the new emerging diseases. This research was aimed to obtain antimicrobial and anticancer compounds which were focused on microbial natural products. Microorganisms, especially actinomycetes, are known as potential natural product sources and provide us many important bioactive compounds with commercial value.

Problems in this research were obtained many actinomycetes isolates from Raja Ampat, Papua but antimicrobes and anticancer from these isolates have been unknown. Antimicrobes distribution based on sources, both soil and leaf litters, have also never been known. Identity of actinomycetes isolates preserved and deposited were uncompleted. Screening of actinomycetes producing antimicrobial and anticancer and identification of selected isolates in this research were expected to solve some problems mentioned. The objective of this research was to obtain the identity of actinomycetes isolates from Raja Ampat, Papua, producing antimicrobial and anticancer with the highest activity.

We have divided our results of this research into two separated papers. The first paper was Antimicrobial and anticancer screening of soil and leaf litter's

actinomycetes isolated from Raja Ampat. The second paper was Identification of selected actinomycetes with antimicrobial activity from Raja Ampat, Papua.

We conducted antimicrobial screening of actinomycetes isolates collected from Raja Ampat, Papua. Actinomycetes were isolated from soil and leaf litter samples collected by Nurkanto *et al.* (2008). Metabolites from one hundred actinomycetes isolates were extracted using organic solvent (ethyl acetate : methanol) and water solvent. These metabolites were screened for their antimicrobial activities against bacteria (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and *Micrococcus luteus*) and yeasts (*Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*). Antimicrobial screening was conducted using agar diffusion method.

Nine selected isolates with the highest antimicrobial activity were selected from this research and were identified based on 16S rRNA gene sequences data. Six primers (20F, 520F, 920F, 1500R, 920R, and 520R) were used in this research. Sequence similarity was searched by Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program. Metabolite from selected isolate with the highest antimicrobial activity was chosen for subsequent analysis. Metabolite was purified by column chromatography and *Sephadex*[®] LH-20 method then evaluated using HPLC and LCMS. This pure metabolite obtained was used in Minimum inhibitor concentration (MIC), leakage of protein, nucleic acid, uracil, and morphological changes analyses to tested microbes. Cytotoxic analysis to cancer also conducted using this pure metabolite.

Minimum inhibitor concentration (MIC) value against tested microbes of pure bioactive compound was determined using microdilutin method. Leakages of nucleic acids and proteins were detected using UV-vis spectrophotometer method on 260 and 280 nm wavelengths. Uracil Leakage was analyzed using HPLC. Morphological changes and cell necrosis were observed using a scanning electron microscope (SEM). Determination of cytotoxic activity was conducted in 6 cell lines (MCM-B2, Leukemia, T47D, HeLa, A549, and WiDr) and normal cell (Vero) using trypan blue and MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) methods.

Our research showed that 44 isolates were found to have antimicrobial activities. The isolate BL-22-5 was selected for further study. It showed the highest antibacterial and antifungal activity. We had obtained pure major bioactive compound (F.5.1) produced by isolate BL-22-5. MIC values against bacterial and fungal isolates from pure bioactive compound of F.5.1 in the range of 16 -- 64 µg/ml. These results indicated leakages of protein, nucleic acid and uracil of microbial cells (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* and *A. niger*) after treated with the pure metabolite F.5.1. Treatment using metabolite F.5.1 also caused morphological changes and necrotic in microbial cells. Inhibitor concentration (IC₅₀) values for cancer cell lines in the range of 0.02--3.81 µg/ml and ≥ 30,000 µg/ml for normal cell. From our study, we found pure metabolite F.5.1 produced by isolate BL-22-5 had higher activity than commercial anticancer doxorubicin and was not toxic to normal cell.

Nine most potent isolates selected were BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, RC-SS-37-4, RC-SS-37-16, BL-22-1, BL-22-3, and BL-22-5 as antibacteria and antifungi and BL-06-5 as antifungi. These isolates showed high sequence similarities to *Streptomyces mobaraensis* (95.2%), *Streptomyces violarius* (97.4%), *Streptomyces kanamyceticus* (93.9%), *Streptomyces costaricanus* (100%), *Streptomyces costaricanus* (99.8%), *Streptomyces labedae* (94.6%), *Streptomyces parvulus* (98.6%), and *Streptomyces badius* (98.9%), respectively. Isolate BL-06-5 has similarity with *Streptomyces kunmingensis* (96.2%). Morphological and physiological characterizations of those 9 isolates were performed in this research.

This research obtained one actinomycetes isolate with antibacterial, antifungal and anticancer activity. Results of this research have the potential to be developed for new drug as both antimicrobes and anticancer. From this study we also found five novel species candidates from genus *Streptomyces* (isolate BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, BL-22-1, and BL-06-5) because of their low sequence similarity with the closest species and require more detail analyses.

xvii + 116 pages; 30 plates, 16 tables, 16 appendixes

Bibliography : 145 (1963 – 2012)

PENGANTAR PARIPURNA

Kasus penyakit infeksi mikroorganisme dan penyakit kanker semakin meningkat secara progresif dari tahun ke tahun (Anand *et al.* 2008; National Cancer Institute 2010; WHO 2011). Salah satu penyebab peningkatan penyakit tersebut adalah bertambahnya mikroorganisme patogen dan tingkat resistensi. Peningkatan kasus penyakit tersebut diikuti dengan peningkatan kebutuhan obat. Akan tetapi, jumlah dan jenis obat yang tersedia di pasaran jauh lebih rendah dibandingkan dengan kebutuhan obat yang tinggi (Phoebe *et al.* 2001; Donaldio *et al.* 2010; Pozzi *et al.* 2011).

Kebutuhan obat yang tinggi mendorong perlu dilakukannya pencarian senyawa antimikroba dan antikanker baru secara intensif. Penelitian untuk memperoleh senyawa antimikroba dan antikanker secara umum difokuskan pada bahan alam. Bahan alam dapat diperoleh dari tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme (Newman *et al.* 2000; Dewick 2002; Newman & Cragg 2004). Bahan alam yang bersumber dari mikroorganisme menjadi pilihan penting karena berbagai pertimbangan. Mikroorganisme dapat memproduksi senyawa aktif dalam waktu cepat, mudah dimanipulasi, dan tidak memerlukan tempat luas dalam produksinya (Madigan *et al.* 2003).

Indonesia merupakan salah satu negara tropis dengan biodiversitas tertinggi di dunia termasuk mikroorganisme, khususnya actinomycetes (Lisdiyanti *et al.* 2010; Otaguro *et al.* 2010). Eksplorasi keanekaragaman actinomycetes di beberapa kawasan di Indonesia selama 5 tahun (2002-2006) yang dilaporkan oleh Widyastuti dan Ando telah berhasil mengoleksi sekitar 3.000 isolat actinomycetes. Sebanyak 57 genus actinomycetes diperoleh dari sampel tanah dan 33 genus actinomycetes dari sampel serasah. Eksplorasi actinomycetes di Indonesia menghasilkan rata-rata jenis baru sebesar 23 % dari total isolat yang dikoleksi (Widyastuti & Ando 2009). Walaupun demikian, eksplorasi senyawa antimikroba dan antikanker dari actinomycetes di Indonesia belum banyak dilakukan.

Actinomycetes merupakan mikroorganisme yang paling banyak menghasilkan senyawa antimikroba dibandingkan mikroorganisme lain ataupun sumber alami lain termasuk tumbuhan dan hewan. Selain sebagai penghasil antimikroba, beberapa actinomycetes juga menghasilkan senyawa antikanker (Lowovskaya *et al.* 1997; Renu *et al.* 2008). Sampai saat ini telah banyak penelitian dan penemuan antimikroba yang berasal dari actinomycetes di seluruh dunia (Lechevalier 1992; Renu *et al.* 2009). Akan tetapi, kajian mengenai actinomycetes penghasil antimikroba di Indonesia masih sangat terbatas. Penelitian yang dilaporkan oleh Sunaryanto dan Marwoto (2010) menginformasikan bahwa actinomycetes dari sedimen laut di Banten, Jawa Barat memiliki aktivitas antimikroba, walaupun dengan kemampuan yang relatif rendah. Walaupun demikian, sampai saat ini belum ada laporan mengenai penemuan isolat actinomycetes yang menghasilkan dua aktivitas, yaitu antimikroba dan antikanker dari Indonesia.

Raja Ampat, Papua adalah sebuah kabupaten yang termasuk dalam propinsi Papua Barat. Secara topografi, Raja Ampat terdiri dari gugusan kepulauan dengan empat pulau besar, yaitu Waigeo, Batanta, Salawati, dan Misol. Raja Ampat, Papua merupakan daerah hutan hujan tropis dengan biodiversitas laut tertinggi di dunia (Conservation International 2006). Raja Ampat, Papua juga merupakan *hot spot* keanekaragaman hayati flora dan fauna dan dicalonkan menjadi salah satu warisan dunia oleh UNESCO (Conservation International 2006). Walaupun keanekaragaman laut di Raja Ampat telah banyak dipublikasikan, informasi mengenai keanekaragaman terestrial Raja Ampat, terutama data keanekaragaman mikroorganismenya yaitu actinomycetes belum banyak dilaporkan. Selain data keanekaragaman mikroba, potensi mikroba Raja Ampat sebagai antimikroba maupun antikanker belum pernah dilaporkan.

Raja Ampat memiliki keanekaragaman tumbuhan dan hewan yang tinggi. Sebagai contoh, Raja Ampat memiliki 1.104 jenis ikan, 699 moluska, dan 537 hewan karang. Raja Ampat memiliki keragaman ikan dan terumbu karang tertinggi di dunia (McKenna *et al.* 2002; Conservation International 2006). Keanekaragaman tumbuhan di Raja Ampat juga sangat tinggi. Penelitian yang

dilakukan Mirwanto *et al.* (2007) serta Suharjo dan Fanani (2007) menemukan 117 jenis tumbuhan di hutan mangrove dan 150 jenis tumbuhan dari 12 plot sampling di hutan dataran rendah Raja Ampat. Tingginya keanekaragaman hewan dan tumbuhan tersebut kemungkinan juga diikuti tingginya keanekaragaman mikroba, termasuk actinomycetes. Mikroorganisme termasuk actinomycetes memiliki interaksi yang kuat dengan tumbuhan dan hewan (Madigan *et al.*, 2003).

Actinomycetes dapat diidentifikasi dengan menggunakan berbagai macam cara. Identifikasi actinomycetes dapat dilakukan secara morfologi, fisiologi, biokimia, dan molekuler. Identifikasi morfologi, fisiologi, dan biokimia kurang memberikan data yang akurat dan tidak dapat mengidentifikasi sampai pada level spesies. Identifikasi molekuler menjadi pilihan penting yang digunakan karena memiliki akurasi yang lebih tinggi. Metode molekuler dapat mengidentifikasi actinomycetes sampai tingkat spesies (Miyadoh 1997; Madigan *et al.* 2003).

Permasalahan yang dihadapi dalam penelitian ini adalah telah banyak diperoleh isolat actinomycetes asal Raja Ampat, Papua, namun potensinya sebagai antimikroba dan antikanker belum diketahui. Distribusi aktivitas antimikroba berdasarkan sumber isolat, baik dari tanah maupun seresah, juga belum diketahui. Identitas isolat-isolat yang telah diisolasi dan disimpan juga belum diketahui. Penapisan actinomycetes penghasil antimikroba dan antikanker serta identifikasi isolat-isolat terpilih yang dilakukan dalam penelitian ini diharapkan mampu memecahkan permasalahan yang dihadapi.

Tujuan penelitian adalah memperoleh isolat-isolat unggul actinomycetes penghasil antimikroba dan antikanker dari Raja Ampat, Papua dan senyawa antimikroba dan antikanker dari isolat actinomycetes tersebut. Identitas isolat-isolat unggul penghasil antimikroba dan antikanker juga menjadi target penelitian ini. Isolat actinomycetes terseleksi dalam penelitian ini diidentifikasi secara molekuler dengan pendekatan gen 16S rRNA. Karakterisasi fisiologi dan morfologi dalam penelitian ini dilakukan sebagai pelengkap identifikasi molekuler dan untuk deskripsi isolat yang telah teridentifikasi. Hasil penelitian ini akan menjadi sumber informasi pertama mengenai potensi actinomycetes di Raja Ampat sebagai penghasil antimikroba dan antikanker.

MAKALAH I

PENAPISAN ACTINOMYCETES YANG BERASAL DARI TANAH DAN SERASAH DI RAJA AMPAT, PAPUA PENGHASIL ANTIMIKROBA DAN ANTIKANKER

ANTIMICROBIAL AND ANTICANCER SCREENING OF SOIL AND LEAF LITTER'S ACTINOMYCETES ISOLATED FROM RAJA AMPAT

Arif Nurkanto

arief_nurkanto@yahoo.com

ABSTRACT

Objectives of this research were to obtain actinomycetes isolates and pure bioactive compound with antimicrobial and anticancer activities from Raja Ampat, Papua. We conducted antimicrobial screening of organic extracts of actinomycetes cultures collected from Raja Ampat. One hundred of actinomycetes extracts were investigated for their antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* by using an agar diffusion method. Metabolite from isolate BL-22-5 was selected for further analyses based on the highest antimicrobial activity. Metabolite was purified with silica column and *Sephadex*[®] LH-20 and evaluated using HPLC and LCMS. Minimum inhibitor concentration (MIC) against bacterial and fungal isolates from pure metabolite was determined using microdilution method. Protein and nucleic acid leakage from *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *C. albicans* and *A. niger* were investigated using UV-vis spectrophotometer at 260 and 280 nm, and uracil leakage was detected using HPLC. Morphological changes and necrotic microbial cells were also detected by using Scanning Electron Microscope (SEM). Determination of cytotoxic activity was conducted in 6 cancer cell lines (MCM-B2, Leukimia, T47D, HeLa, A549, and WiDr) and normal cell (Vero) using trypan blue counting and MTT assay. This result showed that 44 isolates have antimicrobial activity. We had obtained pure major bioactive compound F.5.1 produced by isolate BL-22-5. MIC values were detected in the range of 16 -- 64 µg/ml. This study indicated leakage of protein, nucleic acid, uracil and morphological change of microbial cells after treated with the pure metabolite F.5.1. Inhibitor concentration (IC₅₀) value for cancer cell lines was varied in the range of 0.02 – 3.81 µg/ml and ≥ 30,000 µg/ml for normal cell.

Keywords : actinomycetes, anticancer, antimicrobial, Raja Ampat.

Universitas Indonesia

PENDAHULUAN

Actinomycetes adalah mikroorganisme dari *Kingdom Eubacteria* (Kelas *Actinobacteria*) yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif sebagai sumber obat potensial (Czoch & Mordaski 1988; Mann 2001; Berdy 2005; Solanki *et al.* 2008). Sampai saat ini telah banyak penelitian dan penemuan antimikroba yang berasal dari actinomycetes di seluruh dunia (Lechevalier 1992; Renu *et al.* 2009). Actinomycetes paling banyak menghasilkan senyawa antimikroba terutama antibiotik (Berdy 2005) (Tabel I.1).

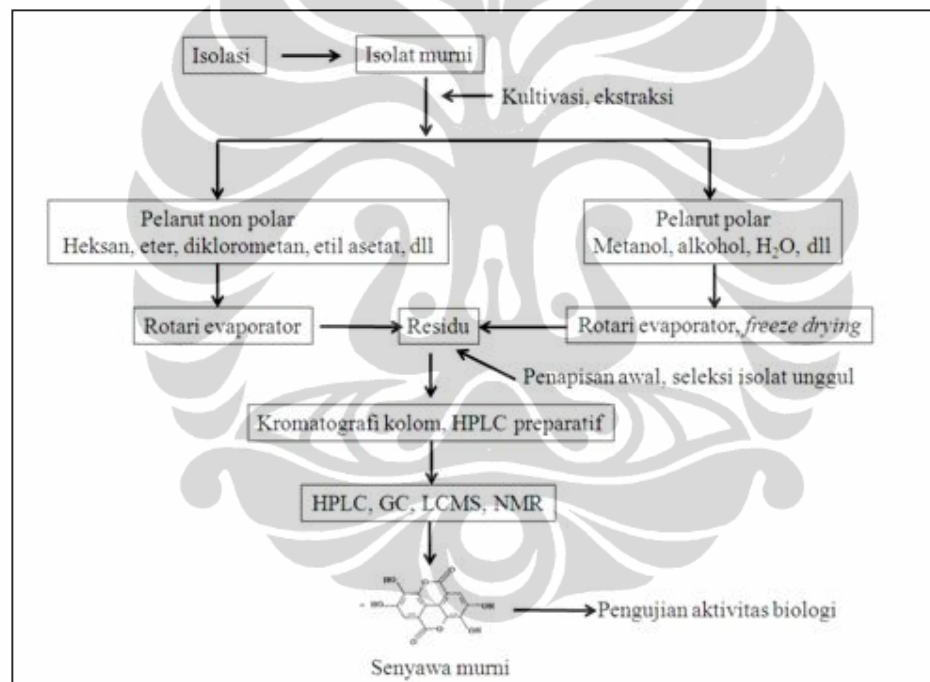
Tabel I.1. Perbandingan senyawa aktif yang dihasilkan oleh actinomycetes, fungi, dan bakteri selain actinomycetes

Kelompok mikroorganisme	Antibiotik	Metabolit lain	Obat komersial
Actinomycetes	8.700	900	100 – 120
Fungi	4.900	3.700	30 – 35
Bakteri lain	2.900	1.400	10 – 12

Senyawa metabolit yang telah diproduksi actinomycetes dan telah dikomersialkan cukup banyak. Selain sebagai penghasil antimikroba, beberapa actinomycetes juga menghasilkan senyawa antikanker (Lowovskaya *et al.* 1997; Renu *et al.* 2008). Sebagai contoh senyawa yang banyak dikenal saat ini adalah rapamisin, rifamisin, dan doksorubisin yang masing-masing dihasilkan oleh *Streptomyces hygroscopicus* Jansen, *Amycolatopsis mediterranei* (Margalith & Beretta) Lechevalier, dan *Streptomyces peuceutius* Grein. Ketiga contoh senyawa tersebut telah diproduksi secara komersial sebagai antibiotik, antifungi, dan antikanker (Lowovskaya *et al.* 1997; Krishna *et al.* 1998; Renu *et al.* 2008).

Pencarian senyawa antimikroba dan antikanker dari actinomycetes diperoleh melalui proses yang relatif kompleks. Langkah awal dengan melakukan sampling substrat yang diduga mengandung actinomycetes, seperti tanah dan serasah. Tanah dan serasah merupakan habitat utama actinomycetes (Miyadoh 1997; Madigan *et al.* 2003). Isolasi actinomycetes dilakukan dengan teknik

khusus, seperti penambahan ekstrak tanah, sentrifugasi dan penggunaan medium selektif (Hayakawa *et al.* 1991; Kurtboke 2001; Hayakawa *et al.* 2004). Setelah diperoleh isolat-isolat actinomycetes, langkah berikutnya adalah penapisan senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antimikroba dan antikanker dari isolat-isolat tersebut. Tahap selanjutnya adalah melakukan produksi, purifikasi, elusidasi, dan identifikasi senyawa aktif dari isolat-isolat yang potensial. Uji *in vitro* untuk mengetahui efektivitas dan toksisitas senyawa aktif yang diperoleh dari isolat-isolat potensial menjadi tahapan selanjutnya. Secara skematis, proses pencarian senyawa obat dapat diuraikan seperti pada Gambar I.1 berdasarkan Samy & Gopalakrishnakone (2010).



[sumber : Samy & Gopalakrishnakone 2010]

Gambar I.1. Alur kerja proses pencarian senyawa obat dan purifikasi senyawa murni dari mikroba

Penapisan actinomycetes sebagai penghasil obat antimikroba dan antikanker dapat dilakukan dengan berbagai metode. Saat ini telah dikembangkan metode penapisan cepat dengan pendekatan metagenomik, kombinatorial kimia, dan *high-throughput* (Uchiyama & Watanabe 2007). Khusus untuk antimikroba,

penapisan juga dapat dilakukan dengan uji antagonis isolat-isolat actinomycetes terhadap mikroba uji. Uji antagonis dengan cara penentuan zona bening di sekitar metabolit yang diproduksi oleh actinomycetes terhadap mikroba uji, atau dikenal sebagai metode difusi agar (Rahman *et al.* 2005; Schwalbe *et al.* 2007). Metode difusi agar terhadap antimikroba, terutama antifungi, juga dapat digunakan sebagai langkah awal dalam pencarian senyawa antikanker (Nitiss & Heitman 2007).

Respon mikroba uji terhadap paparan senyawa antimikroba bervariasi. Respon tersebut secara umum dibedakan menjadi dua, yaitu sensitif dan resisten atau tahan (Madigan *et al.* 2003). Jika mikroba bersifat sensitif, maka dapat diketahui dengan terhambatnya pertumbuhan atau kematian mikroba tersebut. Mekanisme penghambatan atau kematian mikroba terhadap paparan senyawa aktif dapat diketahui dengan adanya kebocoran sel, gangguan metabolisme dan perubahan morfologi sel (Sumthong & Verpoorte 2010). Kebocoran sel yang disebabkan oleh pemaparan senyawa antimikroba dapat dideteksi dengan keluarnya material intraseluler yang berlebihan seperti ion, asam nukleat, dan protein (Miksusanti *et al.* 2008). Perubahan morfologi sel dapat dilihat dengan *scanning* atau *transmission electron microscopy* (SEM atau TEM) (Kai *et al.* 1999).

Respon mikroba terhadap paparan senyawa antimikroba tidak lepas dari mekanisme kerja senyawa itu sendiri. Senyawa aktif dapat menghambat pertumbuhan mikroba dengan beberapa mekanisme. Secara umum mekanisme tersebut dengan mengganggu fungsi dinding dan membran sel (Lambert & O'Grady 1992), gangguan terhadap asam nukleat (Hugo & Russell 1992) dan gangguan terhadap mekanisme enzimatik (Hugo & Russell 1992; Neu 1992; Tenover 2006).

Senyawa antikanker dapat menghambat pertumbuhan sel melalui mekanisme yang cukup kompleks. Sampai saat ini mekanisme detail dari senyawa antikanker belum dapat terpecahkan (Joensuu 2008). Walaupun demikian, secara garis besar senyawa antikanker bekerja dengan dua macam cara. Pertama adalah penghambatan fungsi DNA. DNA dihambat untuk menjalankan fungsinya seperti

replikasi dan transkripsi. Penghambatan kedua dengan jalan menghambat sintesis protein (Karnofsky 2008). Semua mekanisme tersebut secara umum akan menghentikan atau menghambat pertumbuhan sel kanker, sehingga mekanisme apoptosis dapat berlangsung dengan normal (Tokimoto & Calvo 2008).

Pengujian antimikroba secara *in vitro* dapat dilakukan dengan berbagai macam pendekatan. Dalam penelitian ini, pengujian antimikroba diawali dengan penapisan senyawa metabolit sekunder dari isolat-isolat actinomycetes terhadap bakteri Gram positif, Gram negatif, dan fungi. Metabolit paling aktif yang diperoleh diuji lanjut dengan perhitungan *Minimum Inhibitor Concentration* (MIC), analisis kebocoran sel, dan observasi sel mikroba uji dengan mikroskop elektron.

Pengujian antikanker dalam penelitian ini dilakukan secara *in vitro*. Senyawa yang memiliki aktivitas antikanker dapat dideteksi dengan adanya penghambatan terhadap pertumbuhan sel kanker. Tingkat kompetensi metabolit sebagai kandidat obat kanker dapat teramati dengan nilai toksisitas yang tinggi terhadap sel kanker namun rendah terhadap sel normal. Berdasarkan McEarchern *et al.* (2011), antikanker diuji dengan nilai konsentrasi hambat 50 % (IC_{50}) terhadap berbagai macam sel kanker.

Tujuan penelitian adalah memperoleh isolat-isolat actinomycetes penghasil antimikroba dan antikanker dari sampel tanah dan serasah dan mendapatkan senyawa aktif yang memiliki aktivitas antimikroba dan antikanker dari Raja Ampat, Papua. Hasil penelitian ini merupakan sumber informasi pertama mengenai potensi actinomycetes di Raja Ampat sebagai penghasil antimikroba dan antikanker.

BAHAN DAN CARA KERJA

BAHAN

1. Mikroorganisme

Sebanyak 100 isolat actinomycetes yang berasal dari tanah dan serasah di Raja Ampat (Lampiran 1, 102) digunakan untuk penapisan senyawa antimikroba. Actinomycetes yang digunakan diisolasi pada tahun 2008 dan dideposit di *LIPI microbial collection* (LIPIMC) Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong, Jawa Barat.

2. Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian berupa medium produksi dan medium pengujian. Medium *Yeast Starch Agar* (YSA) digunakan untuk menumbuhkan actinomycetes. Medium *Actino No. 1* (Difco) untuk kultivasi dan produksi senyawa aktif dari actinomycetes. Medium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Sigma) dan medium *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (Sigma) digunakan untuk menumbuhkan sel *line*. *Fetal bovine serum* (FBS) (Gibco) digunakan untuk memacu pertumbuhan sel *line*. Medium Mueller Hinton (Difco) dan Sabouraud (Difco) digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri dan antifungi.

3. Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian tersebut adalah etil asetat, metanol, diklorometan, aseton, silika kromatografi lapis tipis (KLT), silika gel (Merck, 60-120 mesh), *Dimethyl sulfoxide* (DMSO), *tryphan blue*, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT), dan bahan-bahan untuk *Scanning Electro Microscope* (SEM) yaitu : glutaraldehid, buffer *cocodilate*, *tanin acid*, etanol, *osmium tetroxide*, dan ion emas. Bahan analisis LCMS dan HPLC berupa asetonitril, metanol, diklorometan, kloroform, heksan, *aquabidest*, dan etil asetat.

CARA KERJA

1. Peremajaan dan persiapan kultivasi isolat-isolat actinomycetes

Isolat-isolat actinomycetes yang telah dipreservasi menggunakan 10 % (v/v) gliserol pada freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ di-*thawing* pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit. Selanjutnya ditumbuhkan ke dalam medium *Yeast Starch Agar* (YSA). Sebanyak satu ose isolat actinomycetes dari medium YSA yang telah berumur 7 hari dipindahkan ke dalam 100 ml medium cair pada labu Erlenmeyer 250 ml. Medium cair yang digunakan adalah *Actino-Medium No.1* (5 g/l pepton, 3 g/l ekstrak khamir) dengan pH 7,2. Inkubasi biakan dilakukan selama 7 hari (Cui *et al.*, 2006). Inkubasi dilakukan pada suhu $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ di dalam inkubator *shaker* dengan kecepatan 120 rpm (Hayakawa *et al.* 2004).

2. Ekstraksi senyawa aktif dari fermentasi actinomycetes

Fermentasi dan ekstraksi metabolit actinomycetes mengikuti metode Saha *et al.* (2010) dengan beberapa modifikasi. Actinomycetes yang telah difermentasi selama 7 hari, diekstraksi dengan campuran etil asetat dan metanol (4 : 1). Pemanenan dilakukan terhadap seluruh sel dan medium setelah inkubasi. Lapisan etil asetat-metanol selanjutnya dipisahkan dan kemudian dikeringkan dengan *rotary evaporator* pada suhu $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sedangkan lapisan air dikeringkan dengan *freeze dryer*. Ekstrak yang diperoleh dianalisis dengan teknik KLT gel silika GF₂₅₄ (Merck) dengan larutan pengembang diklorometan : metanol (10 :1). Kromatogram hasil proses kromatografi lapis tipis (KLT) kemudian dimonitor dengan pemaparan sinar ultra violet (UV) pada panjang gelombang 254 nm dan pereaksi penampak noda 1 % CeSO₄ dalam 10 % H₂SO₄ pekat.

Ekstrak yang diperoleh dalam bentuk serbuk kemudian dimasukkan dalam botol kaca gelap tahan asam dan disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sebelum digunakan untuk penapisan aktivitas antimikroba. Ekstrak dilarutkan kembali dengan menggunakan DMSO 1 % untuk ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi menggunakan pelarut organik etil asetat : metanol. Ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi menggunakan pelarut air dilarutkan dalam aquades steril.

Konsentrasi ekstrak diseragamkan menjadi 1.000 µg/ml dengan tujuan mempermudah perbandingan aktivitas antimikroba dan seleksi ekstrak paling aktif.

3. Penapisan aktivitas antimikroba

Mikroorganisme uji yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antimikroba dari metabolit yang dihasilkan berupa bakteri dan khamir. Sebagian besar mikroorganisme uji merupakan mikroba standar yang direkomendasikan oleh Food and Drug Administration (FDA). Mikroorganisme uji untuk bakteri adalah *Escherichia coli* LIPIMC186, *Bacillus subtilis* LIPIMC187, *Staphylococcus aureus* LIPIMC114, dan *Micrococcus luteus* LIPIMC76. Khamir uji yang digunakan adalah *Candida albicans* LIPIMC382 dan *Saccharomyces cerevisiae* LIPIMC70.

Penapisan dilakukan dengan metode difusi agar menurut metode Rahman *et al.* (2005) dan Schwalbe *et al.* (2007). Sebanyak 1 ml suspensi mikroba uji dengan konsentrasi $1 - 5 \times 10^6$ sel/ml ditambahkan ke dalam 4 ml medium agar dalam tabung reaksi. Suspensi sel tersebut kemudian dituangkan ke atas medium agar dalam cawan petri. Medium untuk bakteri menggunakan Mueller Hinton dan untuk khamir menggunakan Sabouraud. Tahap selanjutnya adalah meletakkan *paper disc* steril yang dicelupkan dalam larutan ekstrak produk dari actinomycetes dengan konsentrasi yang sama (1.000 µg/ml) pada medium agar Mueller Hinton dan Sabouraud yang telah diinokulasi mikroba uji. Percobaan dilakukan dengan dua kali ulangan. Kemampuan antimikroba dapat diamati dengan terbentuknya zona bening di sekitar *paper disc*. Diameter rata-rata zona bening yang terbentuk di sekitar *paper disc* diukur. Pengukuran diameter zona bening untuk tiap ulangan dilakukan dua kali secara vertikal dan horizontal. Tabel pengukuran aktivitas antimikroba merupakan nilai rata-rata diameter zona bening dari dua kali ulangan dan dua kali pengukuran dalam satuan milimeter (mm).

Tiap isolat akan menghasilkan dua kelompok ekstrak berdasarkan jenis pelarut yang digunakan, yaitu pelarut organik dan pelarut air. Ekstrak aktif adalah ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba uji dengan terbentuknya

zona bening di sekitar *paper disc*. Data yang diperoleh berupa jumlah ekstrak aktif terhadap mikroba uji, yang dapat dikelompokkan menjadi dua berdasarkan jenis pelarutnya. Total isolat aktif juga dapat dihitung tanpa melihat jenis pelarut yang digunakan. Data diameter zona bening digunakan untuk seleksi isolat terbaik dalam menghambat pertumbuhan mikroba. Persentase aktivitas antimikroba atau isolat aktif terhadap tiap mikroba uji dihitung dengan rumus :

$$\text{Isolat aktif (\%)} = \frac{\text{Jumlah isolat aktif}}{\text{Jumlah isolat yang digunakan dalam penapisan}} \times 100 \%$$

Actinomycetes yang mampu memproduksi metabolit dengan aktivitas antimikroba tertinggi dipilih dan digunakan untuk studi lanjut. Studi tersebut adalah isolasi dan purifikasi senyawa aktif, penentuan *Minimum Inhibitor Concentration* (MIC), analisis kebocoran sel mikroorganisme, dan uji sitotoksik terhadap sel kanker (*cell lines*). Tahapan analisis dijelaskan secara detail pada poin berikutnya.

4. Scaling-up produksi biomassa untuk purifikasi senyawa bioaktif

Satu isolat actinomycetes terseleksi, yang menghasilkan ekstrak dengan aktivitas antimikroba tertinggi, ditumbuhkan dalam volume medium yang lebih besar. Sebanyak 1 % starter inokulum yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28 °C diinokulasikan ke dalam 5 liter medium produksi (*Actino-Medium No.1*) secara aseptis. Tahap selanjutnya adalah dilakukan inkubasi pada suhu 28 °C dengan pengocokan pada 120 rpm selama 7 hari (Hayakawa *et al.* 2004). Setelah inkubasi, tahap selanjutnya adalah ekstraksi senyawa dengan metode seperti yang telah dijelaskan sebelumnya.

5. Purifikasi senyawa bioaktif

Purifikasi menggunakan teknik separasi kolom silica dan Sephadex® LH-20 yang dielusi dengan metanol. Kemurnian hasil purifikasi dilihat menggunakan KLT dan HPLC. HPLC menggunakan Shimadzu (Japan) seri RF-10AXL dengan pelarut metanol : air (8 : 2). Kolom yang digunakan adalah Ascentis® C18

(Supelco, USA) 5 μm 4,6 x 150 mm. Kecepatan alir yang digunakan 1 ml/menit dan tekanan kolom 1350 psi dengan panjang gelombang 254 nm. Deteksi berat molekul senyawa murni dilakukan dengan menggunakan LC-MS (Hitachi, Japan seri L 6200) dengan pelarut metanol : air (8 : 2). Kolom yang digunakan adalah RP 18 (Supelco, USA) 5 μm 2 x 150 mm. Kecepatan alir yang digunakan 1 ml/menit dan tekanan kolom 1350 psi dengan panjang gelombang 254 nm (Cheng *et al.* 2009).

6. Penentuan nilai *Minimum Inhibitor Concentration* (MIC)

Penentuan nilai MIC dilakukan pada metabolit produk dari actinomycetes yang memiliki aktivitas antimikroba tertinggi dan telah dipurifikasi. Penentuan MIC dilakukan terhadap mikroorganisme uji, yaitu bakteri, khamir, dan kapang. Mikroorganisme tersebut di tumbuhkan pada suhu 37 °C dalam medium cair (Mueller Hinton untuk bakteri, Sabouraud untuk khamir dan kapang). Konsentrasi bakteri dan khamir uji yang digunakan adalah 1 – 5 x 10⁶ CFU/ ml, yang dicapai pada inkubasi 12 – 18 jam. Kapang yang digunakan di kultivasi 18-24 jam supaya mencapai konsentrasi setara dengan 1 – 5 x10⁶ CFU/ ml atau 0,5 McFarland (Khan *et al.* 2006).

Penentuan nilai MIC pada penelitian ini menggunakan metode mikrodilusi cair (Rahman *et al.* 2005; Schwalbe *et al.* 2007). Sebanyak 100 μl medium dengan penambahan metabolit dimasukkan dalam *microplate* 96 sumuran dengan variasi konsentrasi. Sebanyak 100 μl suspensi mikroba uji ditambahkan ke dalam sumuran yang telah berisi medium, sehingga diperoleh volume akhir 200 μl untuk tiap sumuran. Penelitian menggunakan 8 serial konsentrasi metabolit (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, dan 128 $\mu\text{g/ml}$) dengan 3 kali ulangan. Pertumbuhan mikroba uji pada tiap sumuran dalam *microplate* diamati. Jika pada rentang konsentrasi tersebut tidak terdapat pertumbuhan mikroba uji karena pengaruh metabolit, maka penghitungan dilakukan kembali dengan penurunan serial konsentrasi. Nilai MIC ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan mikroba uji pada konsentrasi tertentu dari metabolit yang digunakan.

Penelitian ini menggunakan kontrol negatif (tanpa penambahan metabolit) dan kontrol positif (antimikroba komersial). Antimikroba komersial yang digunakan adalah kloramfenikol (Phyto technology), eritromisin (Sigma), kabisidin (Nacalai Tesque), dan nistatin (Applichem). Kloramfenikol dan eritromisin merupakan antibakteri, sedangkan kabisidin dan nistatin merupakan antifungi. Konsentrasi yang digunakan antara 0,015 – 128 µg/ml dengan interval dua kali konsentrasi awal (0,015, 0,03, 0,06, 0,12 dan seterusnya sampai 128 µg/ml).

7. Analisis Kebocoran sel mikroorganisme uji

Uji kebocoran sel mikroorganisme dideteksi dengan adanya protein, asam nukleat, dan urasil pada medium atau buffer cair yang digunakan (Fortunati & Bianchi 1989). Kandungan protein, asam nukleat, dan urasil dalam buffer untuk selanjutnya akan disebut sebagai kebocoran protein, kebocoran asam nukleat, dan kebocoran urasil. Kebocoran sel juga dideteksi dengan pengamatan perubahan morfologi sel menggunakan SEM (Bergmans *et al.* 2005).

Tahap awal yang dilakukan dalam uji kebocoran sel adalah preparasi mikroorganisme uji. Preparasi sel mengikuti metode Fortunati dan Bianchi (1989) serta Miksusanti *et al.* (2008). Mikroorganisme uji ditumbuhkan selama 24 jam suhu 37 °C pada inkubator *shaker*. Medium yang digunakan adalah Mueller Hinton untuk bakteri dan Sabouraud untuk kapang dan khamir. Sebanyak 10 ml suspensi sel yang ditambahkan 0,5 ml *tween 80* dengan konsentrasi 0.1 % disentrifugasi dingin dengan kecepatan 3.500 rpm selama 20 menit. Filtrat dibuang kemudian pelet dalam tabung dicuci dengan buffer fosfat pH 7,0 sebanyak dua kali. Larutan buffer fosfat dan sel mikroorganisme ditambah dengan metabolit murni dengan konsentrasi 1 MIC, 2 MIC, kontrol (tanpa penambahan ekstrak), dan antimikroba komersial (kloramfenikol untuk bakteri dan nistatin untuk fungi). Sampel kemudian diinkubasi dalam inkubator *shaker* selama 24 jam pada suhu 37 °C. Suspensi disentrifugasi 3.500 rpm selama 15 menit, lalu dipisahkan supernatan dan pelet. Selanjutnya dilakukan analisis kebocoran protein, asam nukleat, dan urasil dari supernatan yang diperoleh.

Kebocoran protein dan asam nukleat dianalisis dengan mengukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV/VIS (Shimadzu, BioSpec-1601, Japan) pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (Miksusanti *et al.* 2008). Konsentrasi asam nukleat dan protein (dalam satuan $\mu\text{g/ml}$) diperoleh secara otomatis dari spektrofotometer yang digunakan. Kebocoran urasil dideteksi dengan menggunakan HPLC (Shimadzu, Japan) seri RF-10AXL dengan pelarut acetonitril : air (1 : 9). Kolom yang digunakan adalah Ascentis[®] C18 (Supelco, USA) $5\ \mu\text{m}$ $4,6 \times 150\ \text{mm}$. Kecepatan alir yang digunakan $0,6\ \text{ml/menit}$, volume injeksi $20\ \mu\text{l}$, dan tekanan kolom $1350\ \text{psi}$ dengan panjang gelombang $254\ \text{nm}$.

Observasi morfologi ultrastruktur sel dilakukan dengan menggunakan SEM (JOEL seri JSM-5310LV) di Laboratorium SEM Pusat Penelitian Biologi LIPI. Preparasi SEM mengikuti metode Kai *et al.* (1999). Pelet sel yang diperoleh direndam dalam 2,5 % glutaraldehida selama 2 jam. Sel dicuci dengan buffer *cocodilate* setelah perendaman. Tahap selanjutnya sel direndam kembali dalam larutan *Osmium tetroxide* selama 4 jam. Pelet sel dicuci dengan buffer *cocodilate* kemudian direndam kembali dengan *Tanin Acid* selama 12 jam. Proses berikutnya dilakukan hidrasi bertingkat dengan etanol, mulai dari 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, dan 99 % selama masing-masing 5 – 10. Sentrifugasi dengan kecepatan $3.500\ \text{rpm}$ selama 10 menit merupakan tahap yang dilakukan setelah hidrasi. Pelet sel hasil sentrifugasi dilarutkan dalam *tert-butanol* dan dibuat preparat pada *slip glass*. Sel yang sudah diletakkan dalam *slip glass* di *coating* emas dengan proses vakum ($6 - 7\ \text{Pa}$) selama 20 menit. Tahap akhir adalah visualisasi hasil dengan menggunakan SEM.

Adanya kebocoran protein dan asam nukleat ditunjukkan dengan *Optical Density* (OD) yang tinggi saat pengukuran (Miksusanti *et al.* 2008). Kebocoran urasil ditunjukkan dengan adanya spektrum urasil dengan menggunakan standar urasil (Sigma) pada analisis HPLC. Tingkat kebocoran asam nukleat, protein, dan urasil berbanding lurus dengan tingkat kerusakan sel (Fortunati & Bianchi 1989; Miksusanti *et al.* 2008). Pengamatan morfologi dengan menggunakan SEM dapat menggambarkan kerusakan sel karena perlakuan senyawa bioaktif yang diberikan.

Kerusakan ini dapat berupa lubang pada dinding sel atau bentuk sel yang berubah dibanding kontrol (Bergmans *et al.* 2005).

8. Uji efek sitotoksik

Uji sitotoksik dilakukan terhadap enam *cell lines*. Sel yang digunakan yaitu MCMB-2 (sel kanker payudara yang berasal dari anjing), Leukimia (sel kanker darah yang diisolasi dari manusia), T47 D (sel kanker payudara yang diisolasi dari manusia), A549 (sel kanker paru-paru yang diisolasi dari manusia), Hela (sel kanker servik yang diisolasi dari manusia), dan Vero (sel normal yang diisolasi dari ginjal kera). Sel kanker dalam medium tumbuh DMEM dan RPMI pada konsentrasi 10^6 sel/ml (Patel *et al.* 2009) dikultur pada *microtiter plate* dengan 24 sumuran. Setiap sumuran berisi 700 μ l DMEM atau RPMI, 50 μ l antibiotik, 100 μ l FBS, 100 μ l sel *line* dan 50-100 μ l ekstrak uji yang dilarutkan pada DMSO dengan berbagai konsentrasi. Sebagai kontrol positif antikanker digunakan doksorubisin (Sigma), sedangkan sebagai kontrol negatif digunakan DMSO. Suspensi sel selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam pada kondisi 5 % CO₂. Setelah inkubasi, medium dibuang dan sel yang menempel pada dasar *microplate* dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS). Setelah PBS dibuang, sel ditambahkan dengan 10 μ l tripsin-EDTA 0,25 % kemudian ditambahkan PBS sampai volume 1 ml. Tahap selanjutnya, sebanyak 90 μ l suspensi sel dari setiap sumur (*well*) ditempatkan pada *microplate* dengan 96 sumur, kemudian sebanyak 10 μ l *trypan blue* ditambahkan pada sumur yang telah berisi suspensi sel dan dihomogenkan. Sebanyak 20 μ l dari suspensi tersebut dipipet dan ditempatkan pada hemositometer, kemudian jumlah sel hidup diamati dan dihitung di bawah mikroskop. Metode tersebut dikenal dengan istilah metode *trypan blue* (Yuan *et al.* 2000). Perlakuan penambahan ekstrak diberikan dengan 16 serial konsentrasi masing-masing 3 kali ulangan. Konsentrasi yang digunakan 0,125 – 8 μ g/ml dengan interval dua kali konsentrasi sebelumnya.

Analisis sitotoksik juga dilakukan menggunakan metode MTT. Metode yang digunakan mengacu pada Zhao *et al.* (2009) dan Xiaoxi (2011) dengan modifikasi. Semua *cell lines* ditumbuhkan pada medium yang sesuai (DMEM atau

RPMI dengan penambahan FBS dan antibiotik) selama kurang lebih 60 jam. Jumlah sel dihitung dengan menggunakan hemositometer untuk mendapatkan kepadatan sel tertentu. Sel yang telah ditumbuhkan dan dihitung, dimasukkan ke dalam *microplate* 96 sumur dengan volume 100 μ l dan jumlah sel 10^4 untuk tiap sumur. Setelah diinkubasi selama 24 jam, sel dicuci dengan PBS dan diberi perlakuan penambahan ekstrak. Perlakuan penambahan ekstrak diberikan dengan 16 serial konsentrasi masing-masing 3 kali ulangan. Konsentrasi 0,004 – 64 μ g/ml dengan interval dua kali konsentrasi sebelumnya. Percobaan dilakukan dengan penambahan kontrol sel (media kultur dan sel) dan kontrol media (media kultur). Untuk mengetahui efektivitas senyawa yang diperoleh, percobaan dilakukan dengan membandingkan terhadap doksorubisin sebagai anti kanker komersial. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C dan 5 % CO₂, ekstrak dibuang dan dicuci dua kali dengan PBS. Tahap selanjutnya adalah penambahan 100 μ l reagen MTT konsentrasi 0,5 mg/ml yang telah dilarutkan dalam medium kultur dan diinkubasi 4 jam. Penambahan reagen penghenti berupa SDS 10 % dalam larutan HCl 0,1 M, kemudian diinkubasi gelap selama 12 jam. Tahap akhir adalah penghitungan dengan menggunakan *Elisa reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Data yang dihasilkan berupa tabel konsentrasi metabolit murni dan besarnya persentase penghambatan pertumbuhan sel kanker lestari. Persentase penghambatan dengan menggunakan metode *trypan blue* dihitung dengan rumus :

$$P (\%) = \frac{(\sum KS) - (\sum PR)}{(\sum KS)} \times 100 \%$$

P (%) = persentase penghambatan

\sum KS = jumlah sel hidup pada kontrol sel/ kontrol negatif

\sum PR = jumlah sel hidup pada perlakuan

Persentase penghambatan dengan menggunakan metode MTT dihitung dengan rumus :

$$P (\%) = \frac{(KS - KM) - (PR - KM)}{(KS - KM)} \times 100 \%$$

P = persentase penghambatan KM = kontrol medium
KS = kontrol sel PR = perlakuan

Nilai persentase penghambatan dihitung tiap konsentrasi metabolit yang digunakan. Satu serial konsentrasi menghasilkan satu serial persentase penghambatan untuk tiap sel kanker. Konsentrasi metabolit tertentu yang mampu menghambat pertumbuhan 50 % sel *line* akan diperoleh dalam penelitian ini. Konsentrasi tersebut ditetapkan dalam notasi IC₅₀ (*Inhibitor Concentration 50 %*). Penghitungan nilai IC₅₀ dilakukan dengan menggunakan analisis probit pada Program SPSS dengan variabel konsentrasi metabolit uji dan persentase penghambatan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fermentasi Actinomycetes, Ekstraksi, dan Penapisan Aktivitas Antimikroba

Sebanyak dua jenis ekstrak telah diperoleh dari penelitian ini. Ekstrak tersebut yaitu ekstrak organik dan ekstrak air dengan rendemen yang bervariasi. Hasil penapisan ekstrak dapat dilihat pada Tabel I.2 dan Lampiran 1. Pengujian aktivitas antimikroba terhadap pelarut yang digunakan (DMSO 1 % dan akuades steril) juga dilakukan untuk menghindari bias yang mungkin timbul dari pelarut. Hasil menunjukkan bahwa pelarut yang digunakan tidak memiliki aktivitas antimikroba (Lampiran 2).

Aktivitas antimikroba actinomycetes asal Raja Ampat, Papua berbeda untuk tiap mikroba uji (Tabel I.2). Secara umum actinomycetes yang diisolasi dari sampel serasah lebih aktif dibandingkan dengan actinomycetes yang diisolasi dari

sampel tanah. Isolat actinomycetes lebih banyak menghambat *S. cerevisiae* dan *M. luteus*.

Tabel I.2. Aktivitas antimikroba dari 100 isolat actinomycetes asal Raja Ampat, Papua

Jumlah total isolat aktif (n, %) n = 100	Jumlah isolat aktif asal tanah (n, %) n = 37	Jumlah isolat aktif asal serasah (n, %) n = 63	Mikroorganisme yang dihambat
3 (3 %)	0 (0 %)	3 (4,8 %)	<i>E. coli</i>
31 (31 %)	11 (29,7 %)	20 (31,7 %)	<i>M. luteus</i>
19 (19 %)	8 (21,6 %)	11 (17,5 %)	<i>B. subtilis</i>
19 (19 %)	7 (18,9 %)	12 (19 %)	<i>S. aureus</i>
34 (34 %)	11 (29,7 %)	23 (36,5 %)	<i>S. cerevisiae</i>
4 (4 %)	2 (5,4 %)	2 (3,2 %)	<i>C. albicans</i>

Penelitian yang dilakukan menggunakan 37 isolat yang diisolasi dari tanah dan 63 isolat yang diisolasi dari serasah. Jumlah isolat dari sampel serasah lebih banyak karena pemilihan 100 isolat yang digunakan berdasarkan pengamatan morfotipe. Berdasarkan morfotipe, secara umum isolat yang dikoleksi dari sampel serasah Raja Ampat lebih bervariasi dibandingkan dengan isolat asal sampel tanah.

Distribusi penghambatan ekstrak yang bersumber dari isolat yang diisolasi dari tanah dan serasah terhadap mikroba uji tidak terlalu berbeda. Hal tersebut menunjukkan bahwa secara umum isolat aktif tidak terlalu dipengaruhi oleh sumber substrat asal actinomycetes tersebut diisolasi, khususnya tanah dan serasah. Walaupun dari jumlah isolat aktif tidak terlalu berbeda, aktivitas antimikroba dari isolat asal serasah lebih tinggi dibandingkan isolat asal tanah. Hal tersebut teramati dari rata-rata diameter zona bening dari isolat asal serasah yang lebih besar (Lampiran 1). Hal tersebut diduga dipengaruhi oleh kondisi substrat. Serasah diduga secara umum memiliki ruang dan nutrisi yang terbatas. Nutrisi yang terdapat dalam serasah diduga relatif lebih rendah dibandingkan dengan tanah. Proses dekomposisi pada tanah menyebabkan kandungan nutrisi lebih tersedia bagi pertumbuhan mikroba, termasuk actinomycetes. Kompetisi nutrisi pada substrat serasah diduga menyebabkan actinomycetes yang hidup

menghasilkan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba atau actinomycetes jenis lain.

Hasil penelitian pada Tabel I.2 menunjukkan bahwa ekstrak yang mampu menghambat *Escherichia coli* lebih sedikit dibandingkan ekstrak yang menghambat bakteri lain. Hal tersebut menunjukkan bahwa *E. coli* lebih tahan terhadap paparan senyawa antimikroba. Hal tersebut diduga karena perbedaan struktur dinding sel. Menurut Nikaido dan Varaa (1985) serta Plesiat dan Nukaido (1992), membran luar bakteri Gram negatif, termasuk *E. coli*, memiliki lipopolisakarida (LPS) dan murein lipoprotein. Adanya struktur ini membantu untuk mencegah masuknya senyawa antibakteri ke dalam sel (Nikaido 1998). LPS mengandung o-antigen, yang tersusun atas polisakarida dan lipid untuk memblokir masuknya senyawa antibakteri tertentu ke dalam sel (Vaara 1993).

Tabel I.2 menunjukkan bahwa ekstrak produksi actinomycetes memiliki aktivitas antifungi terhadap *S. cerevisiae* dan *C. albicans*. Aktivitas antifungi terhadap *S. cerevisiae* lebih tinggi (34 %) dibandingkan dengan *C. albicans* (4 %), walaupun keduanya sama-sama kelompok khamir. Hal tersebut menunjukkan bahwa *C. albicans* lebih tahan terhadap antifungi dibandingkan *S. cerevisiae*. *Candida albicans* lebih mampu bertahan dalam kondisi tekanan lingkungan yang tinggi (Magee *et al.* 1992; Janbon *et al.* 1998). Legrand *et al.* (2004) dan Selmecki *et al.* (2006) melaporkan bahwa *C. albicans* mampu me-restrukturisasi kromosomnya dengan cara menambah atau menghilangkan kromosom atau disebut dengan formasi isokromosom sehingga lebih tahan terhadap senyawa antifungi yang dipaparkan.

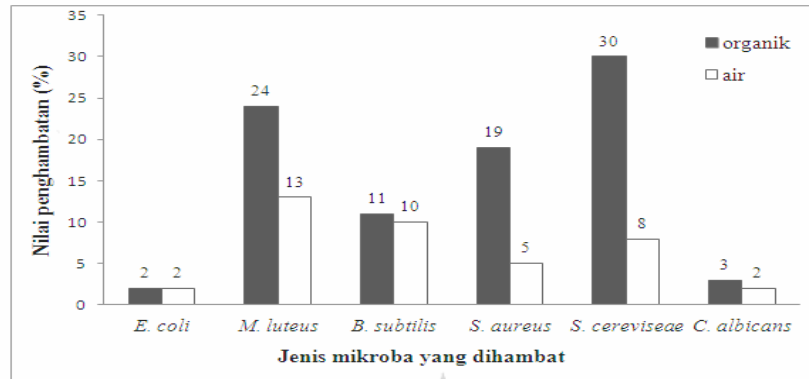
Candida albicans dapat mengaktivasi mekanisme NER (*nucleotide excision repair*) lebih baik dibandingkan *S. cerevisiae*, khusus pada respon terhadap antifungi. Jalur NER berperan dalam penghilangan beberapa nukleotida yang rusak oleh aktivitas senyawa antifungi (Tomkinson *et al.* 1993). Mekanisme NER memotong penuh nukleotida yang mengalami kerusakan dari sisi 5' dan 3'. Tahap selanjutnya adalah melakukan sintesis nukleotida baru dengan bantuan DNA polimerase delta dan epsilon dengan menambahkan DNA ligase pada nukleotida baru (Sun *et al.* 2003; Howlett & Schiestl 2004).

Candida albicans memiliki mekanisme BER (*base excision repair*) sebagai respon terhadap paparan senyawa antifungi yang juga lebih efektif dibandingkan dengan *S. cerevisiae*. Perbedaan BER dan NER terletak pada enzim yang berperan dan jumlah basa yang dihilangkan. Mekanisme BER bekerja dengan cara memutus dan menghilangkan basa yang mengalami kerusakan oleh aktivitas *reactive oxygen spesies* (ROS) (Memisoglu & Samson 2000). Jalur BER secara garis besar bekerja dengan memutus basa-basa nitrogen yang rusak dari DNA/RNA khamir, kemudian mensintesis basa-basa nitrogen tersebut dan menyambungkannya kembali pada urutan awal dari DNA/RNA. Proses tersebut melibatkan DNA polimerasi beta. Mekanisme BER hanya mengganti basa yang rusak, tanpa sintesis nukleotida baru (Torres-Ramos *et al.* 2000).

Metabolit yang diproduksi oleh actinomycetes yang memiliki aktivitas antimikroba lebih banyak terdapat pada pelarut organik. Ekstrak aktif pada pelarut organik sebanyak 63 %, sedangkan pada pelarut air hanya 20 % dan yang terdistribusi pada kedua jenis pelarut tersebut sebanyak 17 %.

Ekstrak organik menghasilkan 35 lima isolat yang memiliki aktivitas antimikroba. Hanya tiga isolat yang memiliki aktivitas antibakteri dan sepuluh isolat memiliki aktivitas antifungi. Sebanyak 22 isolat memiliki aktivitas antibakteri dan antifungi. Ekstrak organik lebih banyak memiliki aktivitas antifungi dibanding dengan antibakteri. Data menunjukkan bahwa secara umum ekstrak organik lebih banyak menghasilkan senyawa aktif antimikroba dengan diameter zona hambat yang rata-rata lebih besar dibandingkan dengan ekstrak air.

Ekstrak air menghasilkan tujuh belas isolat yang memiliki aktivitas antimikroba. Sebanyak tiga isolat memiliki aktivitas antifungi dan delapan isolat memiliki aktivitas antibakteri. Enam isolat memiliki dua aktivitas, yaitu antibakteri dan antifungi. Ekstrak air menghasilkan metabolit yang lebih banyak menghambat bakteri dibandingkan dengan fungi (Gambar I.2).



Gambar I.2. Persentase antimikroba dari isolat uji berdasarkan jenis pelarut yang digunakan

Hasil penapisan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak organik lebih aktif dibanding dengan ekstrak air (Gambar I.2). Eloff (1998) menyatakan bahwa senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba sebagian besar tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik. Senyawa aktif tersebut secara umum bersifat kompleks sehingga kelarutan dalam air rendah. Senyawa aktif yang larut dalam air jumlahnya sedikit atau terbatas. Cowan (1999) menyatakan beberapa kelompok senyawa aktif seperti fenol, terpenoid, alkaloid, lektin, polipeptida, poliasetilen tidak larut dalam air tetapi larut dalam pelarut organik, hanya sebagian kecil fenol dan polipeptida saja yang larut dalam pelarut polar atau air.

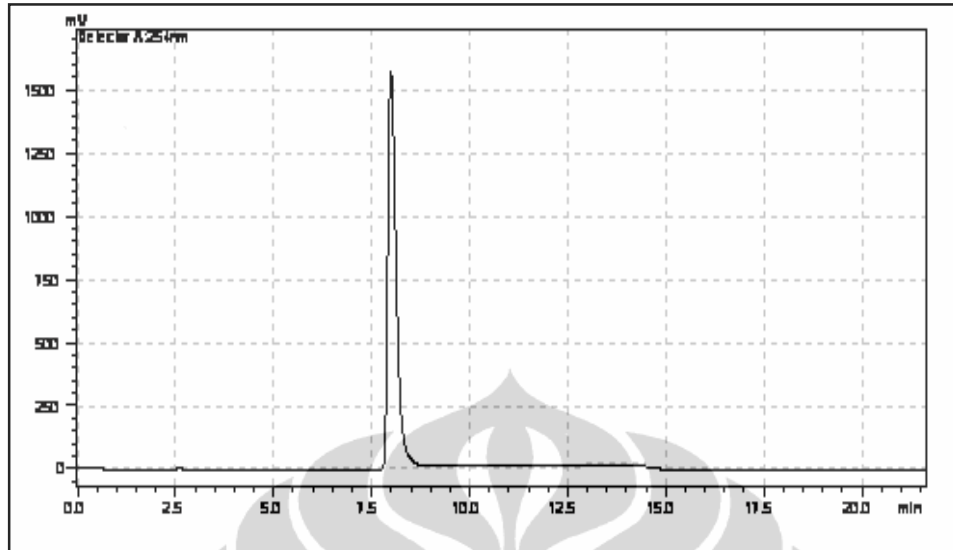
Scaling up biomassa, isolasi dan purifikasi senyawa aktif

Isolat yang menghasilkan aktivitas antimikroba tertinggi dipilih dan dikultur dengan skala yang lebih besar untuk mendapatkan senyawa bioaktif yang lebih banyak. Isolat terseleksi tersebut adalah BL-22-5. Setelah diinkubasi selama 7 hari seluruh medium beserta sel BL-22-5 diekstraksi dengan campuran pelarut etil asetat : metanol dan selanjutnya difraksinasi menggunakan kolom silika sehingga diperoleh 8 fraksi sederhana (F1 ~ F8) dengan fraksi utama pada F.5. Hasil menunjukkan senyawa pada F.5 yang telah dipurifikasi lebih lanjut dengan menerapkan teknik kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) diperoleh senyawa murni F.5.1. Kemurnian senyawa utama F.5.1 dikonfirmasi dengan melakukan

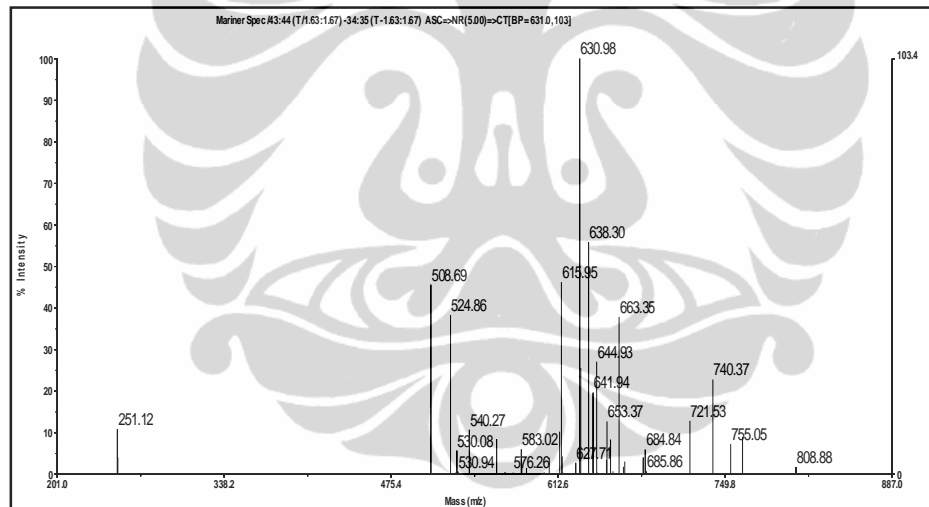
analisis HPLC dengan kondisi yang identik dengan kondisi pada saat proses pemisahan seperti terlihat pada Gambar I.3a.

Gambar I.3a menunjukkan bahwa senyawa utama F.5.1 memiliki kemurnian yang tinggi. Hal tersebut ditunjukkan hanya satu puncak tunggal pada analisis HPLC. Waktu retensi pada analisis HPLC terjadi sekitar 8 menit. Berat molekul senyawa murni telah diketahui dengan analisis LC-MS. Hasil analisis LC-MS menunjukkan bahwa senyawa utama pada F.5.1 memiliki berat molekul 808,88 seperti terlihat pada spektrum massa pada Gambar I.3b. Metabolit murni F.5.1 dapat dikelompokkan menjadi senyawa obat dengan berat molekul kecil. Berdasarkan data yang diperoleh dari *database* obat (www.drugbank.ca), senyawa antimikroba dapat dikelompokkan menjadi beberapa tipe melalui berat molekulnya, yaitu molekul kecil dan besar. Senyawa antimikroba dengan berat molekul lebih dari 1000 dapat dikelompokkan dalam tipe antimikroba molekul besar, dan jika berat molekul kurang dari 1000 dikelompokkan dalam antimikroba molekul kecil. Beberapa contoh antimikroba dengan berat molekul kecil adalah kinolon, beta laktam, aminoglikosida, dan azol.

Berdasarkan hasil analisis LC-MS dan warna senyawa murni F.5.1 produksi isolat BL-22-5 diduga masuk dalam kelompok antimikroba polien. Senyawa F.5.1 menunjukkan ciri yang sesuai dengan polien, dan warna kuning dengan berat molekul 808,88. Madigan *et al.* (2003) menyatakan bahwa senyawa poliene memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, yang menyerap sinar UV sehingga menghasilkan warna kuning sampai dengan merah. Baginski dan Czub (2009) menyatakan bahwa semakin merah warna senyawa disebabkan oleh semakin banyak ikatan rangkap senyawa tersebut. Antimikroba kelompok polien biasanya memiliki berat molekul sekitar 800 sampai 900.



Gambar I.3a. Kromatogram HPLC senyawa utama F.5.1 hasil purifikasi



Gambar I.3b. Spektrum massa senyawa utama F.5.1 hasil analisis LC-MS

Pengujian nilai MIC senyawa F.5.1 terhadap mikroba uji

Potensi aktivitas senyawa utama pada kultur actinomycetes BL-22-5 senyawa murni F.5.1. dapat diketahui dengan jalan menentukan nilai MIC dari senyawa tersebut terhadap beberapa jenis mikroba uji. Hasil pengujian nilai MIC senyawa utama F.5.1 terhadap beberapa jenis bakteri uji memperlihatkan nilai MIC yang berkisar berkisar 16--64 $\mu\text{g/ml}$ seperti terlihat pada Tabel I.3. Secara

umum, nilai MIC senyawa utama F.5.1 relatif lebih tinggi dibandingkan antibiotik komersial kloramfenikol dan eritromisin, kecuali terhadap bakteri *S. aureus*. Senyawa utama F.5.1 memiliki nilai MIC yang setara dengan kloramfenikol terhadap *S. cerevisiae*. Senyawa F.5.1 juga memiliki nilai MIC yang setara dengan antifungal komersial nistatin maupun kabisidin terhadap *Rhodotorula minuta*.

Tabel I.3. Nilai MIC senyawa murni F.5.1 produksi isolat terseleksi BL-22-5 terhadap mikroba uji

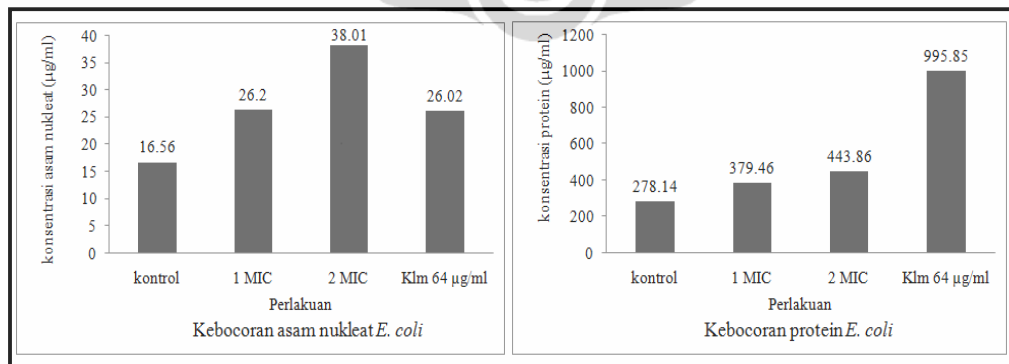
Mikroba Uji	Nilai MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	Senyawa murni F.5.1	Kloramfenikol	Eritromisin	Nistatin	Kabisidin
<i>E. coli</i>	64	16	32	-	-
<i>M. luteus</i>	64	16	16	-	-
<i>S. aureus</i>	16	16	0,06	-	-
<i>B. subtilis</i>	16	8	0,03	-	-
<i>C. albicans</i>	64	-	-	32	32
<i>S. cerevisiae</i>	64	-	-	64	64
<i>R. minuta</i>	64	-	-	64	64
<i>A. niger</i>	32	-	-	16	64
<i>A. flavus</i>	64	-	-	16	32

Penentuan MIC dilakukan untuk memperoleh konsentrasi terendah dari senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba. Nilai MIC menjadi acuan penting dalam penentuan potensi senyawa antimikroba. Standar tingkat sensitivitas mikroba uji terhadap paparan senyawa antimikroba relatif berbeda berdasarkan nilai MIC. Walaupun demikian, secara umum tingkat sensitivitas mikroba dapat dikelompokkan menjadi tiga berdasarkan European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2010). Mikroba bersifat sensitif, jika nilai MIC kurang dari 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Mikroba bersifat moderat atau intermediet jika nilai MIC berkisar 16--128 $\mu\text{g}/\text{ml}$, dan bersifat resisten jika nilai MIC lebih dari 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

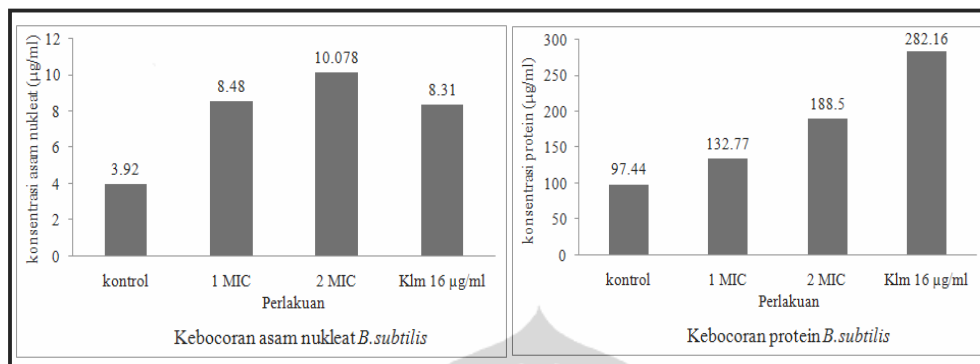
Dalam rangka eksplorasi kandidat obat baru, semakin rendah nilai MIC suatu senyawa aktif, menunjukkan senyawa tersebut semakin potensial sebagai bahan obat (Schwalbe *et al.* 2007). Walaupun demikian, senyawa aktif harus memiliki toksisitas rendah terhadap sel normal tubuh, jika pemanfaatannya sebagai obat pada manusia atau hewan. Hasil penelitian pada Tabel I.3 menunjukkan bahwa senyawa murni F.5.1 produksi isolat BL-22-5 aktif terhadap semua mikroba uji, namun dengan aktivitas yang relatif moderat atau intermediet. Walaupun demikian, senyawa F.5.1 dapat dipertimbangkan menjadi bahan obat karena bersifat spektrum luas dan tidak toksik terhadap sel normal berdasarkan uji *in vitro*. Data toksisitas senyawa F.5.1 terhadap sel normal seperti pada Tabel I.5.

Analisis kebocoran sel bakteri, khamir, dan fungi

Salah satu efek yang diakibatkan oleh pemaparan senyawa bioaktif terhadap mikroba adalah rusaknya integritas dinding sel. Menurut Giacometti *et al.* (2000) gangguan atau kerusakan dinding sel mikroba dideteksi melalui pengukuran metabolit seluler seperti asam nukleat dan protein. Kebocoran asam nukleat yang dideteksi dalam penelitian ini adalah kebocoran urasil. Metabolit tersebut berpindah dari sitosol ke dalam medium tumbuh yang digunakan, atau sering diistilahkan sebagai kebocoran metabolit seluler. Hasil pengukuran kebocoran asam nukleat dan protein dari mikroba uji ditunjukkan pada Gambar I.4 –I.8.



Gambar I.4. Tingkat kebocoran asam nukleat dan protein (dalam µg/ml) setelah perlakuan pada mikroba uji *E. coli*



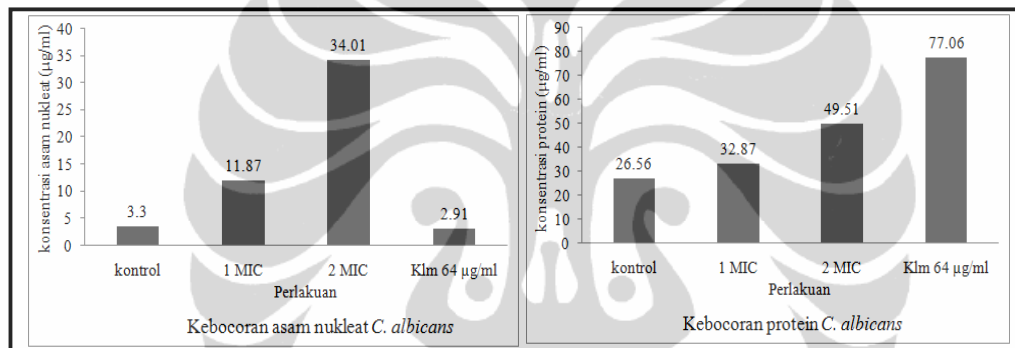
Gambar I.5. Tingkat kebocoran asam nukleat dan protein (dalam µg/ml) setelah perlakuan pada mikroba uji *B. subtilis*

Perlakuan pemberian senyawa F.5.1 dengan konsentrasi 1 MIC dan 2 MIC menyebabkan kebocoran asam nukleat dan protein mikroba uji *E. coli* (Gambar I.4). Perlakuan kloramfenikol 64 µg/ml juga menyebabkan kebocoran asam nukleat dan protein. Perlakuan 1 MIC, 2 MIC, dan kloramfenikol menghasilkan tingkat kebocoran lebih tinggi dibanding dengan kontrol. Kebocoran asam nukleat paling tinggi terjadi pada perlakuan 2 MIC, sedangkan kebocoran protein paling tinggi pada perlakuan pemberian kloramfenikol. Respon bakteri uji *B. subtilis* terhadap perlakuan 1 MIC, 2 MIC dan kloramfenikol 16 µg/ml menunjukkan pola yang sama dengan respon *E. coli* (Gambar I.4).

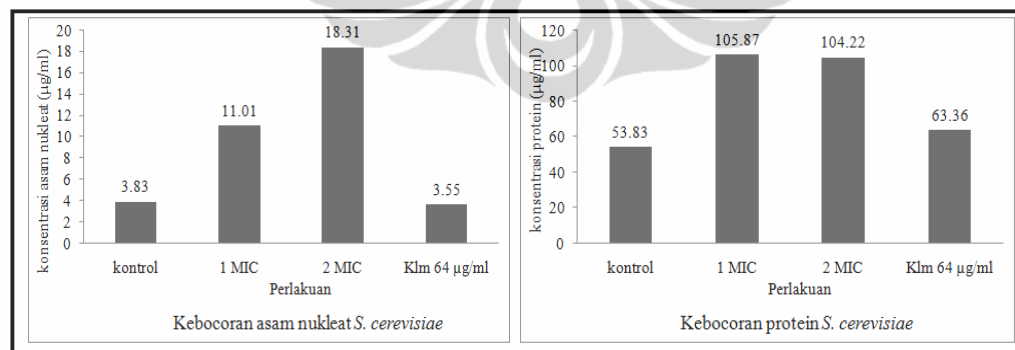
Kebocoran asam nukleat dan protein dari mikroba uji diduga melalui beberapa mekanisme. Senyawa uji menempel pada membran sel, dan mengakibatkan perubahan permeabilitas membran. Perubahan tersebut berupa berkurangnya selektivitas membran terhadap senyawa yang keluar atau masuk sel. Mekanisme lain yang mungkin terjadi adalah masuknya senyawa F.5.1 ke dalam sel kemudian menempel pada organel sehingga mengganggu metabolisme seluler pada *E. coli* dan *B. subtilis*. Menurut Giacometti *et al.* (2000), permeabilitas membran yang tidak berfungsi dengan baik dapat mengakibatkan kebocoran sel dan keluarnya komponen sel. Engelberg-Kulka *et al.* (2004) menyatakan bahwa proses transkripsi dan translasi dapat terhambat dengan cara interkalasi senyawa

aktif terhadap DNA/RNA. Kebocoran protein dan asam nukleat dapat terjadi melalui mekanisme interkalasi tersebut.

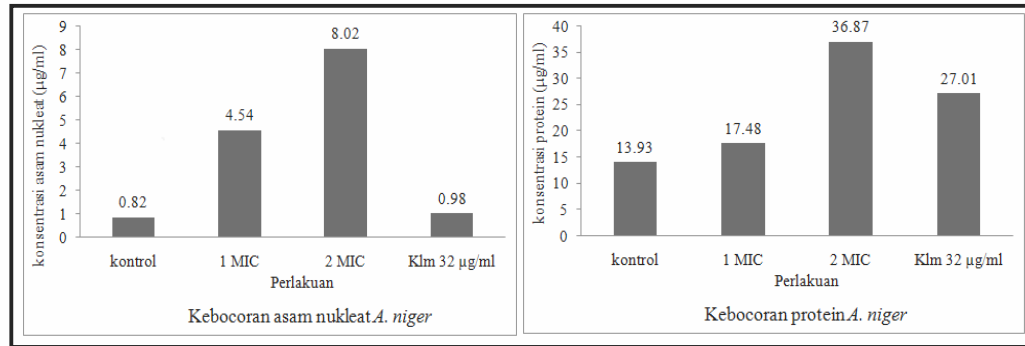
Kloramfenikol bekerja dengan cara menghambat sintesis dan pematangan protein. Kloramfenikol mencegah pemanjangan protein dengan menghambat enzim peptidil transferase pada ribosom bakteri (Jardetzky 1963; Wolfe & Hahn 1965). Penghambatan ini menyebabkan pembentukan protein membran juga terhambat, sehingga sel mengalami kebocoran. Protein yang belum matang akan dikeluarkan dari sel secara terus menerus sehingga sel bakteri mati. Tingginya konsentrasi protein yang terdeteksi dari Gambar I.4 dan I.5 dari perlakuan kloramfenikol disebabkan oleh mekanisme kerja kloramfenikol tersebut.



Gambar I.6. Tingkat kebocoran asam nukleat dan protein (dalam µg/ml) setelah perlakuan pada mikroba uji *C. albicans*



Gambar I.7. Tingkat kebocoran asam nukleat dan protein (dalam µg/ml) setelah perlakuan pada mikroba uji *S. cerevisiae*



Gambar I.8. Tingkat kebocoran asam nukleat dan protein (dalam µg/ml) setelah perlakuan pada mikroba uji *A. niger*

Kebocoran asam nukleat dan protein dari khamir *C. albicans*, *S. cerevisiae*, dan *A. niger* pada perlakuan 1 MIC dan 2 MIC terdeteksi lebih tinggi dibanding dengan kontrol (Gambar I.6 – I.8). Profil kebocoran asam nukleat dari ketiga spesies tersebut menunjukkan kemiripan. Gambar I.7 menunjukkan bahwa perlakuan 1 MIC dan 2 MIC menghasilkan tingkat kebocoran protein pada *S. cerevisiae* yang hampir sama. Hal tersebut sulit dijelaskan karena pada umumnya penambahan konsentrasi berkorelasi positif dengan tingkat kebocoran protein.

Senyawa F.5.1 diduga kelompok polien, berdasarkan analisis yang telah dijelaskan sebelumnya. Mekanisme kerja F.5.1 sebagai antifungi kemungkinan dengan menempel pada ergosterol. Menurut Baginski & Czub (2009), senyawa kelompok polien menempel pada ergosterol, yang merupakan komponen utama membran sel fungi. Polien dengan konsentrasi tertentu, akan membentuk lubang pada membran sel dan menyebabkan gangguan permeabilitas membran. Lubang yang terbentuk akan menyebabkan ion K^+ keluar sel. Keluarnya ion K^+ merupakan tahap awal sebelum material sel keluar dan selanjutnya menyebabkan kematian sel fungi.

Kebocoran asam nukleat dan protein juga terdeteksi pada kontrol dari semua perlakuan (Gambar I.4 – I.8) walaupun nilainya lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan. Hal tersebut kemungkinan disebabkan secara alami sel mengalami kematian setelah 24 jam inkubasi dan defisiensi nutrisi. Kematian

tersebut menyebabkan sel pecah dan mengeluarkan material intraseluler ke bufer cair, termasuk protein dan asam nukleat, sehingga terdeteksi pada pengukuran.

Secara umum, perlakuan pemberian senyawa F.5.1 terhadap mikroba uji memberikan pengaruh terhadap integritas dinding sel mikroba uji. Pengaruh tersebut terdeteksi dengan tingginya konsentrasi asam nukleat dan protein yang dilepaskan ke medium cair. Tingkat kebocoran asam nukleat dari mikroba uji meningkat pada perlakuan pemberian metabolit F.5.1 konsentrasi 1 MIC dan 2 MIC. Tingkat kebocoran tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol sel dan kontrol positif.

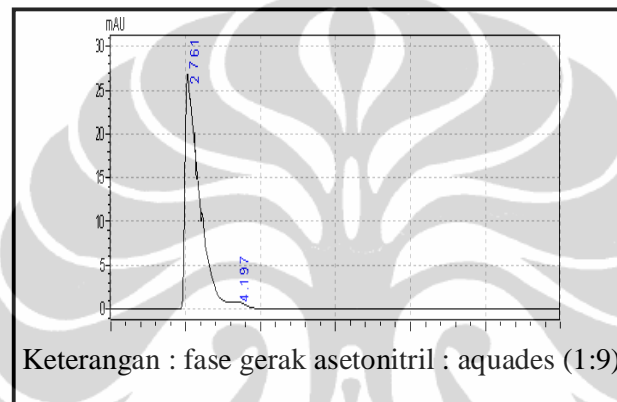
Gambar I.4 – I.8, menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi senyawa F.5.1 semakin tinggi konsentrasi kebocoran protein dan asam nukleat. Perlakuan 1 MIC dan 2 MIC menghasilkan tingkat kebocoran protein yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Walaupun demikian, nilai kebocoran protein pada kontrol antimikroba komersial kloramfenikol lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan metabolit murni F.5.1 dari isolat BL-22-5 konsentrasi 1 MIC dan 2 MIC (Gambar I.4 – I.6), kecuali pada *S. cerevisiae* dan *A. niger* (Gambar I.7 – I.8).

Analisis kebocoran urasil pada sel bakteri, khamir, dan kapang dengan analisis HPLC

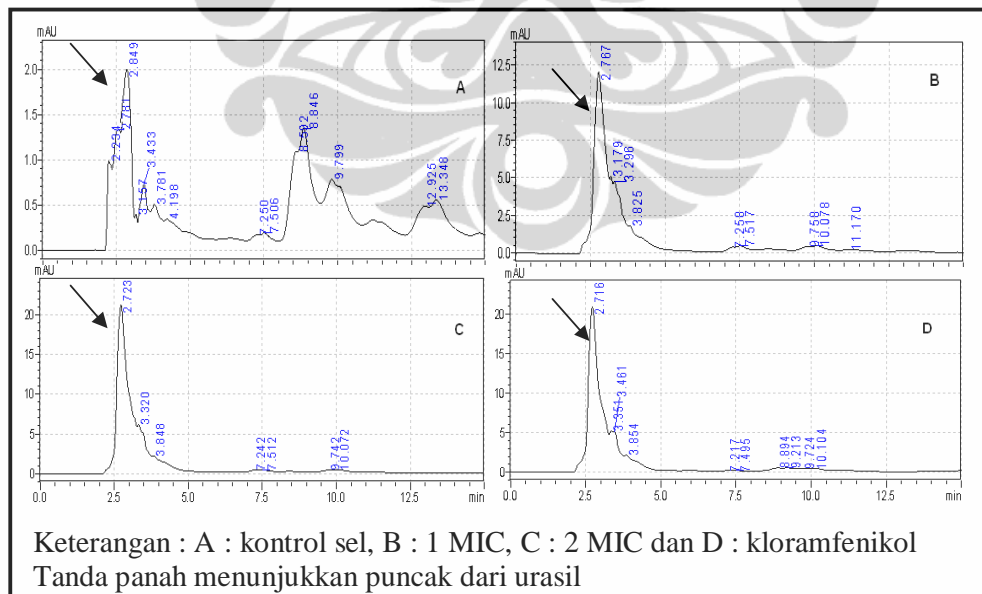
Deteksi kebocoran urasil dilakukan dengan menggunakan HPLC. Kurva standar pengukuran urasil digunakan dalam penelitian ini. Standar urasil yang digunakan seperti pada Gambar I.9. Persamaan regresi dari kurva standar digunakan untuk mengetahui konsentrasi urasil yang terdapat dalam medium. Variasi konsentrasi standar urasil untuk menentukan persamaan kurva regresi seperti pada Lampiran 3.

Analisis HPLC untuk mengetahui konsentrasi dari perlakuan terhadap tiap mikroba uji telah dilakukan. Berdasarkan standar yang digunakan, diketahui bahwa urasil berada pada waktu retensi 2,7 menit. Hasil kromatogram HPLC seperti pada Gambar I.10 – I.14.

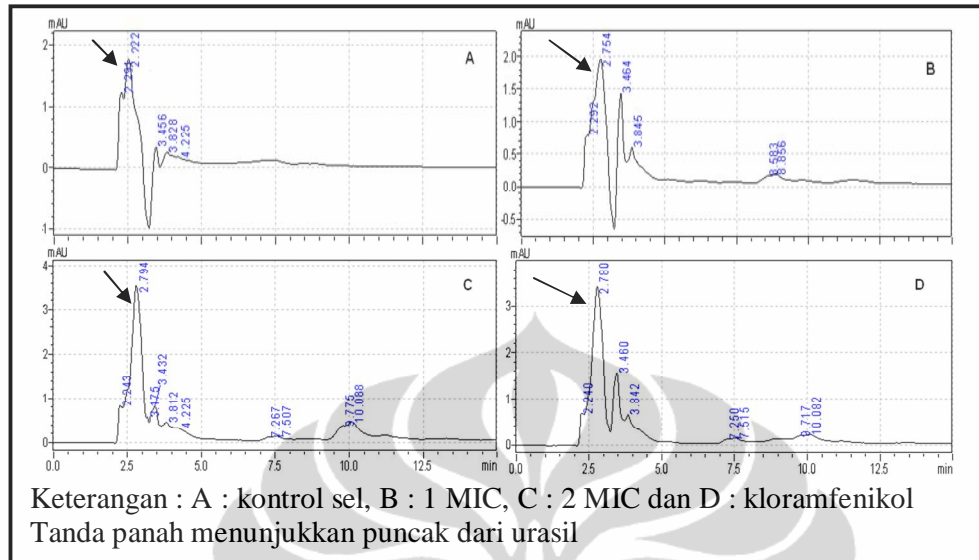
Gambar I.10 – I.14 merupakan kromatogram HPLC yang menunjukkan adanya kebocoran urasil. Tanda panah menunjukkan puncak yang dihasilkan dari urasil yang terdeteksi. Selain puncak urasil, terdeteksi juga puncak-puncak lain dalam kromatogram. Puncak tersebut merupakan komponen lain yang mungkin terdeteksi pada panjang gelombang yang sama dengan urasil. Secara umum pada Gambar I.10 – I.14 menunjukkan bahwa semua perlakuan mendeteksi adanya urasil, namun dengan konsentrasi yang berbeda-beda.



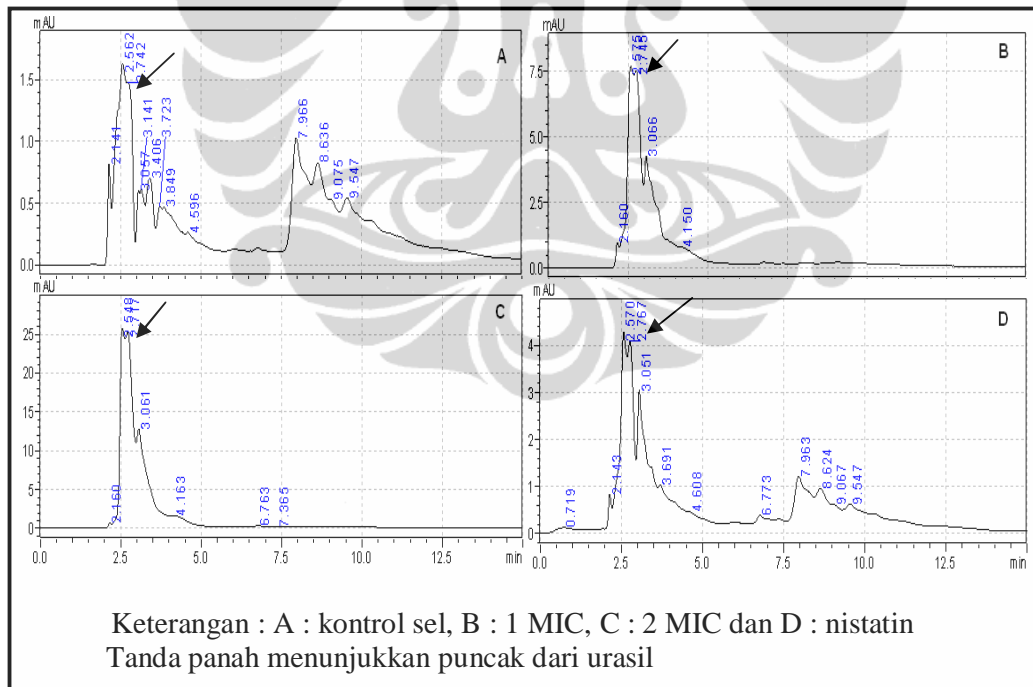
Gambar I.9. Kurva standar urasil konsentrasi 5 ppm pada analisis HPLC



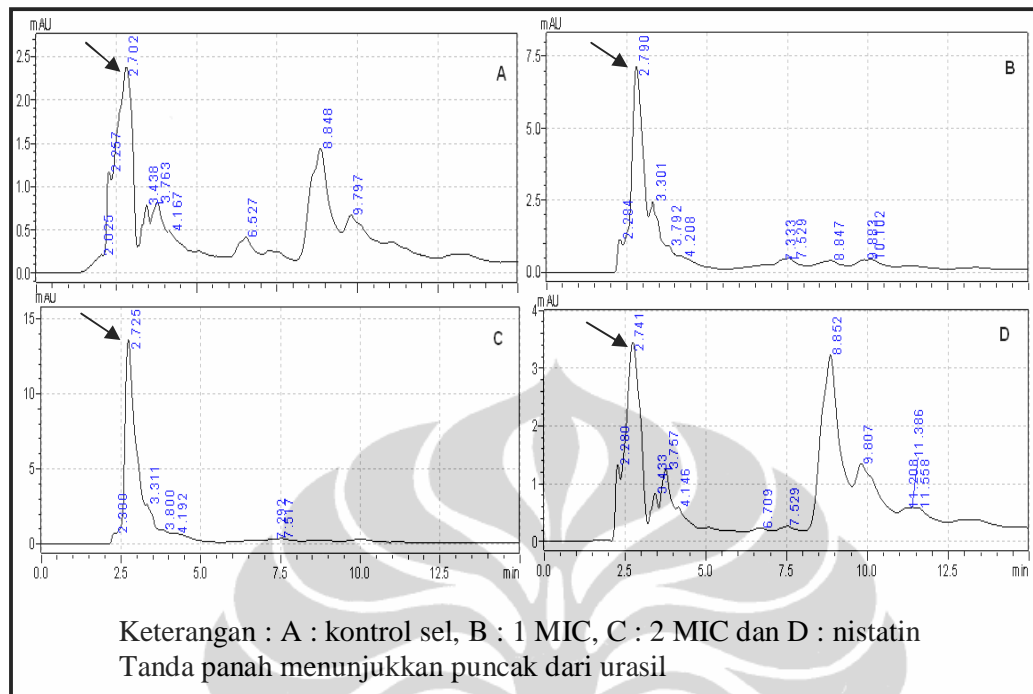
Gambar I.10. Analisis kebocoran urasil dengan HPLC pada *E. coli* setelah perlakuan



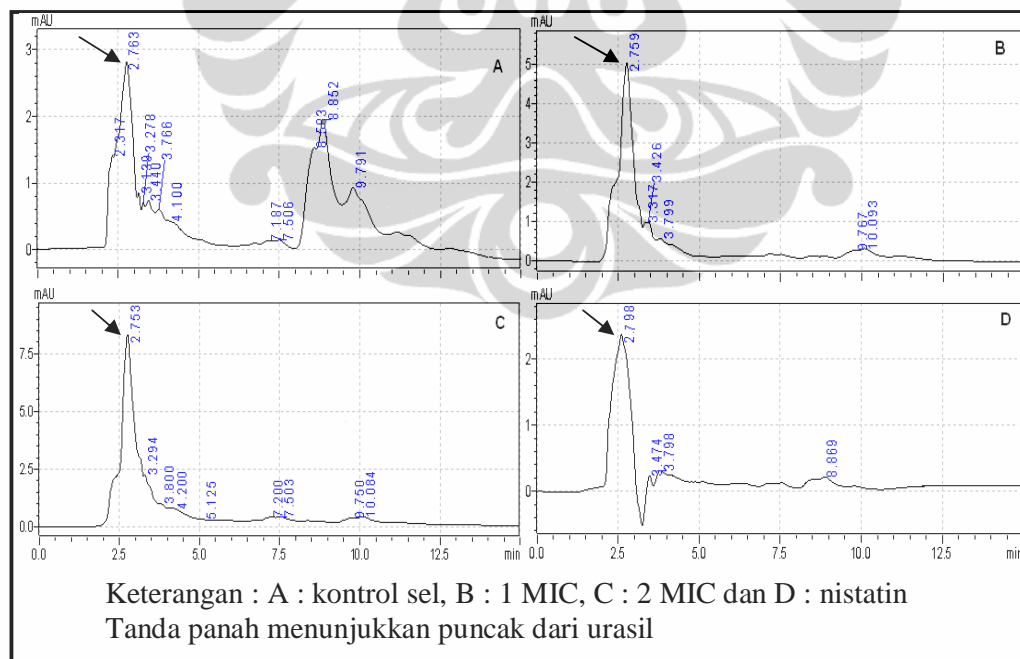
Gambar I.11. Analisis kebocoran urasil dengan HPLC pada *B. subtilis* setelah perlakuan



Gambar I.12. Analisis kebocoran urasil dengan HPLC pada *C. albicans* setelah perlakuan



Gambar I.13. Analisis kebocoran urasil dengan HPLC pada *S. cerevisiae* setelah perlakuan



Gambar I.14. Analisis kebocoran urasil dengan HPLC pada *A. niger* setelah perlakuan

Urasil merupakan komponen asam nukleat RNA. Walaupun deteksi asam nukleat total telah dilakukan, namun deteksi urasil juga dilakukan dalam penelitian ini. Pengukuran urasil dilakukan dengan tujuan untuk mendapat data yang lebih detail tentang tingkat kebocoran sel. Urasil merupakan bagian dari RNA yang tidak dijumpai pada DNA, sehingga tingkat kebocoran urasil dapat berkorelasi positif dengan tingkat penghambatan translasi. Senyawa F.5.1 diduga bekerja dengan mekanisme penghambatan proses translasi. Hal tersebut didukung dengan tingginya urasil yang bocor pada perlakuan 1 MIC dan 2 MIC. Menurut Engelberg-Kulka *et al.* (2004), mekanisme aktivitas antimikroba yang paling besar adalah pada penghambatan sintesis protein, gangguan transkripsi dan penghambatan translasi.

Perlakuan 1 MIC dan 2 MIC mendeteksi adanya kebocoran urasil pada mikroba uji (Gambar I.9 – I.14). Secara umum dapat diketahui bahwa kebocoran yang terjadi pada sel tidak hanya urasil, tetapi terdapat komponen lain dengan waktu retensi yang berbeda untuk tiap perlakuan. Walaupun demikian, jenis komponen lain tersebut tidak dapat diidentifikasi karena standar yang digunakan pada HPLC hanya urasil.

Berdasarkan hasil analisis HPLC dapat dihitung konsentrasi urasil yang bocor dari sel mikroba uji. Penghitungan konsentrasi urasil diperoleh dari persamaan kurva standar urasil. Kurva standar diperoleh dari variasi konsentrasi urasil dan luas area yang dihasilkan pada waktu retensi 2,7 menit. Konsentrasi urasil untuk tiap perlakuan dari mikroba uji seperti pada Tabel I.4.

Tabel I.4. menunjukkan bahwa semua perlakuan menghasilkan kebocoran urasil. Kebocoran tersebut terdeteksi dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Secara umum perlakuan 1 MIC dan 2 MIC menghasilkan kebocoran urasil yang lebih tinggi dibanding dengan kontrol sel. Kebocoran urasil pada kelompok khamir dan jamur dengan perlakuan 1 MIC dan 2 MIC lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol anti fungi nistatin.

Tabel I.4. Konsentrasi kebocoran urasil pada mikroba uji setelah perlakuan berdasarkan analisis HPLC

Mikroba uji	Perlakuan	Konsentrasi urasil (ppm)
<i>B. subtilis</i>	Kontrol sel	1,483 ± 0,006 ^d
	1 MIC	2,274 ± 0,009 ^c
	2 MIC	2,784 ± 0,100 ^b
	Kloramfenikol 16 µg/ml	3,152 ± 0,011 ^a
<i>E. coli</i>	Kontrol sel	0,092 ± 0,002 ^d
	1 MIC	8,169 ± 0,026 ^c
	2 MIC	17,784 ± 0,054 ^b
	Kloramfenikol 64 µg/ml	18,158 ± 0,055 ^a
<i>A. niger</i>	Kontrol sel	0,489 ± 0,107 ^c
	1 MIC	0,889 ± 0,092 ^b
	2 MIC	1,362 ± 0,075 ^a
	Nistatin 32 µg/ml	0,437 ± 0,109 ^c
<i>S. cerevisiae</i>	Kontrol sel	0,678 ± 0,100 ^d
	1 MIC	1,865 ± 0,056 ^b
	2 MIC	4,117 ± 0,027 ^a
	Nistatin 64 µg/ml	1,222 ± 0,080 ^c
<i>C. albicans</i>	Kontrol sel	0,373 ± 0,006 ^d
	1 MIC	1,121 ± 0,009 ^b
	2 MIC	3,678 ± 0,010 ^a
	Nistatin 64 µg/ml	0,538 ± 0,011 ^c

Keterangan : Angka yang diikuti dengan superskrip huruf yang sama pada kolom yang sama dalam satu kelompok mikroba uji menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata pada taraf uji 0,05.

Tingkat kebocoran urasil pada perlakuan 1 MIC dan 2 MIC lebih tinggi dibandingkan kontrol terhadap semua mikroba uji (Tabel I.4). Tingginya kebocoran urasil tersebut mengindikasikan telah terjadi kerusakan RNA. Dengan melihat hasil pengukuran kebocoran urasil, senyawa F.5.1 diduga menyebabkan gangguan pada proses translasi. Perlakuan pemberian kloramfenikol juga menghasilkan tingkat kebocoran urasil pada *E. coli* dan *B. subtilis* yang lebih tinggi dibanding kontrol, bahkan lebih tinggi dari perlakuan 1 MIC dan 2 MIC. Tingginya kebocoran urasil oleh perlakuan kloramfenikol diduga disebabkan oleh mekanisme kerja dari kloramfenikol itu sendiri. Mekanisme penghambatan

kloramfenikol telah dijelaskan sebelumnya dengan cara menempel pada ribosom dan mengganggu sintesis protein (Jardetzky 1963; Wolfe & Hahn 1965). Sintesis protein tersebut melibatkan proses translasi yang dikontrol oleh RNA.

Perlakuan nistatin menunjukkan profil yang berbeda dengan perlakuan kloramfenikol. Kebocoran urasil pada perlakuan nistatin lebih rendah dibanding perlakuan 1 MIC dan 2 MIC, bahkan pada *A. niger* kebocoran urasil lebih rendah dibandingkan kontrol. Hal tersebut juga diduga karena mekanisme kerja dari nistatin itu sendiri. Menurut Baginski dan Czub (2009), nistatin menempel pada ergosterol fungi dan menyebabkan gangguan fungsi membran dan dinding sel, sehingga menyebabkan kebocoran. Nistatin tidak secara spesifik mengganggu sintesis protein dan asam nukleat atau proses transkripsi dan translasi.

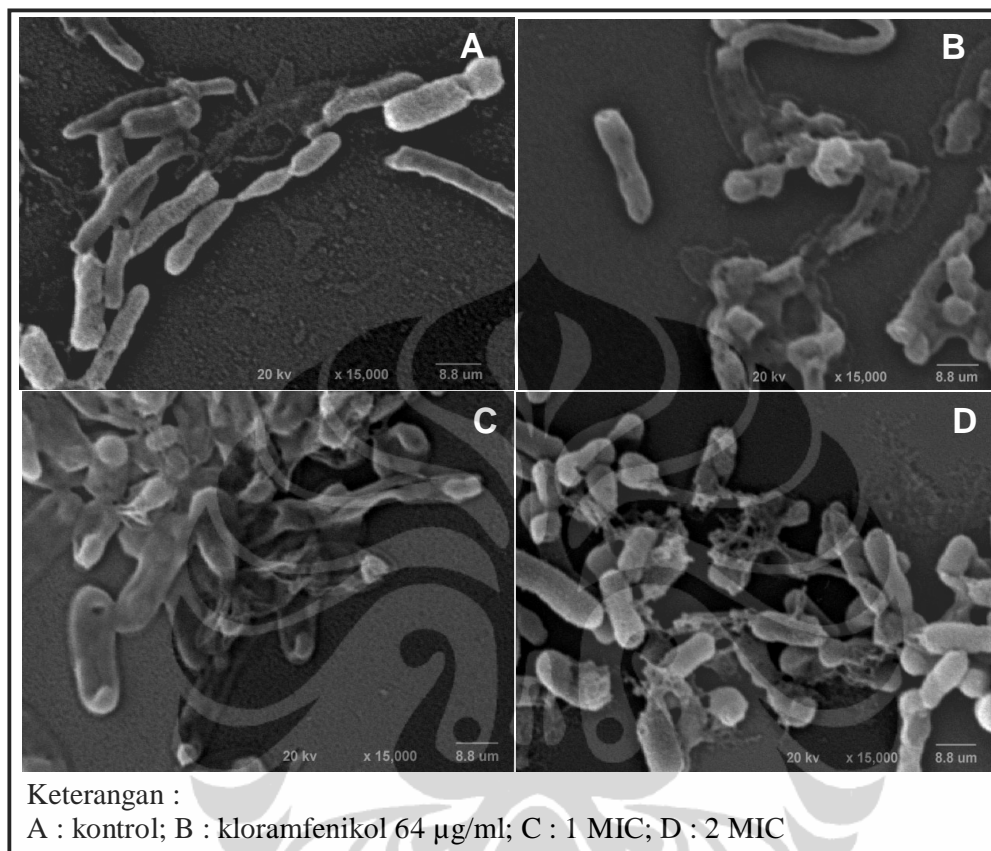
Tabel I.4 menunjukkan kebocoran urasil juga terdeteksi pada kontrol. Walaupun demikian, kebocoran urasil pada kontrol relatif rendah dibandingkan dengan perlakuan lain. Kebocoran ini diduga karena aktivitas normal dari kultur mikroba. Inkubasi selama 24 jam dan tanpa sumber nutrisi dapat menyebabkan sel mati secara alami. Kematian sel tersebut mengakibatkan keluarnya material intraseluler termasuk asam nukleat. Hal tersebut menyebabkan urasil, yang merupakan bagian dari asam nukleat, terdeteksi pada pengukuran.

Analisis perubahan morfologi sel pada Bakteri, khamir, dan kapang setelah perlakuan dengan senyawa F.5.1

Analisis perubahan morfologi sel pada bakteri Gram negatif

Perlakuan 1 MIC dan 2 MIC menunjukkan adanya perubahan bentuk sel (Gambar I.15C dan I.15D). Terdapat lubang besar di tiap sel dan sel sudah mengalami nekrosis yang ditandai dengan pecahnya beberapa sel. *E. coli* pada kontrol menunjukkan bentuk sel yang utuh. Perlakuan kontrol positif menggunakan kloramfenikol terlihat adanya perubahan yang signifikan, bentuk sel sudah tidak utuh lagi (Gambar I.15B). Sel menjadi keriput tidak beraturan dan mengalami kerusakan. Bentuk sel berubah menjadi lebih bulat dibandingkan

kontrol, yang memiliki bentuk sel normal (Gambar I.15A). Perubahan morfologi sel *E. coli* yang diamati terdapat pada Gambar I.15.



Gambar I.15. Morfologi *E. coli* setelah perlakuan dengan senyawa F.5.1 dan kloramfenikol dengan pengamatan menggunakan SEM

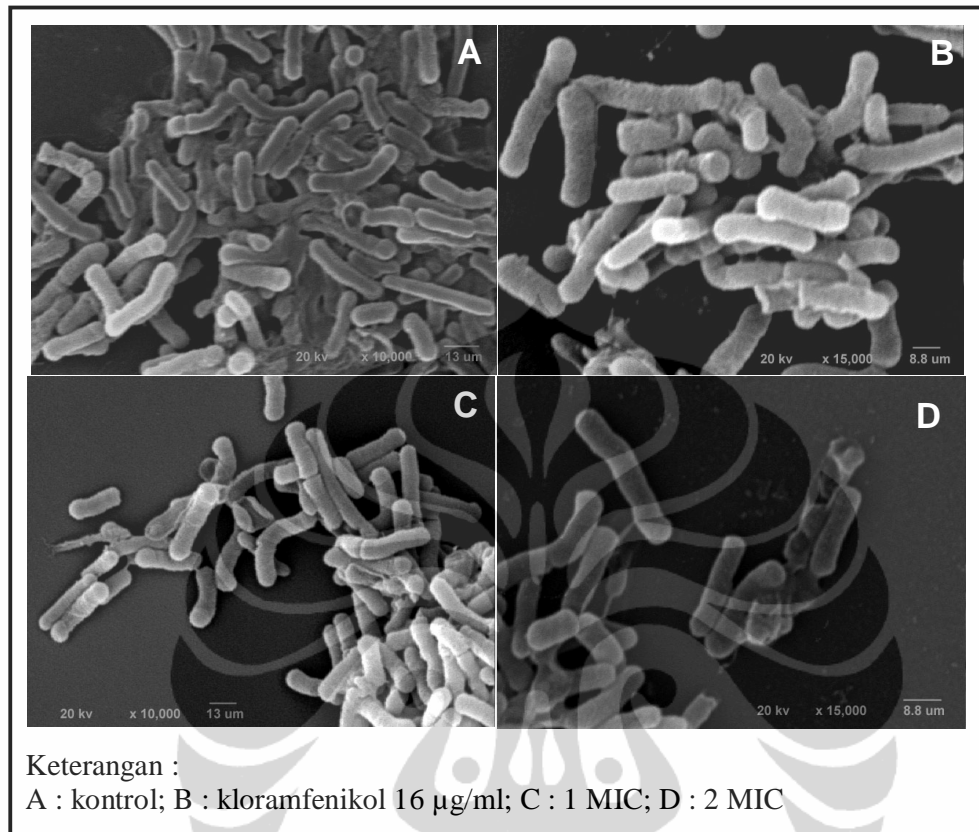
Kerusakan sel *E. coli* oleh perlakuan senyawa F.5.1 dengan konsentrasi 1 MIC dan 2 MIC seperti pada Gambar I.15C dan I.15D. Bentuk sel yang keriput dan tidak utuh (Gambar I.15C dan Gambar I.15D) kemungkinan diakibatkan oleh kerusakan dinding sel dan terganggunya permeabilitas membran. Kerusakan sel tersebut mengakibatkan keluarnya material intraseluler sehingga menyebabkan kematian sel. Data tersebut didukung dengan tingginya kebocoran protein, asam nukleat, dan urasil yang telah dijelaskan sebelumnya. Menurut Diver dan Wise (1986), perubahan bentuk sel seperti pengembangan atau pemanjangan oleh

paparan senyawa antimikroba merupakan indikasi adanya gangguan yang dapat menyebabkan kematian sel.

Analisis perubahan morfologi sel pada bakteri Gram Positif

Perlakuan 1 MIC dan 2 MIC terdapat perubahan bentuk sel pada *B. subtilis*, beberapa sel sudah mengalami kerusakan (Gambar I.16C dan I.16D). Pada dinding sel terdapat lubang yang cukup besar. Lubang tersebut akan mengganggu metabolisme seluler dan dapat menghentikan proses proliferasi dan pertumbuhan sel. Kontrol menunjukkan bentuk sel *B. subtilis* yang normal (Gambar I.16A). Morfologi sel yang diberi perlakuan tidak mengalami perubahan secara signifikan (Gambar I.16B – I.16D). Perlakuan dengan penambahan kloramfenikol sebagai kontrol positif juga menunjukkan bahwa sel masih utuh dan tidak terdapat perubahan (Gambar I.16B).

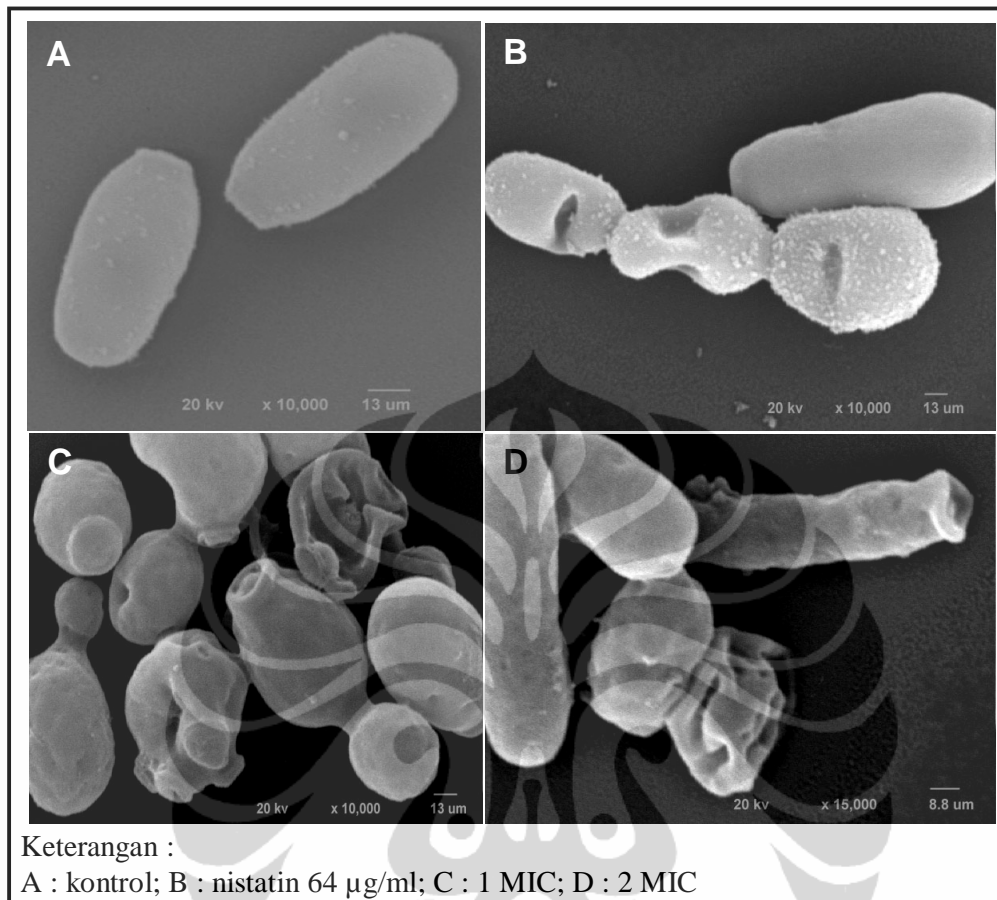
Perlakuan 1 MIC dan 2 MIC menunjukkan kerusakan morfologi sel *B. subtilis* (Gambar I.16C dan I.16D) walaupun tidak merata di semua sel yang diamati. Perlakuan kloramfenikol tidak menunjukkan perubahan morfologi *B. subtilis* secara signifikan dibanding kontrol. Walaupun demikian, data kebocoran asam nukleat, protein, dan urasil oleh perlakuan 1 MIC, 2 MIC, dan kloramfenikol lebih tinggi secara signifikan dibanding kontrol. Hal tersebut diduga karena kebocoran pada dinding sel relatif kecil sehingga tidak teramati secara jelas dengan perbesaran mikroskop 10.000 – 15.000 kali. Kemungkinan lain adalah kebocoran pada membran sel, terutama oleh perlakuan kloramfenikol. Menurut penelitian yang dilakukan Hyde *et al.* (2006), *Bacillus subtilis* juga mengalami kebocoran sel dan kematian sel namun tidak terlihat secara jelas dari kerusakan dinding selnya, hanya sedikit penonjolan pada membran dan dinding sel.



Gambar I.16. Morfologi *B. subtilis* setelah perlakuan F.5.1 dan kloramfenikol dengan pengamatan menggunakan SEM

Analisis perubahan morfologi sel khamir

Khamir yang digunakan dalam pengujian anti khamir adalah *C. albicans*. Khamir dikenal luas sebagai model dalam uji senyawa anti fungi dan bahkan anti kanker (Nitiss & Heitman 2007). Hal tersebut karena khamir memiliki banyak kemiripan dengan sel kanker (Nitiss & Heitman 2007). Perubahan morfologi sel khamir dapat dilihat pada Gambar I.17.



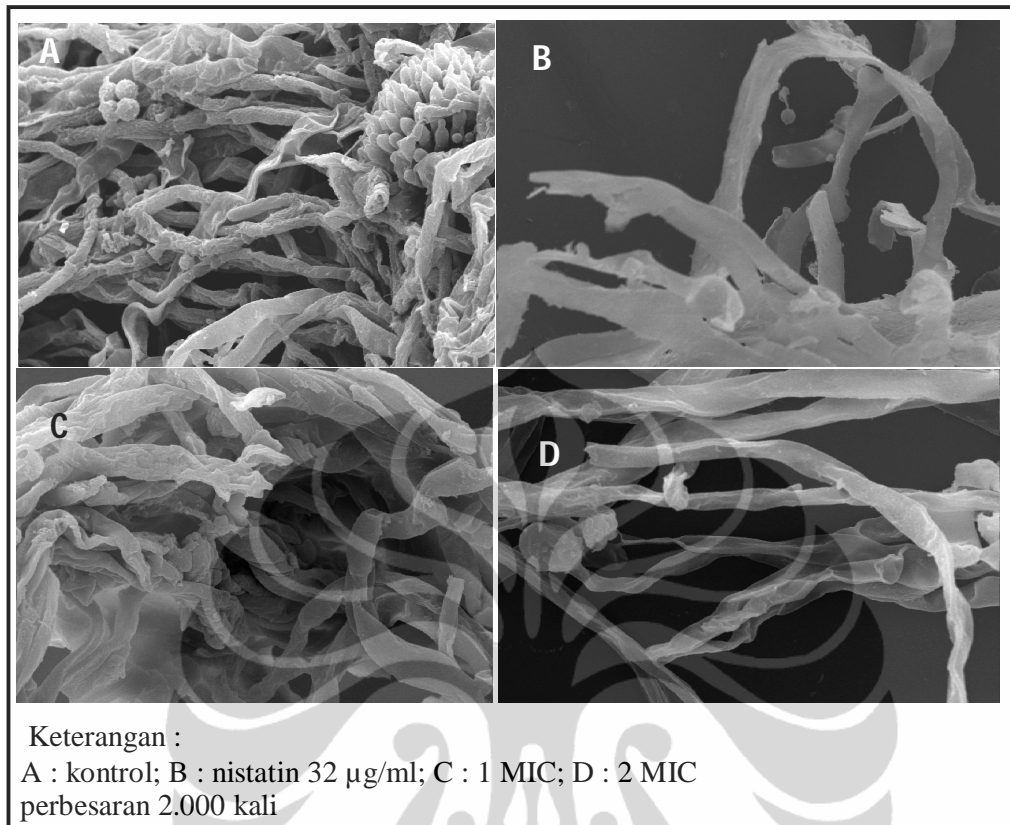
Gambar I.17. Morfologi *C. albicans* setelah perlakuan F.5.1 dan nistatin dengan pengamatan menggunakan SEM

Hasil observasi menggunakan SEM menunjukkan bahwa sel khamir kontrol (tanpa penambahan senyawa uji) terlihat normal, tidak terlihat adanya kerut dan kerusakan (Gambar I.17A). Bentuk asli sel *C. albicans* elips dan simetris. Perlakuan antifungi komersial nistatin (Gambar I.17B) menunjukkan adanya perubahan morfologi sel, ukuran sel menjadi lebih kecil, terjadi pemanjangan dan terbentuk lubang pada dinding sel. Perlakuan 1MIC dan 2 MIC menunjukkan perubahan yang berbeda (Gambar I.17C dan I.17D). Pada perlakuan 1 MIC terlihat jelas bahwa sel mengalami penggembungan yang tidak teratur dan sebagian lagi mengerut. Penggembungan sel yang tidak teratur dan menonjol ke segala arah merupakan ciri khas terjadinya apoptosis berdasarkan Granot *et al.* (2003) yang identik dengan kerusakan sel kanker. Perlakuan 2 MIC juga

menunjukkan karakter yang hampir sama dengan perlakuan 1 MIC, hanya saja terjadi pemanjangan sel pada perlakuan 2 MIC. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena kegagalan pertunasan berdasarkan Sasidharan *et al.* (2008). Penyebab pemanjangan sel diduga juga disebabkan karena sel tidak dapat menyerap nutrisi disebabkan pengaruh penempelan senyawa aktif.

Analisis perubahan morfologi pada kapang

Penelitian yang dilakukan dengan perlakuan 1 MIC dan 2 MIC (Gambar I.18C dan I.18D) menunjukkan bentuk hifa yang lebih pipih dibanding kontrol. Pemipihan hifa kemungkinan disebabkan karena penurunan integritas dinding sel dan permeabilitas membran. Tidak ditemukan spora yang masih menempel pada perlakuan 1 MIC dan 2 MIC. Data morfologi tersebut diperkuat dengan tingginya kebocoran asam nukleat, protein, dan urasil pada perlakuan 1 MIC dan 2 MIC seperti yang telah dijelaskan pada pembahasan sebelumnya. Bentuk morfologi yang serupa juga terjadi pada perlakuan nistatin (Gambar I.18B). Menurut Mayer *et al.* (2007), respon *A. niger* terhadap senyawa antifungi bermacam-macam. Respon tersebut adalah penghambatan sporulasi, pelepasan spora, penurunan integritas dinding sel, penurunan permeabilitas membran, peningkatan resistensi terhadap stress oksidasi, dan penurunan laju metabolisme.



Gambar I.18. Morfologi miselia *A. niger* setelah perlakuan F.5.1 dan nistatin dengan pengamatan menggunakan SEM

Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa senyawa F.5.1 yang merupakan senyawa murni produksi actinomycetes asal Raja Ampat, Papua mampu menghambat bakteri dan fungi. Secara umum penghambatan terjadi melalui kebocoran asam nukleat, protein, dan urasil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa proses translasi dari mikroba uji terhambat dengan tingginya urasil yang terdeteksi. Sel mikroba uji juga mengalami perubahan morfologi, seperti terbentuk lubang pada dinding sel, pemanjangan sel dan pemipihan hifa pada kapang uji setelah perlakuan senyawa F.5.1.

Efek sitotoksik senyawa F.5.1 terhadap sel kanker

Tabel I.5 menunjukkan hasil pengujian toksisitas senyawa F.5.1 terhadap enam sel kanker dan satu sel normal, dengan pembandingan antikanker komersial doksorubisin. Secara umum senyawa F.5.1 dapat menghambat enam sel kanker yang digunakan dengan nilai IC_{50} yang lebih rendah dibandingkan dengan doksorubisin, kecuali pada sel Leukimia dan sel normal. Hal tersebut menandakan bahwa senyawa F.5.1 lebih efektif secara *in vitro* dalam menghambat sel kanker dibandingkan dengan doksorubisin.

Tabel I.5. Nilai IC_{50} ekstrak F.5.1 dan doksorubisin terhadap tujuh sel *lines*

Jenis sel <i>line</i>	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	
	BL-22-5	Doksorubisin
MCM-B2 (<i>mammary cancer</i>)	0,86 ^a	2,01 ^b
HeLa (<i>cervical cancer</i>)	0,89 ^a	1,10 ^b
Leukemia	3,81 ^b	1,17 ^a
A549 (<i>lungs cancer</i>)	2,17 ^a	4,38 ^b
T47 D (<i>human breast cancer</i>)	0,02 ^a	0,50 ^b
WiDr (<i>colon cancer</i>)	0,09 ^a	1,04 ^b
Vero (<i>Normal cell</i>)	37.734,63 ^b	15,19 ^a

Keterangan : Angka yang diikuti dengan superskrip huruf yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata pada tarap uji 0,05.

Nilai IC_{50} senyawa F.5.1 cukup bervariasi. Semakin rendah nilai IC_{50} menunjukkan semakin baik senyawa tersebut dalam membunuh sel kanker. Hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa senyawa F.5.1 memiliki kemampuan lebih tinggi dalam membunuh sel kanker yang diuji dibandingkan dengan doksorubisin, kecuali pada sel leukemia. Nilai IC_{50} terhadap sel kanker payudara (T47D) dan sel kanker usus (WiDr) jauh lebih kuat, dengan nilai 25 kali dan 12 kali dibandingkan dengan doksorubisin. Hasil pengujian juga menunjukkan bahwa senyawa F.5.1 tidak toksik terhadap sel normal, dengan nilai IC_{50} sebesar 37.734,63 $\mu\text{g/ml}$, dibandingkan dengan doksorubisin yang hanya 15,19 $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} doksorubisin terhadap sel normal tersebut masih relatif toksik jika merujuk pada standar toksisitas menurut WHO (2010), sehingga penggunaan terhadap pengobatan harus dibatasi dan selektif.

Nilai IC_{50} antikanker merupakan konsentrasi dosis minimum dari senyawa yang mampu menghambat 50 % pertumbuhan sel kanker. Kemampuan senyawa antikanker semakin baik ditunjukkan dengan semakin rendah nilai IC_{50} senyawa tersebut. Penelitian yang telah dilakukan menemukan bahwa senyawa F.5.1 produksi actinomycetes BL-22-5 mampu menghambat semua sel kanker yang diujikan. Berdasarkan WHO (2010), nilai IC_{50} kurang dari 2 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan senyawa tersebut sangat aktif dan dapat dikembangkan sebagai obat antikanker potensial. Nilai IC_{50} 2 -- 4 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan senyawa tersebut aktif, dan nilai IC_{50} 4 – 20 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan senyawa tersebut cukup aktif. Hasil penelitian pada Tabel I.5 menunjukkan bahwa senyawa F.5.1 sangat aktif terhadap sel MCMB-2, HeLa, T47D dan WiDr dan aktif terhadap sel A59 dan Leukemia.

Metabolit murni F.5.1 produksi isolat BL-22-5 dapat menghambat pertumbuhan sel kanker diduga melalui satu atau beberapa mekanisme penghambatan. Mekanisme penghambatan pertumbuhan sel kanker sangat kompleks (Joensuu, 2008). Walaupun demikian, secara umum senyawa antikanker dapat bekerja dengan enam mekanisme penting. Warwick (1963) menyatakan bahwa mekanisme pertama adalah agen alkilasi. Mekanisme ke dua dengan cara penghambatan enzim topoisomerase I. Mekanisme ke tiga dengan menghambat enzim topoisomerase II. Mekanisme ke empat adalah dengan antimetabolisme RNA (Kanamura & Wakui 1988). Mekanisme ke lima bersifat antimetabolit DNA (Gmeiner 2002). Mekanisme ke enam berupa agen antimitosis (Schmidt & Bastians 2007). Menurut Joensuu (2008) dan Tokimoto & Calvo (2008), beberapa mekanisme tersebut pada akhirnya akan mengaktifkan enzim kaspase, sehingga terjadi apoptosis sel kanker.

Senyawa F.5.1 mampu menghambat semua sel kanker secara *in vitro* dengan nilai IC_{50} yang rendah. Senyawa tersebut berpeluang untuk dikembangkan menjadi obat antikanker potensial. Walaupun demikian, masih banyak penelitian yang harus dilakukan untuk memastikan bahwa senyawa F.5.1 dapat dijadikan obat antikanker. Penelitian tersebut diantaranya pengujian efektivitas terhadap sel kanker lain, studi mekanisme kerja, dan uji *in vivo* serta uji klinik.

KESIMPULAN

Penapisan antimikroba menunjukkan hasil yang positif. Sebanyak 44 % dari 100 isolat actinomycetes Raja Ampat memiliki aktivitas antimikroba. Isolat terbaik, BL-22-5, memiliki aktivitas antimikroba tertinggi. Isolat tersebut menghasilkan delapan metabolit berdasarkan hasil TLC dan HPLC. Perlakuan senyawa F.5.1 yang dihasilkan isolat BL-22-5 terhadap mikroba uji menyebabkan kebocoran sel (protein, asam nukleat, dan urasil) dari *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, dan *A. niger*. Aktivitas antifungi dari senyawa F.5.1 lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas antibakteri.

Senyawa F.5.1 juga memiliki aktivitas antikanker yang tinggi. Aktivitas senyawa F.5.1 tersebut lebih tinggi dibanding dengan doksorubisin dalam membunuh sel kanker, kecuali untuk sel leukemia. Senyawa F.5.1 tidak toksik terhadap sel normal, dengan nilai IC_{50} jauh di atas doksorubisin.

SARAN

Penetapan struktur kimia metabolit F.5.1 produksi actinomycetes isolat BL-22-5 perlu dilakukan menggunakan *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR). Mekanisme antimikroba dan antikanker dari metabolit F.5.1 juga perlu diketahui lebih detail. Penelitian dapat dilanjutkan menjadi uji *in vivo*, terutama terhadap sifat antikanker yang dimiliki oleh metabolit F.5.1 yang telah ditemukan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA Pusat Penelitian Biologi LIPI, Kementerian Riset dan Teknologi, dan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Praptiwi (Puslit Biologi LIPI), Prof. Dr. Supargiyono, Dina Fatmawati (FK UGM) dan Prof. Dr. Bambang Pontjo (FKH IPB) atas bantuan selama uji toksisitas.

DAFTAR ACUAN

- Alexander, J.H., J.I. Parisot, A. McNichol & B.B. Bonev. 2006. Nisin-induced changes in *Bacillus* morphology suggest a paradigm of antibiotic action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* **103**(52): 19896--19901.
- Allana, J.S., E.B. Chahine & H.E. Balcer. 2009. Echinocandins: The newest class of antifungals. *Journal Annual Pharmacotherapy* **43**(10): 1647--1657.
- Baginski, M. & B. Czub . 2009. Amphotericin B and its new derivatives. *Journal Current Drug Metabolism* **10**(5): 459--469.
- Berdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolism. *Journal of antibiotics* **58**: 1--26.
- Bergmans, L., P. Moisiadis, B. Van Meerbeek, M. Quirynen & P. Lambrechts. 2005. Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. *Journal Endodontic* **38**: 775--788.
- Cheng, M., M. Tseng, I. Chen, C. Liao & G.F. Yuan. 2009. Secondary metabolites from the culture broth of actinomycete *Acrocarpospora* sp. Firdi 001 and their antimicrobial activity. *Journal Chemical Society* **54**(2): 198--200.
- Cowan, M.M. 1999. Plant product as antimicrobial agents. *Journal Clinical Microbial Reviews* **12**(4): 564--582.
- Cui, H., K. A. Shaaban & S. Qin. 2006. Two anthraquinone compounds from a marine actinomycete isolate M097 isolated from Jiaozhou Bay. *World Journal Microbiology and Biotechnology* **22**: 1377--1379.
- Daniel J.S., C.A. Hitchcock & C.M. Sibley. 1999. Current and emerging azole antifungal agents. *Journal Clinical Microbiology Review* **12**(1): 40--79.
- Demain, A.L. 2000. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Journal Biotechnology* **18**: 499--514.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2012. Jika tidak dikendalikan 26 juta orang di dunia menderita kanker.
<http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/>.

- Diver, J. M. & R. Wise. 1986. Morphological and biochemical changes in *Escherichia coli* after exposure to ciprofloxacin. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* **18**: 31--41.
- Eloff, J.N. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial component? *Journal Ethnopharmacology* **60**: 1--8.
- Engelberg-Kulka, H., B. Sat, M. Reches, S. Amitai & R. Hazan. 2004. Bacterial programmed cell death systems as targets for antibiotics. *Journal Trend in Microbiology* **12**(2): 66--71.
- EUCAST. 2010. http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/
- Fornari, F.A., J.K. Randolph, J.C. Yolawich, M.K. Ritke & D.A. Gewirtz. 1994. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Journal Molecular Pharmacology* **45**(4): 649--656.
- Fortunati, E. & V. Bianchi. 1989. Plasma membrane damage detected by nucleic acid leakage. *Journal Molecular Toxicology* **2**(1): 27--38.
- Frederick, C.A., L.D. Williams & G. Ugetto. 1990. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes : adriamycin and daunomycin. *Journal of Biochemistry* **29**(10): 2538--2549.
- Giacometti, A., O. Cirioni, M. Simona, D. Prete, F. Barchiesi & G. Scalise. 2000. Infection in cell culture parvum cryptosporidium antibiotics inhibits short-term exposure to membrane-active. *Journal Antimicrobial Agents Chemotherapy* **44**(12): 3473--3475.
- Gmeiner, W.H. 2002. Antimetabolite incorporation into DNA: structural and thermodynamic basis for anticancer activity. *Journal Biopolymers* **65**(3): 180--189.
- Hayakawa, M., T. Sadakata, T. Kajiura, & H. Nonomura. 1991. New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *Journal Fermentation. and Bioengineering* **72**(5): 320--326.
- Hayakawa, M., Y. Yoshida & Y. Limura. 2004. Selective isolation of bioactive soil Actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *Journal Apply Microbiology* **96**: 973--981.

- Howlett, N. G. & R. H. Schiestl. 2004. Nucleotide excision repair deficiency causes elevated levels of chromosome gain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal DNA Repair (Amst)* **3**: 127--134.
- Hugo, W.B. & A.D. Russell. 1992. *Types of antimicrobial agents. In principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. Oxford, UK .
- Igarashi, Y. 2004. Screening of novel bioactive compounds from plant – associated Actinomycetes. *Journal Actinomycetologica* **18**(2): 63--66.
- Janbon, G., F. Sherman & E. Rustchenko. 1998. Monosomy of a specific chromosome determines l-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. *Journal Natural Academic Science* **95**: 5150--5155.
- Jardetzky, O. July 1963. Studies on the mechanism of action of chloramphenicol - the conformation of chloramphenicol in solution. *Journal of Biological Chemistry* **238**(7): 2498--2508.
- Joensuu, H. 2008. Systemic chemotherapy for cancer : from weapon to treatment. *Journal Lancet oncology* **9**(3): 304--307.
- Kai, J., M. Match & K. Tsukidate. 1999. A new method for preparing electron microscopic specimens of *Helicobacter pylori*. *Journal Medical electron microscopy* **32**(1): 62--65.
- Kanamaru, R. & A. Wakui. 1988. Mechanism of action of anti-cancer drugs from the viewpoint of RNA metabolism. *Journal Gan To Kagaku Ryoho* **15**: 1011--1018.
- Karnofsky, D.A. 2008. Mechanism of action of anticancer drugs in cellular level. *Cancer Journal for clinicians* **18**: 232--234.
- Khan, S., S. Singhal, T. Mathur, D.J. Upadhyay & A. Rattan. 2006. Antifungal susceptibility testing method for resource constrained laboratories. *Indian Journal Medical Microbiology* **24**: 171--176.
- Krishna, P.S.M., G. Venkateswarlu & L.Y. Rao. 1998. Study on fermentative production of rifamycin using *Amycolatopsis mediterranei*. *Journal Microbiology Biotechnology* **14**: 689--691.

- Kurtboke, I. 2001. *Selective isolation of rare Actinomycetes*. Queensland, Australia.
- Lambert, H. P. & F. W. O'Grady. 1992. *Antibiotic and Chemotherapy, 6th ed.* Churchill-Livingstone, Edinburgh.
- Legrand, M., C. L. Chan, P.A. Jauert & D.T. Kirkpatrick. 2007. Role of DNA mismatch repair and double-strand break repair in genome stability and antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *Journal Eukaryota Cell* **6**: 2194--2205.
- Lomovskaya, N., L. Fonstein, X. Ruan, D. Katz & C.R. Hutchinson. 1997. Gene disruption and replacement in the rapamycin aproducing *Streptomyces hygroscopicus* strain ATCC 29253. *Journal Microbiology* **143**: 875--883.
- Madigan, M.T., J.M. Martiko & J. Parker. 2003. *Biology of Microorganisms. Tenth Edition*. Pearson Education, Inc. USA.
- Magee, P. T., L. Bowdin. & J. Staudinger. 1992. Comparison of molecular typing methods for *Candida albicans*. *Journal Clinical Microbiology* **30**: 2674--2679.
- Mann, J. 2001. Natural product as immunosuppressive agents. *Journal Natural Product* **18**: 417--430.
- Mazodier, P. & J. Davies. 1991. Gene transfer between distantly related bacteria. *Annual Review Genetic* **25**: 147--171.
- McEarchern, J.A., E. Oflazoglu, L. Francisco, C. F. McDonagh, K. A. Gordon, I. Stone, K. Klussman, E. Turcott, N. Van-Rooijen, P. Carter, I. S. Grewal, A. F. Wahl & C.L. Law. 2011. Engineered anti-CD70 antibody with multiple effector functions exhibits in vitro and in vivo antitumor activities. *Journal Blood Hematology* **109**(3): 1185--1191.
- Memisoglu, A. & Samson, L. 2000. Base excision repair in yeast and mammals. *Journal Mutation Research* **451**: 39--51.
- Meyer, V., R.A. Damveld, M. Arentshorst, U. Stahl, C.A M.J.J. Van Den Hondel & A.F.J. Ram. 2007. Survival in the presence of antifungals : genome-wide expression profiling of aspergillus niger in response to sublethal

- concentrations of caspofungin and fenpropimorph. *Journal of Biological Chemistry* **282**(45): 32935--32948.
- Miksusanti, B.S. L. Jenie, B.P. Priosoeryanto, R. Syarief & G.T. Rekso. 2008. Mode of action temu kunci (*Kaempferia pandurata*) essential oil on *E. coli* K1.1 cell determined by leakage of material cell and salt tolerance assays. *Journal Hayati* **15**(2): 56--60.
- Milliken, C.E. & R.C. Clowes. 1973. Molecular structure of an R factor, its component drug-resistance determinants and transfer factor. *Journal of Bacteriology* **113**(2): 1026--1033.
- Miyadoh, S. 1997. *Atlas of Actinomycetes*. Asakura Publishing Co Ltd. Japan.
- National Cancer Institute. 2010. What is cancer ? www.cancer.gov. 7 Desember 2010.
- Nikaido, H. & M. Vaara. 1985. Molecular basic of bacterial outer membrane permeability. *Journal Microbiology Review* **49**: 1--32.
- Nikaido, H. Antibiotics resistance caused by gram negative multidrug efflux pumps. *Journal Clinical infection Disease* **27**(1): S32--S41.
- Nitiss, J.L. & J. Heitman. 2007. *Khamir as a tool in cancer research*. Springer press, Dorderecht, Netherland.
- Patel, S., N. Gheewala, A. Suthar & A. Shah. 2009. *In-vitro* cytotoxicity activity of *Solanum nigrum* extract against *Hela* cell line and *vero* cell line. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* **1**(1): 38-46.
- Pattarawadee Sumthong and Robert Verpoorte. 2010. *Developing antimicrobial compound from natural product*. Leiden University , Netherlands.
- Plesiat, P. & H. Nikaido. 1992. Outers membranes of gram negative bacteria are permeable to steroid probes. *Journal Molecular Microbiology* **6**: 1323--1333.
- Rahman, A., M.I. Choudhary & W.J. Thomsen. 2005. *Bioassay Techniques for Drug Development*. Hardwood Academic Publishers, London.
- Renu, S., M. Khanna & R. Lal. 2008. Bioactive compounds from marine Actinomycetes. *Indian Journal Microbiology* **48**: 410--431.

- Saha, M.R., F.A. Ripa, M.Z. Islam & P. Khondkar. 2010. Optimization of conditions and in vitro antibacterial activity of secondary metabolite isolated from *Streptomyces* sp. MNK7. *Journal of Applied Sciences Research* **6**(5): 453--459.
- Samy, P.R. & P. Gopalakrishnakone. 2010. Therapeutic Potential of Plants as Anti-Microbials for Drug Discovery. *Journal Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **7**(3) : 283--294.
- Sasidharan, S., I. Darah & M.K.M.J. Noordin. 2008. Preliminary isolation and in vitro antiyeast activity of active fraction from crude extract of *Gracilaria changii*. *Indian Journal Pharmacology* **40**(5) : 227--229.
- Schmidt, M. & H. Bastians. 2007. Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. *Journal Drug Resistance Update* **10** (4): 162--181.
- Schwalbe, R., L. Stele-Moore & A.C. Goodwin. 2007. *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*. CRC Press. New York.
- Selmecki, A., A. Forche & J. Berman. 2006. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Journal Science* **313**: 367--370.
- Solanki, R., M. Khanna & R. Lal. 2008. Bioactive compounds form marine Actinomycetes. *Indian Journal of Microbiology* **48**: 410--431.
- Sun, X., D. Thrower, J. Qiu, P. Wu, L. Zheng, M. Zhou, J. Bachant, D. Wilson & B. Shen. 2003. Complementary functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Rad2 family nucleases in Okazaki fragment maturation, mutation avoidance, and chromosome stability. *Journal DNA Repair (Amst)* **2**: 925-940.
- Tenover, F.C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Medicine* **119**(1): S3-S10.
- Tokimoto, C.H. & E. Calvo. 2008. Principles of oncologic pharmacotherapy. *Dalam* : Pazdur, R., L.D. Wagman, K.A. Camphausen & W.J. Hoskins (Eds). 2008. *Cancer management : a multidisciplinary approach*.

- Tomkinson, A. E., Bardwell, A. J., Bardwell, L., Tappe, N. J. & Friedberg, E. C. 1993. Yeast DNA repair and recombination proteins Rad1 and Rad10 constitute a single-stranded-DNA endonuclease. *Journal Nature* **362**: 860-862.
- Torres-Ramos, C. A., R.E. Johnson, L. Prakash & S. Prakash. 2000. Evidence for the involvement of nucleotide excision repair in the removal of abasic sites in yeast. *Molecular Cell Biology* **20**: 3522--3528.
- Uchiyama, T. & K. Watanabe. 2007. The SIGEX Scheme: High throughput screening of environmental metagenome for the isolation of novel catabolic genes. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **24**: 107--116.
- UNESCO. 2003. Raja Ampat Island. <http://whc.unesco.org/en/tentativelists>.
- Vaara, M. 1993. Antibiotic-supersusceptible mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Antimicrobial Agents Chemotherapy* **37**: 2255--2260.
- Warwick, G. P. 1963. The mechanism of action of alkylating Agents. *Journal Cancer Reserach* **23**:1315--1333.
- Widyastuti, Y. & K. Ando. 2009. *Taxonomic and ecological studies of Fungi and Actinomycetes in Indonesia*. LIPI press, Jakarta.
- Wolfe, A. D. & F.E. Hahn. 1965. Mode of action of chloramphenicol. IX. effects of chloramphenicol upon a ribosomal amino acid polymerization system and its binding to bacterial ribosome. *Journal Biochimica et Biophysica Acta* **95**: 146--155.
- World Health Organization. 2004. Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
- World Health Organization. 2011. Global health observatory metadata. <http://apps.who.int/athena/>.
- Xiaoxi, C. 2011. *In vitro* and *in vivo* anticancer activities of a novel antibiotic. *African Journal of Biotechnology* **10**(41): 8137--8139.

- Yuan, J.H., R. P. Zhang, R.G. Zhang, L.X. Guo, X.W. Wang, D. Luo, Y. Xie & H. Xie. 2000. Growth-inhibiting effects of taxol on human liver cancer in vitro and in nude mice. *World Journal Gastroenterology* **6**(2): 210--215.
- Zhao, M., W. Wei, J. Liu, Y. Zhang, J. Jiao, Y. Fu & P. An. 2009. Impact of MTT based tumor chemosensitivity assay in vitro. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology* **8**(9) : 546--548.



MAKALAH II**IDENTIFIKASI ISOLAT-ISOLAT ACTINOMYCETES TERSELEKSI
PENGHASIL ANTIMIKROBA DARI RAJA AMPAT, PAPUA****IDENTIFICATION OF SELECTED ACTINOMYCETES WITH
ANTIMICROBIAL ACTIVITY FROM RAJA AMPAT, PAPUA****Arif Nurkanto***arief_nurkanto@yahoo.com***ABSTRACT**

The objective of this research was to identify actinomycetes isolates with antimicrobial activity. We selected nine actinomycetes isolates after screening based on their highest antimicrobial activities. They were identified based on full sequencing of 16S rRNA gene by six primers (20F, 520F, 920F, 1500R, 920R, and 520R). Morphological and physiological characterizations were performed. Morphological characters observed were aerial mycelium, spore chain, colony, and pigmen production. Physiological characterizations included antimicrobial properties, growth temperature, pH tolerance, salinity concentration for growth, sugars assimilation, and some enzymes production (arginine dihydrolase, urease, β -glucosidase, protease, β -galactosidase). Based on homology search by BLAST program and phylogenetic tree analyses, all isolates were identified as *Streptomyces*. They belong to eight different species. Isolates RC-SS-37-4, RC-SS-37-16, BL-22-3, and BL-22-5 have been identified as *Streptomyces costaricanus* (100 %), *Streptomyces costaricanus* (99.8 %), *Streptomyces parvulus* (98.6 %), and *Streptomyces badius* (98.9 %), respectively. Five isolates were identified as *Streptomyces* spp. (BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, BL-22-1 and BL-06-5) and can be presumed as new species because of the low homology value to their closest related spesies.

Key words : actinomycetes, antimicrobial, Raja Ampat, 16S rRNA gene.

PENDAHULUAN

Penelitian tentang potensi actinomycetes sebagai antimikroba dan antikanker telah dilakukan. Makalah sebelumnya telah menguraikan adanya aktivitas biologi ekstrak yang diproduksi oleh 100 isolat actinomycetes. Hasil penelitian telah diketahui bahwa beberapa jenis actinomycetes tersebut memperlihatkan aktivitas yang potensial sebagai penghasil antimikroba. Pada bagian I juga telah diuraikan proses isolasi satu metabolit utama dari isolat BL-22-5 yang juga memiliki aktivitas sitotoksik terhadap beberapa jenis sel kanker lestari (*cell lines*). Tahapan selanjutnya yang tidak kalah pentingnya dalam rangkaian penelitian ini adalah identifikasi actinomycetes terpilih yang telah diketahui memiliki potensi untuk menghasilkan senyawa bioaktif antimikroba sehingga identitasnya dapat ditetapkan.

Actinomycetes merupakan kelompok bakteri Gram positif dan terdistribusi luas di alam. Actinomycetes dikenal sebagai mikroorganisme saprofitik pada tanah dan seresah (Takisawa *et al.* 2003). Secara umum, actinomycetes dibedakan menjadi dua kelompok. Kelompok tersebut adalah *Streptomyces* dan *rare-actinomycetes* (Kurtboke 2001). *Rare-actinomycetes* digunakan sebagai istilah untuk menyebut genus selain *Streptomyces*. *Rare-actinomycetes* terdiri dari 201 genus, relatif lebih sulit diisolasi, dan pertumbuhan yang lebih lambat dibandingkan dengan *Streptomyces* (Miyadoh 1997).

Menurut Goodfellow *et al.* (2011), actinomycetes masuk dalam kelas *Actinomycetales* atau *Actinobacteria*. Kelas *Actinobacteria* memiliki 6 ordo, 46 famili, dan 202 genus. Jumlah spesies yang telah ditemukan sebanyak 2.335. Jumlah actinomycetes masih terus bertambah seiring dengan banyak penemuan taksa baru yang didorong oleh penelitian yang intensif. *Streptomyces* merupakan genus terbesar dengan jumlah spesies lebih dari 500. Selain *Streptomyces*, genera dominan yang juga banyak ditemukan di antaranya *Nocardia*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, dan *Actinoplanes* (Madigan *et al.* 2003, Goodfellow *et al.* 2011).

Identifikasi molekuler terhadap actinomycetes dapat dilakukan dengan berbagai pendekatan. Identifikasi gen-gen tertentu yang menjadi penanda suatu tingkat takson dalam actinomycetes telah banyak dikembangkan. Sebagai contoh identifikasi *small sub unit* (SSU) DNA, *large sub unit* (LSU) DNA, dan *multilocus gene*. Analisis gen 16S rRNA dalam SSU merupakan metode identifikasi actinomycetes yang paling sering digunakan (Embley & Stackebrandt 1994).

Identifikasi gen 16S rRNA didasarkan pada banyak faktor. Gen 16S rRNA bersifat *multi copy* karena terdapat sekitar 150-300 *copy* di dalam genom. Hal tersebut mempermudah untuk mendapatkannya dalam genom. Dalam gen 16S rRNA terdapat daerah variabel dan konservatif yang dapat dijadikan pembeda antar spesies. Secara umum, gen 16S rRNA adalah gen non fungsional dan bersifat lebih konservatif karena evolusi berjalan lambat (Avisé 1994; Palys *et al.* 1997). *Database* tentang bakteri berdasarkan identifikasi 16S rRNA sudah banyak sehingga memudahkan dalam perbandingan. Perpindahan gen 16S rRNA secara horizontal tidak dapat terjadi sehingga dapat dijadikan penanda spesies. Gen 16S rRNA bersifat universal pada bakteri (Koonin 2003; Santos & Ochman 2004).

Identifikasi actinomycetes data sekuen 16S rDNA relatif kompleks. Spesies actinomycetes yang sama umumnya memiliki homologi *sequence* gen 16S rDNA di atas 98 %. Nilai homologi 98 % atau kurang mengindikasikan spesies yang berbeda (Jauh-Hsun *et al.* 2002; Patel *et al.* 2004). Walaupun demikian, dalam beberapa kasus actinomycetes dapat dikelompokkan menjadi spesies baru walaupun homologi 16S rDNA di atas 99 %. Hal tersebut terjadi jika nilai homologi hibridisasi DNA-DNA rendah, atau kurang dari 70 % (Jauh-Hsun *et al.* 2002; Patel *et al.* 2004).

Karakterisasi morfologi dan fisiologi juga merupakan faktor penting. Adanya data morfologi dan fisiologi dalam tahap identifikasi actinomycetes dapat digunakan untuk mendiskripsikan isolat-isolat yang sudah diidentifikasi secara molekuler. Dalam beberapa kasus, sering dijumpai kemiripan jenis dalam actinomycetes secara molekuler, namun berbeda secara morfologi dan fisiologi.

Hal tersebut dapat terjadi jika identifikasi molekuler yang dilakukan hanya terhadap satu atau beberapa gen penanda saja (Madigan *et al.* 2003).

Adanya data morfologi, fisiologi, dan molekuler akan memberikan hasil yang akurat tentang identitas actinomycetes. Karakterisasi tersebut dapat berupa kemampuan asimilasi berbagai jenis gula, toleransi suhu pertumbuhan, toleransi salinitas dan derajat keasaman (pH), produksi beberapa enzim tertentu, observasi morfologi miselium dan spora, serta produksi senyawa tertentu. Perbedaan karakter morfologi, fisiologi, dan biokimia antar isolat actinomycetes, dapat menjadi kunci dalam deskripsi spesies, selain informasi data molekuler.

Analisis filogenetik merupakan bagian penting dalam studi sistematika mikroba, termasuk actinomycetes. Secara fundamental, analisis filogenetik membantu dalam memahami dan mendeskripsikan keanekaragaman organisme dan merekonstruksi hubungan kekerabatannya terhadap organisme lain (Cavalli-Sforza 1997). Perubahan secara evolusi juga dapat diketahui dengan analisis filogenetik (Baxevanis & Oulette 1998).

Penelitian bertujuan untuk menemukan identitas isolat-isolat actinomycetes terseleksi dari Raja Ampat, Papua. Sebanyak sembilan dari seratus isolat actinomycetes dengan aktivitas antimikroba tertinggi dipilih untuk diidentifikasi secara molekuler dengan pendekatan gen 16S rRNA. Analisis filogenetik berdasarkan data molekuler dilakukan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar isolat yang diidentifikasi maupun isolat actinomycetes lain. Analisis filogenetik yang dilakukan sangat membantu dalam menemukan jenis actinomycetes lain yang memiliki kekerabatan dekat dengan isolat yang sedang diidentifikasi. Karakterisasi morfologi dan fisiologi terhadap sembilan isolat tersebut juga dilakukan dalam penelitian ini untuk melengkapi data molekuler yang diperoleh dan digunakan untuk deskripsi isolat-isolat yang sudah teridentifikasi.

BAHAN DAN CARA KERJA

BAHAN

1. Mikroorganisme

Mikroba yang digunakan adalah isolat actinomycetes yang memiliki aktivitas antimikroba tertinggi berdasarkan penapisan yang telah dilakukan sebelumnya. Isolat tersebut adalah BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, RC-SS-37-4, RC-SS-37-16, BL-22-1, BL-06-5, BL-22-3 dan BL-22-5.

2. Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah yeast starch agar (YSA), *Internasional standard Streptomyces 2 (ISP2)*, dan *yeast starch* cair untuk menumbuhkan actinomycetes.

3. Bahan Kimia

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah *agarose*, bahan ekstraksi DNA, bahan PCR, bahan sekuensing DNA, dan *api 20® kit* (Biomerieux).

CARA KERJA

Isolat-isolat actinomycetes terpilih diidentifikasi berdasarkan data sekuen gen 16S rRNA. Isolat terpilih yang diidentifikasi adalah actinomycetes yang menghasilkan metabolit bioaktif terbaik dari hasil penapisan yang dilakukan. Proses identifikasi molekuler bakteri akan dijelaskan dalam tiap poin di bawah ini.

1. Persiapan isolat untuk isolasi DNA

Sebanyak sembilan isolat (BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, RC-SS-37-4, RC-SS-37-16, BL-22-1, BL-06-5, BL-22-3 dan BL-22-5) yang memiliki aktivitas antimikroba tertinggi dipilih dan ditumbuhkan dalam medium agar. Satu ose isolat diinokulasikan ke dalam petri yang berisi medium YSA. Inkubasi dilakukan selama 4 hari dalam suhu 28 °C. Koloni yang tumbuh dalam medium dikerok dan

dipindahkan ke dalam tabung Ependorf 1,5 ml untuk selanjutnya dilakukan ekstraksi DNA.

2. Ekstraksi DNA dan Amplifikasi gen 16S rRNA

Ekstraksi DNA menggunakan metode Guanidin EDTA Sarkosil (GES) (Pitcher *et al.* 1989). Sel dalam tabung dicuci dengan tris-HCl EDTA (TE), kemudian ditambahkan 50 μ l *lysozyme* dan diinkubasi 37 °C selama 30 menit. Setelah divorteks, suspensi sel ditambahkan 250 μ l reagen GES selama 10 menit. Tahap selanjutnya suspensi sel ditambahkan 125 μ l 7,5 M amonium asetat dan 500 μ l kloroform, kemudian disentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan ditambah dengan isopropanol dengan volume sama kemudian di aduk dan disentrifugasi. Pelet DNA yang terbentuk dicuci dengan alkohol 70 %, kemudian ditambahkan TE.

Amplifikasi dengan menggunakan PCR dilakukan setelah DNA diperoleh. Gen 16S rRNA di amplifikasi dengan menggunakan primer universal untuk bakteri sesuai yang dilakukan Suriyachadkun *et al.* (2010), yaitu 20F (5'-GATTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1500R (5-GTTACCTTGTTACGACTT-3'). Volume *cocktail* PCR sebanyak 25 μ l disiapkan dengan komposisi : primer 20 F dan 1500 R 10 pmol masing-masing 1 μ l, *DNA template* 5 μ l, DMSO 0,5 μ l, Go Taq (Promega) sebesar 12,5 μ l, dan *deionized water* sampai volume 25 μ l.

Reaksi PCR dilakukan sebanyak 35 siklus. Pemanasan pertama pada suhu 95 °C selama 1,5 menit. Setelah pemanasan, proses dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi 0,5 menit pada suhu 95 °C, *annealing* 0,5 menit pada suhu 50 °C dan 1,5 menit ekstensi pada suhu 72 °C. Setelah 35 siklus selesai, diikuti 10 menit pada suhu 72 °C dan pendinginan pada suhu 4 °C selama 30 menit. Hasil amplifikasi difraksinasi secara elektroforesis pada gel agarose 1 % dalam buffer Tris Acetat-EDTA (TAE) selama 25 menit pada tegangan 100 volt. Gel hasil elektroforesis direndam dalam larutan *ethidium bromide* dengan konsentrasi 1 μ l/100 ml selama 20 menit. Hasil pemisahan divisualisasi pada *Gel Doc Printgraph* menggunakan *UV transilluminator* dengan menggunakan standar

1.000 bp *DNA ladder* untuk mengetahui hasil dan ukuran pita DNA hasil amplifikasi.

3. Purifikasi produk PCR

Purifikasi produk PCR dilakukan setelah proses PCR berhasil. Sebanyak 6 µl larutan polietilen glikol/ PEG (40 % PEG 6000 dan 10 mM MgCl₂) dan 15 µl sodium asetat 3 M ditambah ke dalam 25 µl sampel produk PCR (Hiraishi *et al.* 1995). Sampel dikocok selama 10 menit dan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dengan cara dipipet. Pelet DNA dicuci dengan 50 µl etanol 70 % sebanyak 2 kali, kemudian dikeringkan. Pelet kemudian dilarutkan dengan 20 µl *deionized water*.

4. Cycle Sequencing

Reaksi PCR *Cycle sequencing* dilakukan setelah purifikasi produk PCR. Reaksi yang dilakukan hampir mirip dengan PCR, tetapi menggunakan 1 primer untuk tiap reaksi. Penelitian menggunakan 6 primer untuk memperoleh sekuen lengkap dari gen 16S rRNA. Primer yang digunakan adalah 520 F (5'-GTGCCAGCAGCCGCGG-3'), 920 R (5'-CCGTCAATTCATTTGAGTTT-3'), 520 R (5'-ACCGCGGCTGCTGGC-3'), 920 F (5'-AAACTCAAATGAATTGACGG-3'), 20 F (5'-GATTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1500 R (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3') (Yukphan *et al.* 2004; Nurkanto *et al.* 2010; Suriyachadkun *et al.* 2010; Techaoei *et al.* 2011). Komposisi *cocktail* yang digunakan untuk tiap tabung adalah 0,5 µl primer 10 pmol, 1 µl DNA hasil purifikasi, 0,5 µl Big Dye Terminator sequen premix kit (Applied Biosystems Inc., Warrington, UK), 5 kali buffer sequen 1,5 µl dan *deionized water* sampai volume 10 µl.

Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan 40 siklus. Pemanasan pertama pada suhu 96 °C selama 60 detik diikuti dengan siklus yang terdiri dari denaturasi 10 detik pada suhu 96 °C, *annealing* 5 detik pada suhu 50 °C dan 1,5 menit ekstensi pada suhu 60 °C. Pada tahap ini, masing-masing primer direaksikan dalam tabung yang terpisah.

5. Preparasi sampel dan *Sequencing*

Preparasi sampel dilakukan dengan mencampurkan 10 µl produk *cycle sequencing* dengan 1 µl 3 M Na-asetat, 1 µl 125 mM EDTA (pH 8) dan 25 µl etanol absolut kemudian di vortex dan didiamkan selama 15 menit. Tahap berikutnya dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit pada temperatur dingin (4 °C). Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 70 % etanol untuk kemudian disentrifugasi ulang 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikeringanginkan selama 10 menit. Pelet DNA yang sudah kering ditambah dengan 10 µl HiDi-Formamide dan di vortex. Sampel kemudian dipanaskan pada suhu 95 °C selama 2 menit dan segera didinginkan dalam es. Tahap selanjutnya sampel diinjeksi ke dalam mesin *Automated DNA sequencer* (ABI 3130).

6. Identifikasi berdasarkan data sekuen

Analisis DNA menggunakan program BioEdit dan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) pada *database* Bank gen National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Hall 1999) dan Ribosomal Database Project (RDP). Data NCBI BLAST tersedia pada laman <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, sedangkan RDP pada laman <http://www.rdp.cme.msu.edu>.

7. Analisis filogenetik

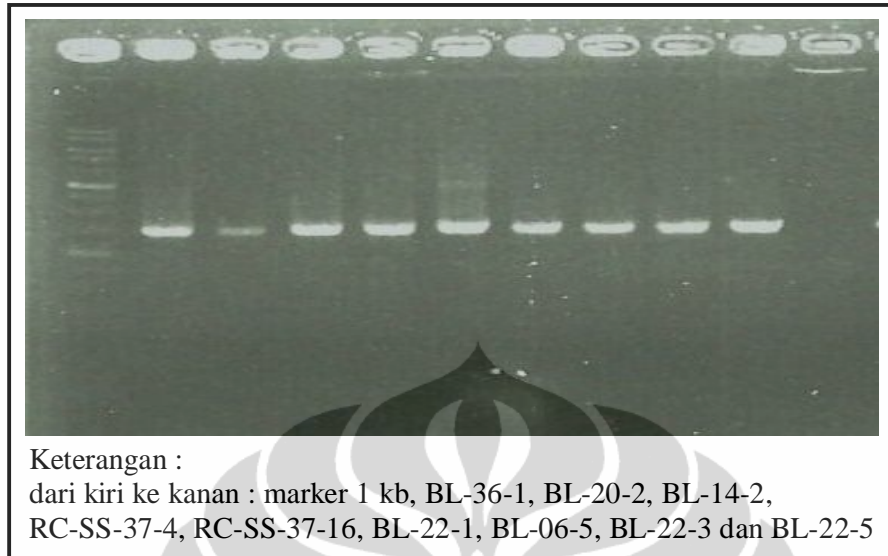
Analisis filogenetik menggunakan program Clustal X versi 1.83 (Thomson *et al.*, 1997). Konstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak kekerabatan genetik dengan metode *Neighbor joining* (Saitou & Nei 1987). Konstruksi jarak evolusi dalam derajat kepercayaan menggunakan *bootstrap value* pada program NJ plot dengan 1.000 replikasi *bootstrap* berdasarkan Felsenstein (1985). Spesies pembanding yang digunakan adalah spesies *type*. Data sekuen spesies *type* tersebut diperoleh dari RDP.

8. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat-isolat actinomycetes

Karakterisasi dilakukan terhadap sembilan isolat terseleksi yang telah di sekuensing. Karakterisasi yang dilakukan berupa pengamatan morfologi dan fisiologi. Karakterisasi morfologi dilakukan dengan mengamati ada tidaknya miselium *aerial*, bentuk spora, warna koloni, warna miselium, dan produksi pigmen, yang ditumbuhkan pada medium yang berbeda (YSA dan ISP2). Karakterisasi fisiologi dilakukan dengan mengamati suhu pertumbuhan, toleransi salinitas, toleransi pH, kemampuan asimilasi berbagai sumber karbon, kemampuan memproduksi enzim tertentu, dan aktivitas antimikroba. Kemampuan asimilasi karbon dan produksi enzim tertentu dilakukan dengan menggunakan *Api20[®] kit* (Biomérieux).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak sembilan isolat dengan aktivitas antimikroba tertinggi telah diseleksi untuk diidentifikasi. Isolat-isolat terseleksi tersebut dapat dilihat pada Lampiran 5. Pita hasil PCR sembilan isolat actinomycetes setelah dilakukan elektroforesis dapat dilihat pada Gambar II.1. DNA dari sembilan isolat dapat teramplifikasi semua berdasarkan elektroforesis hasil PCR yang telah dilakukan. Berdasarkan marker 1 kilobasa (1 kb) yang telah digunakan (Gambar II.1), terlihat bahwa semua DNA yang teramplifikasi memiliki panjang sekitar 1500 pasang basa (1500 bp). Hal tersebut sesuai dengan target identifikasi gen 16S rRNA, yaitu nukletida dengan panjang sekitar 1500 bp.



Gambar II.1. Hasil elektroforesis produk PCR gen 16S rRNA dari sembilan isolat actinomycetes terseleksi

Hasil sekuensing yang telah dilakukan menggunakan enam jenis primer menghasilkan panjang sekuen yang berbeda untuk tiap primer yang digunakan. Panjang sekuen untuk tiap primer berkisar antara 325 – 975 basa. Sekuen yang diperoleh untuk tiap primer telah disambung (*contiq*) untuk mendapatkan urutan hasil sekuen penuh dari gen 16S rRNA. Kalkulasi hasil sekuensing seperti pada Tabel II.1.

Tabel II.1. Kalkulasi panjang sekuen hasil sekuensing gen 16S rRNA terhadap sembilan isolat actinomycetes menggunakan enam primer yang berbeda

Kode Isolat	Panjang sekuen hasil sekuensing berdasarkan primer					
	20 F	520F	920F	520R	920R	1500R
BL-36-1	491	540	498	411	551	498
BL-20-2	492	490	465	410	462	476
BL-14-2	497	491	467	426	485	477
RC-SS-37-4	453	524	501	398	485	524
RC-SS-37-16	497	485	469	405	526	486
BL-22-1	325	353	333	673	384	369
BL-06-5	441	519	485	426	410	490
BL-22-3	462	508	462	382	454	487
BL-22-5	640	975	564	617	864	420

Hasil *contiq* yang telah dilakukan, diperoleh urutan sekuen dari sembilan isolat actinomycetes. Urutan sekuen tersebut dapat dilihat pada Lampiran 6 – 14. Panjang sekuen yang diperoleh berkisar 1400 bp. Identitas isolat actinomycetes telah diperoleh melalui BLAST berdasarkan urutan basa tersebut. Hasil identifikasi molekuler isolat actinomycetes pada Tabel II.2, sedangkan detail perbandingan dengan jenis lain berdasarkan nilai homologi terdapat pada Lampiran 15.

Tabel II.2. Hasil identifikasi gen 16 S rRNA isolat actinomycetes yang memiliki kemampuan antimikroba tertinggi

No	Kode isolat	Jumlah sekuen (bp)	Spesies identik	Persentase homologi
1	BL-36-1	1328	<i>Streptomyces mobaraensis</i> (T); NRRL B-3729T; DQ442528	95,2
2	BL-20-2	1454	<i>Streptomyces violarius</i> (T); NBRC 13104; AB184316	97,4
3	BL-14-2	1409	<i>Streptomyces kanamyceticus</i> (T); NRRL B-2535T; DQ442511	93,9
4	RC-SS-37-4	1404	<i>Streptomyces costaricanus</i> (T); NBRC 100773; AB249939	100
5	RC-SS-37-16	1453	<i>Streptomyces costaricanus</i> (T); NBRC 100773; AB249939	99,8
6	BL-22-1	1448	<i>Streptomyces labedae</i> (T); NBRC 15864; AB184704	94,6
7	BL-06-5	1515	<i>Streptomyces kunmingensis</i> (T); NRRL B-16240T; DQ442513	96,2
8	BL-22-3	1470	<i>Streptomyces parvulus</i> (T); NBRC 13193; AB184326	98,6
9	BL-22-5	1425	<i>Streptomyces badius</i> (T); NRRL B-2567; CSSP536; AY999783	98,9

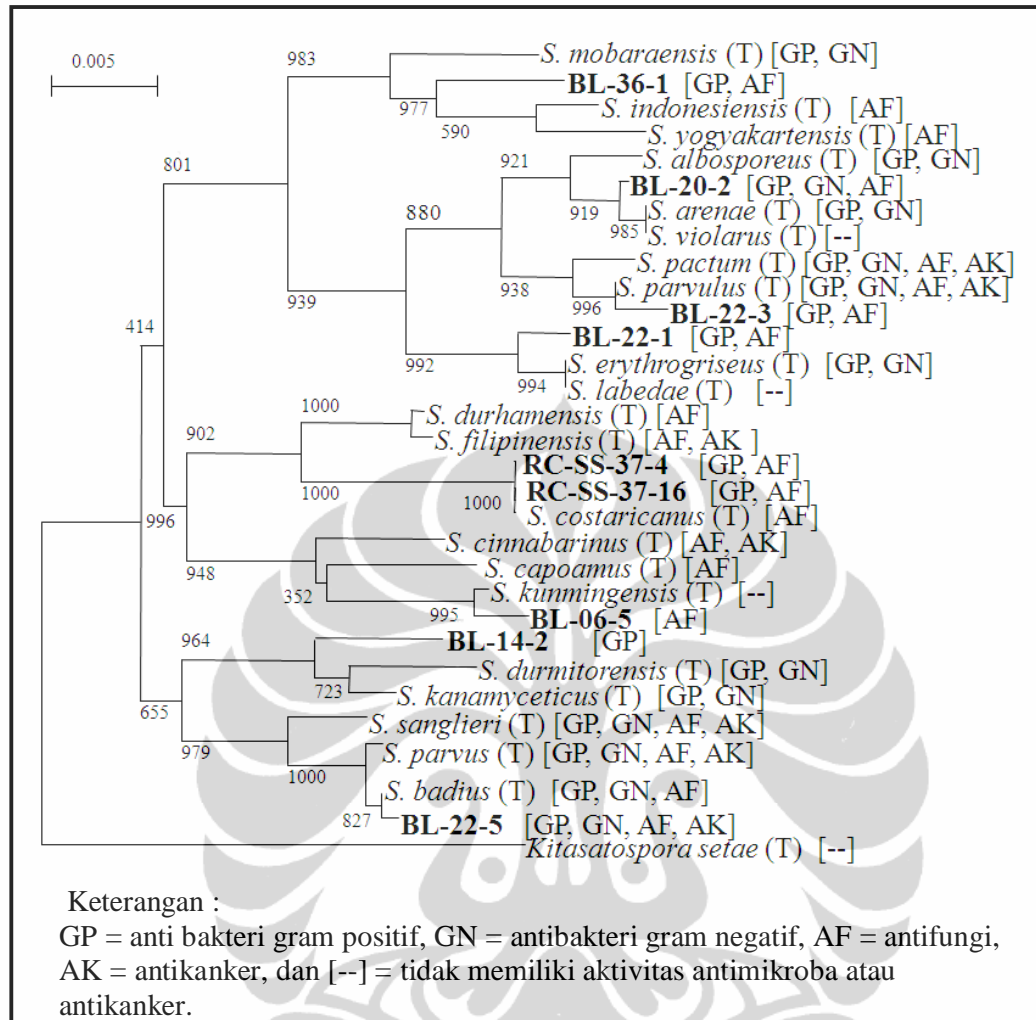
Berdasarkan hasil identifikasi gen 16S rRNA, sembilan isolat actinomycetes terseleksi masuk dalam genus *Streptomyces*. Sebanyak lima dari sembilan isolat merupakan kandidat spesies baru, karena memiliki persentase homologi terhadap strain *type* terdekatnya di bawah 98 %. Isolat tersebut adalah BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, BL-22-1, dan BL-06-5. Menurut Jauh-Hsun *et al.* (2002) dan Patel *et al.* (2004), nilai homologi 98 % atau kurang mengindikasikan spesies yang berbeda atau dapat dipertimbangkan sebagai spesies baru. Dalam beberapa kasus, actinomycetes dapat dikelompokkan menjadi spesies baru

walaupun homologi 16S rDNA di atas 98 %. Hal tersebut terjadi jika nilai homologi hibridisasi DNA-DNA rendah, atau kurang dari 70 % (Jauh-Hsun *et al.* 2002; Patel *et al.* 2004).

Konstruksi pohon filogenetik

Konstruksi pohon filogenetik yang menggambarkan hubungan kekerabatan antar spesies dapat dilakukan untuk mempermudah analisis hasil identifikasi. Konstruksi pohon filogenetik dalam penelitian ini digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan secara kladistik antar isolat actinomycetes terseleksi. Konstruksi pohon filogenetik dari sembilan isolat actinomycetes dapat dilihat pada Gambar II.2.

Analisis filogenetik pada Gambar II.2 menunjukkan bahwa sembilan isolat actinomycetes terpisah menjadi delapan kelompok. Isolat RC-SS-37-16 dan RC-SS-37-4 berada dalam satu cabang dengan spesies terdekatnya, *Streptomyces costaricanus* (T); NBRC 100773; AB249939. Isolat BL-22-3 berkerabat dekat dengan *Streptomyces parvulus* (T); NBRC 13193; AB184326. Isolat BL-22-5 berkerabat dengan *Streptomyces badius* (T); NRRL B-2567; CSSP536; AY999783. Isolat BL-36-1, BL-20-2, dan BL-22-1 secara filogenetik terpisah dengan spesies terdekatnya. Hasil analisis filogenetik menunjukkan hasil yang hampir sama dengan homologi sekuen DNA, lima isolat (BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, BL-22-1, dan BL-06-5) merupakan kandidat jenis baru berdasarkan *full sequence* gen 16S rRNA.



Gambar II.2. Pohon filogenetik sembilan isolat actinomycetes yang diidentifikasi berdasarkan *full sequence* gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi *bootstrap*

Gambar II.2 menunjukkan hampir semua *Streptomyces* yang digunakan sebagai pembanding dari sembilan isolat asal Raja Ampat memiliki aktivitas antimikroba. Beberapa isolat juga memiliki aktivitas antikanker. Data antimikroba dan antikanker dari spesies terdekat berdasarkan Goodfellow *et al.* (2011). Hal menarik terlihat pada Gambar II.2 adalah bahwa semua isolat yang memiliki aktivitas antikanker juga memiliki aktivitas antifungi. Hal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa yang dihasilkan mampu menghambat kelompok eukariota. Hasil studi dalam penelitian ini menunjukkan bahwa penapisan

antifungi dapat dilakukan untuk memperoleh senyawa antikanker dengan pertimbangan biaya yang lebih murah dan waktu yang lebih cepat. Nitiss dan Heitman (2007) menyatakan bahwa fungi, terutama kelompok khamir, dapat dijadikan model dalam penelitian antikanker.

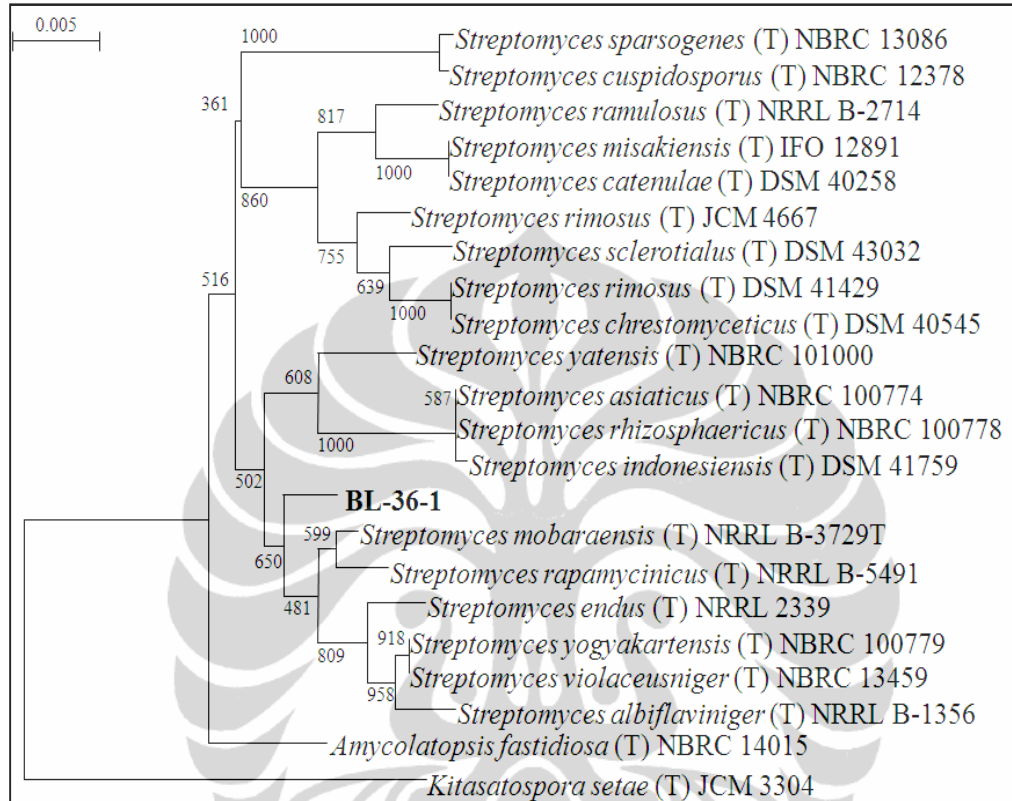
Penelitian ini menunjukkan bahwa isolat BL-22-5 memiliki aktivitas antikanker, antifungi dan antibakteri. Spesies terdekat dengan BL-22-5 yang berada dalam satu kelompok yang sama dalam satu pohon filogenetik memiliki aktivitas yang hampir sama (Gambar II.2). Secara umum semua spesies yang terdapat dalam satu kelompok dengan isolat BL-22-5 menghasilkan metabolit yang memiliki aktivitas spektrum luas terhadap sel prokariota dan eukariota. antifungi dan beberapa antikanker. Analisis filogenetik dapat menggambarkan hubungan kekerabatan, studi evolusi dan juga aktivitas biologi dari spesies yang berdekatan. *Streptomyces* yang saling berkerabat dekat mengindikasikan menghasilkan senyawa bioaktif yang sama atau mirip. Hal tersebut menunjukkan bahwa studi filogenetik yang telah dilakukan tidak hanya berperan dalam mengetahui hubungan kekerabatan terhadap spesies lain maupun perubahan evolusi dari nenek moyang bersama secara genetik. Analisis filogenetik dapat digunakan untuk mengelompokkan aktivitas biologi seperti antimikroba dan antikanker. Adanya senyawa aktif dapat dijadikan salah satu karakter kunci pada tingkatan taksonomi spesies tertentu.

Konstruksi pohon filogenetik dibuat terpisah sesuai dengan spesies terdekatnya dapat dilihat pada Gambar II.3 – II.11. Gambar tersebut dibuat lebih rinci dengan pembandingan masing-masing spesies terdekatnya dalam jumlah yang lebih banyak.

Karakterisasi isolat BL-36-1

Isolat BL-36-1 memiliki jarak kekerabatan yang relatif jauh dengan spesies terdekatnya berdasarkan analisis filogenetik pada Gambar II.3. Isolat BL-36-1 memiliki dua spesies terdekat, yaitu *Streptomyces mobaraensis* (T); NRRL B-3729T; DQ442528 dan *Streptomyces rapamycinicus* (T); NRRL B-5491; EF408733. Nilai homologi terhadap dua spesies terdekatnya tersebut pada gen

16S rRNA sebesar 95,2 % dan 94,3 %. Nilai tersebut berada jauh di bawah 98 %, yang mengindikasikan spesies yang berbeda.



Gambar II.3. Pohon filogenetik isolat BL-36-1 yang diidentifikasi berdasarkan *full sequence* gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi *bootstrap*

Spesies terdekat dari isolat BL-36-1 adalah *Streptomyces mobaraensis*. Spesies tersebut dapat menghasilkan *penicillin (V) acylase* yang berperan untuk mengkatalisis penicilin membentuk phenomethyl penisilin (penisilin V) (Bokhove *et al.*, 2010). Piericidin A, yang merupakan antibiotik spektrum luas, juga dihasilkan oleh *S. mobaraensis* (Masato & Seto 1970). Laporan tentang adanya aktivitas antifungal pada *S. mobaraensis* belum ditemukan. Berdasarkan penapisan yang telah dilakukan, Isolat BL-36-1 memiliki aktivitas dalam menghambat bakteri Gram positif (*B. subtilis*, *S. aureus*, *M. luteus*) dan khamir (*S. cerevisiae*).

Isolat BL-36-1 diisolasi dari sampel serasah di Pulau Batanta, Raja Ampat. Spesies terdekatnya, *S. mobaraensis* (T) NRRL B-3729T, diisolasi dari sampel tanah di Mobara city, Chiba, Jepang (NBRC 2005; NRRL 2012). Studi perbandingan telah dilakukan dengan melihat perbedaan karakter morfologi dan fisiologi antara isolat BL-36-1 dan spesies terdekatnya (Tabel II.3).

Tabel II.3. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-36-1 dan spesies terdekatnya, *S. mobaraensis* (T) NRRL B-3729T

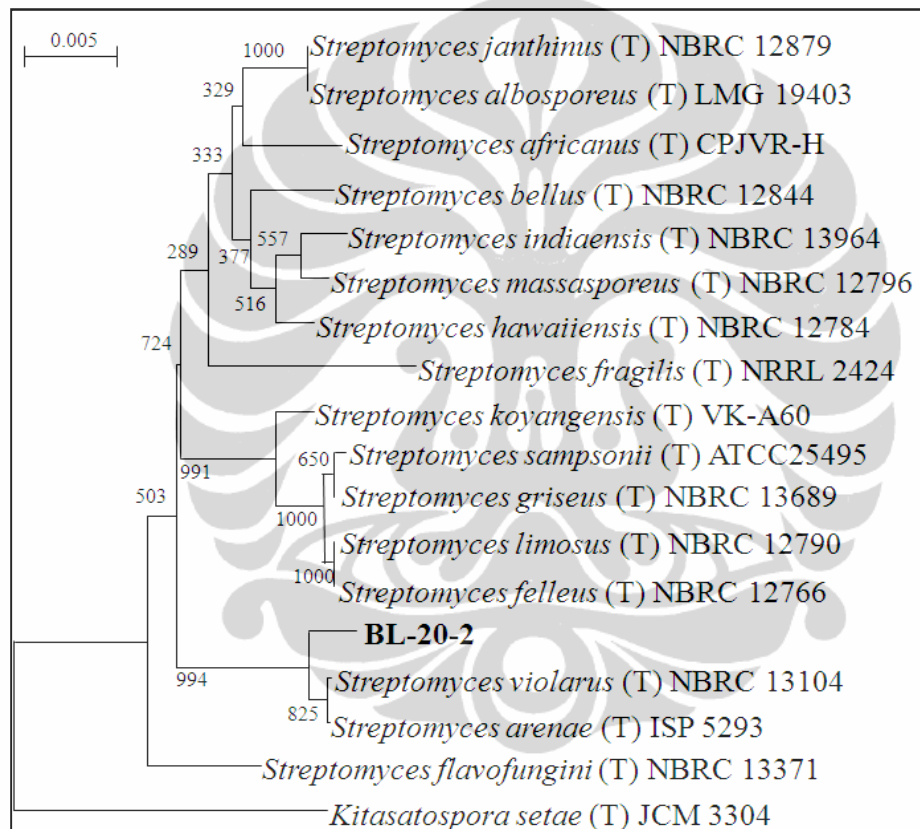
Karakter pembeda	Isolat BL-36-1	<i>S. mobaraensis</i> (T)*
Aktivitas antimikroba	anti Gram positif, antifungi	anti Gram positif, anti Gram negatif
<i>Aerial miselium</i>	ada	ada
Bentuk rantai spora	spiral	spiral
Medium YSA		
Warna koloni	abu-abu	kuning
Produksi pigmen	-	cokelat
Warna koloni bawah	abu-abu	abu-abu
Medium ISP-2		
Warna koloni	abu-abu	putih
Produksi pigmen	abu-abu	kuning
Warna koloni bawah	abu-abu	abu-abu
Suhu pertumbuhan	20 – 37 °C	20 – 37 °C
Toleransi salinitas	< 3 %	< 3 %
Toleransi pH	7 – 9	7 – 9
Asimilasi gula	glukosa, manitol, n-asetil glukosamin, maltose, glukonat	glukosa, manitol
Produksi enzim	arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase	arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase

Keterangan : *) data berdasarkan Holt *et al.* (1994).

Hasil analisis morfologi dan fisiologi pada Tabel II.3 menunjukkan bahwa isolat BL-36-1 memiliki beberapa karakter yang berbeda. Perbedaan tersebut pada warna koloni dan produksi pigmen dalam medium YSA dan ISP-2. Perbedaan juga terdapat pada kemampuan asimilasi gula. Berdasarkan perbedaan karakter dan persentase homologi gen 16S rRNA yang cukup rendah (< 98 %), isolat BL-36-1 dan *S. mobaraensis* diduga merupakan spesies yang berbeda.

Karakterisasi isolat BL-20-2

Isolat BL-20-2 memiliki kekerabatan yang relatif jauh dengan spesies terdekatnya berdasarkan analisis filogenetik seperti pada Gambar II.4. Dua spesies terdekat dari BL-20-2 adalah *Streptomyces violarius* (T); NBRC 13104 dan *Streptomyces arenae* (T); ISP 5293; AJ399485, dengan persentase homologi 97,4 % dan 95,2 %. Nilai homologi dari kedua spesies terdekatnya masih di bawah 98 %, sehingga BL-20-2 sebagai kandidat spesies baru.



Gambar II.4. Pohon filogenetik isolat BL-20-2 yang diidentifikasi berdasarkan *full sequence* gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi *bootstrap*

Isolat BL-20-2 menghasilkan metabolit yang memiliki aktivitas antimikroba. Hasil penapisan menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki spectrum luas untuk kelompok mikroba, yaitu antibakteri Gram positif, Gram negatif, dan antifungi. Sebaliknya, belum ditemukan laporan bahwa spesies

terdekatnya, *Streptomyces violarius*, memiliki aktivitas antimikroba. Kemampuan menghasilkan senyawa aktif bisa dijadikan salah satu karakter dalam identifikasi spesies. Wink (2011) menyatakan bahwa produksi senyawa aktif, termasuk antimikroba, merupakan karakter spesifik yang dimiliki oleh actinomycetes. Umumnya senyawa aktif baru dihasilkan oleh actinomycetes spesies baru atau sebaliknya.

Isolat BL-20-2 diisolasi dari sampel serasah di Pulau Batanta, Raja Ampat. Spesies terdekatnya, *Streptomyces violarius* (T) NBRC 13104, diisolasi dari sampel tanah pada tahun 1970 (NBRC, 2005). Studi pembandingan telah dilakukan dengan melihat perbedaan karakter morfologi dan fisiologi antara isolat BL-20-2 dan spesies terdekatnya, *S. violarius* (Tabel II.4).

Tabel II.4. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-20-2 dan spesies terdekatnya, *S. violarius* (T) NBRC 13104

Karakter pembeda	Isolat BL-20-2	<i>S. violarius</i> (T) *
Aktivitas antimikroba	anti gram negatif, anti Gram positif, antifungi	-
<i>Aerial miselium</i>	ada	ada
Bentuk rantai spora	spiral	spiral
Medium YSA		
Warna koloni	merah	merah
Produksi pigmen	-	-
Warna koloni bawah	oranye	merah
Medium ISP-2		
Warna koloni	cokelat	cokelat
Produksi pigmen	-	-
Warna koloni bawah	cokelat	cokelat
Suhu pertumbuhan	20 – 37 °C	20 – 37 °C
Toleransi salinitas	< 3 %	7 %
Toleransi pH	7 – 9	7 – 9
Asimilasi gula	glukosa, arabinosa, manitol, kaprat	glukosa, arabinosa, manosa, manitol, n-asetil glukosamin, maltosa, gluconat, kaprat, adipat, malat, sitrat, fenil alanin.
Produksi enzim	arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase	arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase

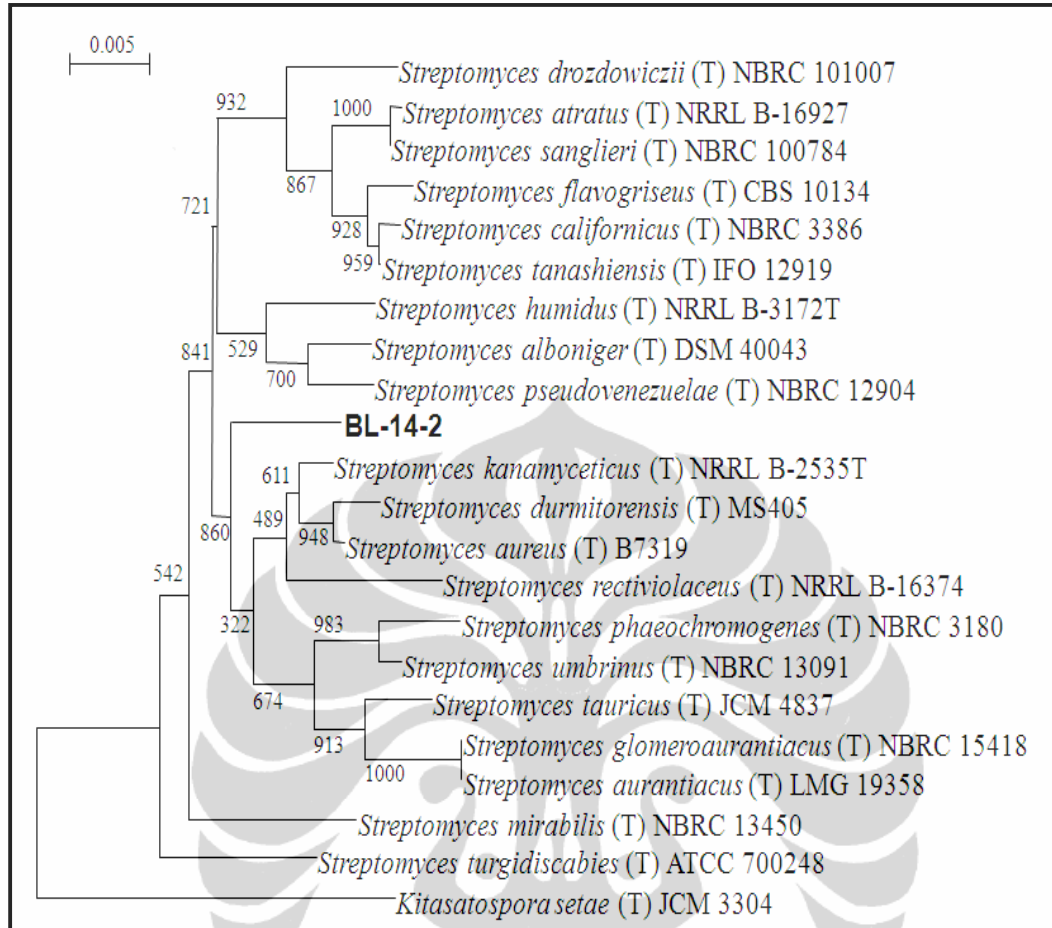
Keterangan : *) data berdasarkan Holt *et al.* (1994).

Isolat BL-20-2 dan spesies terdekatnya, *S. violarius*, memiliki banyak perbedaan karakter morfologi dan fisiologi (Tabel II.4). Isolat BL-20-2 memiliki aktivitas terhadap mikroba berupa anti Gram positif, Gram negatif, dan antifungi, sedangkan belum ditemukan laporan bahwa *S. violarius* memiliki aktivitas antimikroba. Isolat BL-20-2 hanya dapat hidup pada medium dengan salinitas di bawah 3 %, sedangkan spesies terdekatnya, *S. violarius*, memiliki toleransi salinitas sampai 7 %. Isolat BL-20-2 hanya mampu mengasimilasi glukosa, arabinosa, manitol, dan kaprat, sedangkan *S. violarius* mampu mengasimilasi lebih banyak sumber karbon dibandingkan dengan isolat BL-20-2 (Tabel II.4). Adanya perbedaan karakter tersebut menunjukkan bahwa isolat BL-20-2 merupakan kandidat spesies baru.

Karakterisasi isolat BL-14-2

Konstruksi pohon filogenetik pada Gambar II.5 menunjukkan bahwa isolat BL-14-2 terpisah jauh dari spesies-spesies terdekatnya. Spesies terdekat dari BL-14-2 adalah *Streptomyces kanamyceticus* (T); NRRL B-2535T; DQ442511, dengan homologi gen 16S rRNA 93,9 %. Berdasarkan konstruksi pohon filogenetik dan homologi gen 16S rRNA terlihat bahwa isolat BL-14-2 merupakan kandidat spesies baru.

Isolat BL-14-2 memiliki spesies terdekat dengan *Streptomyces kanamyceticus*. *Streptomyces kanamyceticus* memproduksi antibiotik kanamisin, yang memiliki aktivitas antibakteri dengan spektrum luas. Mekanisme kerja kanamisin adalah melakukan interaksi dengan subunit ribosom 30S yang mengakibatkan terhambatnya sintesis protein (Pestka 1975; Misumi & Tanaka 1980). Berdasarkan data penapisan yang diperoleh, isolat BL-14-2 menghasilkan metabolit yang hanya menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif.



Gambar II.5. Pohon filogenetik isolat BL-14-2 yang diidentifikasi berdasarkan *full sequence* gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi *bootstrap*

S. kanamyceticus (T) NRRL B-2535T merupakan spesies terdekat dengan isolat BL-14-2. Isolat tersebut pertama kali diisolasi dari tanah pada tahun 1961 di Nagano, Jepang (NBRC 2005). Isolat BL-14-2 diisolasi dari sampel serasah di Pulau Batanta, Raja Ampat. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-14-2 telah dilakukan. Karakter spesies terdekatnya, *S. kanamyceticus*, berdasarkan studi literatur dari Goodfellow *et al.* (2011) juga telah dilakukan. Hasil perbandingan karakter kedua isolat tersebut seperti pada Tabel II.5.

Tabel II.5. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-14-2 dan spesies terdekatnya, *S. kanamyceticus* (T) NRRL B-2535T

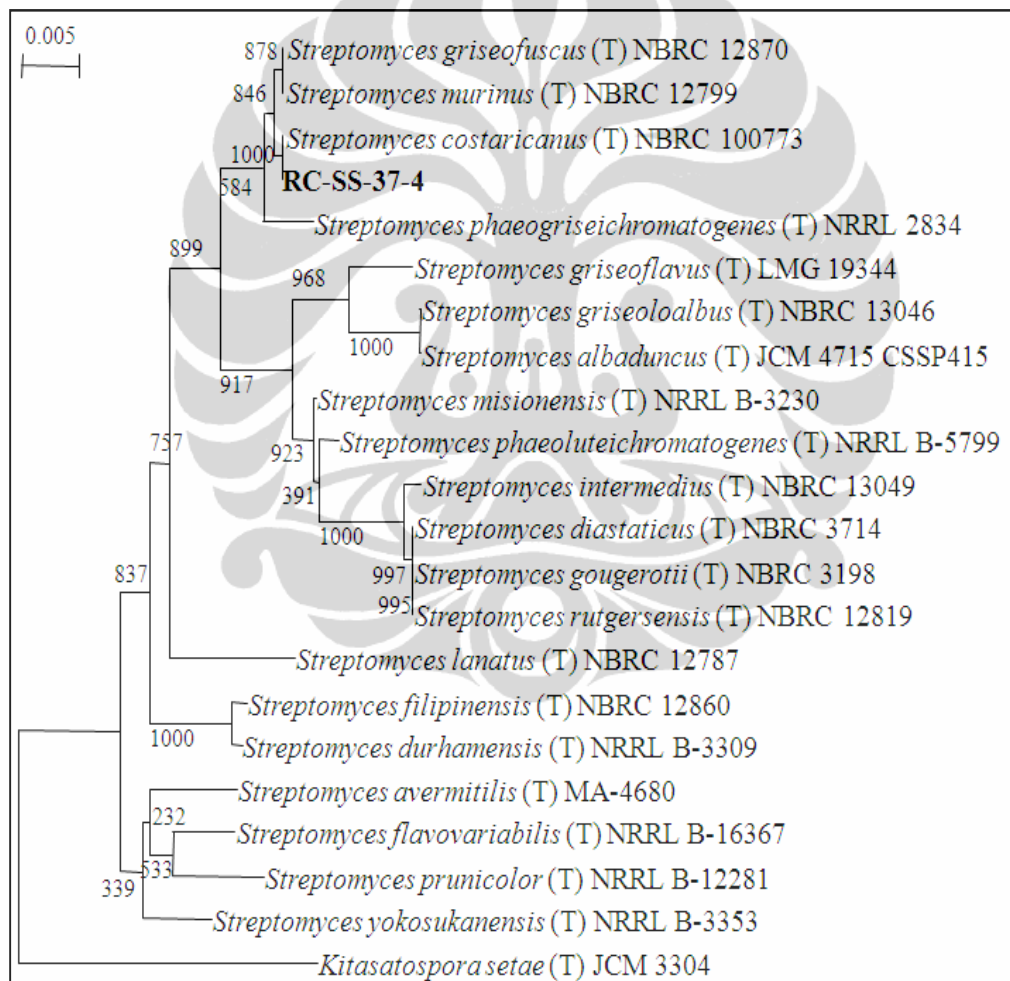
Karakter pembeda	Isolat BL-14-2	<i>S. kanamyceticus</i> (T) *
Aktivitas antimikroba	anti gram negatif, anti Gram positif	anti gram negatif, anti Gram positif
<i>Aerial miselium</i>	ada	ada
Bentuk rantai spora	<i>rectiflexibiles</i>	<i>rectiflexibiles</i>
Medium YSA		
Warna koloni	merah	kuning
Produksi pigmen	-	kuning
Warna koloni bawah	merah	putih
Medium ISP-2		
Warna koloni	merah	cokelat
Produksi pigmen	-	-
Warna koloni bawah	merah	cokelat
Suhu pertumbuhan	20 – 37 °C	20 – 37 °C
Toleransi salinitas	< 3 %	< 3 %
Toleransi pH	7 – 9	7 – 9
Asimilasi gula	glukosa, manitol, n-asetil glukosamin, maltosa, glukonat, kaprat, adipat, malat, citrat	glukosa, manitol, n-asetil glukosamin, maltosa, glukonat, kaprat, adipat, malat, citrat
Produksi enzim	arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase	arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase

Keterangan : *) data berdasarkan Goodfellow *et al.* (2011).

Isolat BL-14-2 memiliki kesamaan dengan spesies terdekatnya, *S. kanamyceticus*, berdasarkan karakter fisiologi yang dibandingkan (Tabel II.5). Walaupun demikian, karakter morfologi menunjukkan adanya perbedaan. Warna koloni dan produksi pigmen antara kedua isolat tersebut berbeda. Isolat BL-14-2 memiliki koloni berwarna merah pada medium YSA maupun ISP2. *Streptomyces kanamyceticus* memiliki koloni berwarna kuning pada medium YSA dan cokelat pada edium ISP 2 serta menghasilkan pigmen kuning. Walaupun hanya memiliki sedikit perbedaan morfologi dari karakter yang dibandingkan dengan spesies terdekatnya, isolat BL-14-2 memiliki homologi gen 16S rRNA yang rendah serta terpisah jauh secara filogenetik dengan *S. kanamyceticus*. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat BL-14-2 merupakan kandidat spesies baru.

Karakterisasi isolat RC-SS-37-4

Konstruksi pohon filogenetik pada Gambar II.6 menunjukkan bahwa isolat RC-SS-37-4 berkerabat dekat dengan *Streptomyces costaricanus* (T); NBRC 100773 dengan homologi gen 16S rRNA sebesar 100 %. Walaupun demikian, berdasarkan persamaan gen 16S rRNA, isolat RC-SS-37-4 juga memiliki homologi 100 % dengan *Streptomyces murinus* (T); NBRC 12799 dan *Streptomyces griseofuscus* (T); NBRC 12870. Namun analisis filogenetik menunjukkan bahwa RC-SS-37-4 lebih dekat dengan *Streptomyces costaricanus* (T); NBRC 100773.



Gambar II.6. Pohon filogenetik isolat RC-SS-37-4 yang diidentifikasi berdasarkan *full sequence* gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi *bootstrap*

Penelitian yang dilakukan oleh Esnard *et al.* (1995) menemukan adanya aktivitas antifungi dari *S. costaricanus*. Sampai saat ini, belum ditemukan laporan bahwa *S. costaricanus* memiliki aktivitas antibakteri. Isolat RC-SS-37-4 memiliki aktivitas antifungi terhadap khamir *S. cerevisiae* dan antibakteri Gram positif terhadap *M. luteus* dan *S. aureus*.

Isolat RC-SS-37-4 diisolasi dari sampel tanah di Pulau Salawati, Raja Ampat. Spesies terdekatnya, *Streptomyces costaricanus* (T) NBRC 100773, juga diisolasi dari sampel tanah di sekitar Nematoda, di wilayah Costarica (NBRC 2005). Studi perbandingan karakter morfologi dan fisiologi antara isolat RC-SS-37-4 terhadap spesies terdekatnya seperti pada Tabel II.6.

Hasil analisis morfologi dan fisiologi pada Tabel II.6 menunjukkan bahwa isolat RC-SS-37-4 memiliki karakter sangat mirip dengan *S. costaricanus*. Walaupun demikian, ada sedikit perbedaan pada pH pertumbuhan dan aktivitas antimikroba. *Streptomyces costaricanus* mampu tumbuh pada range pH luas (antara 3,5 sampai 9) sedangkan isolat RC-SS-37-4 memiliki toleransi pH pertumbuhan lebih sempit. Perbedaan tersebut diduga hanya merupakan bentuk adaptasi terhadap lingkungan tumbuh. Aktivitas enzim pada *S. costaricanus* tidak diukur pada penelitian yang dilakukan Esnard *et al.* (1995) dan juga tidak ditemukan pada penelitian atau pustaka lain. Persentase homologi yang tinggi (100 %) antara kedua isolat tersebut mendukung bahwa RC-SS-37-4 bukan merupakan spesies baru.

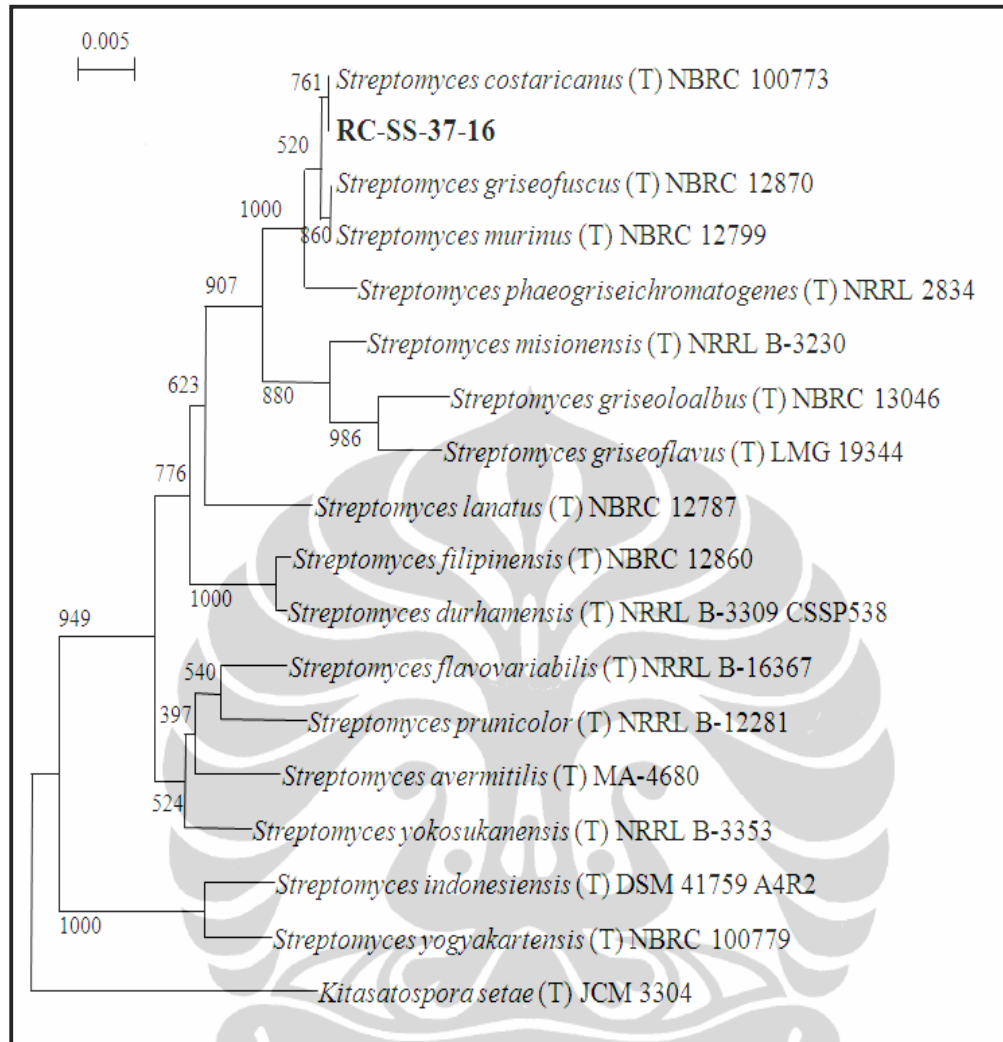
Tabel II.6. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat RC-SS-37-4 dan spesies terdekatnya, *S. costaricanus* (T) NBRC 100773

Karakter pembeda	Isolat RC-SS-37-4	<i>S. costaricanus</i> (T) *
Aktivitas antimikroba	anti Gram positif, antifungi	antifungi
<i>Aerial miselium</i>	ada	ada
Bentuk rantai spora	<i>spiral</i>	spiral
Medium YSA		
Warna koloni	abu-abu	abu-abu
Produksi pigmen	kuning	kuning
Warna koloni bawah	hitam	hitam
Medium ISP-2		
Warna koloni	putih	putih
Produksi pigmen	kuning	kuning
Warna koloni bawah	kuning	kuning
Suhu pertumbuhan	20 – 37 °C	20 – 37 °C
Toleransi salinitas	< 5 %	< 5 %
Toleransi pH	7 – 9	3,5 – 9
Asimilasi gula	glukosa, manosa, manitol, n-asetil glukosamin, maltose, glukonat, adipat, malat, fenil asetat	glukosa, manosa, manitol, n-asetil glukosamin, maltose, glukonat, adipat, malat, fenil asetat
Produksi enzim	arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase	Tidak diukur

Keterangan : *) data berdasarkan Esnard *et al.* (1995).

Karakterisasi isolat RC-SS-37-16

Analisis filogenetik pada Gambar II.7 menunjukkan bahwa isolat RC-SS-37-16 sangat dekat dengan *Streptomyces costaricanus* (T); NBRC 100773 dengan homologi 99,8 %. Persentase homologi yang tinggi (99,8 %) antara kedua isolat tersebut mendukung bahwa RC-SS-37-16 bukan merupakan spesies baru.



Gambar II.7. Pohon filogenetik isolat RC-SS-37-16 yang diidentifikasi berdasarkan *full sequence* gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi *bootstrap*

Isolat RC-SS-37-16 memiliki aktivitas antibakteri dan antifungi. Belum ditemukan laporan bahwa spesies terdekat dari RC-SS-37-16, *Streptomyces costaricanus*, memiliki aktivitas antifungi.

Isolat RC-SS-37-16 diisolasi dari sampel tanah di Pulau Salawati, Raja Ampat. Spesies terdekatnya, *Streptomyces costaricanus* (T) NBRC 100773, juga diisolasi dari sampel tanah habitat Nematoda, di wilayah Costa Rica pada tahun 1995 (NBRC 2005). Analisis karakter morfologi dan fisiologi antara kedua isolat tersebut seperti pada Tabel II.7.

Tabel II.7. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat RC-SS-37-16 dan spesies terdekatnya, *S. costaricanus* (T) NBRC 100773

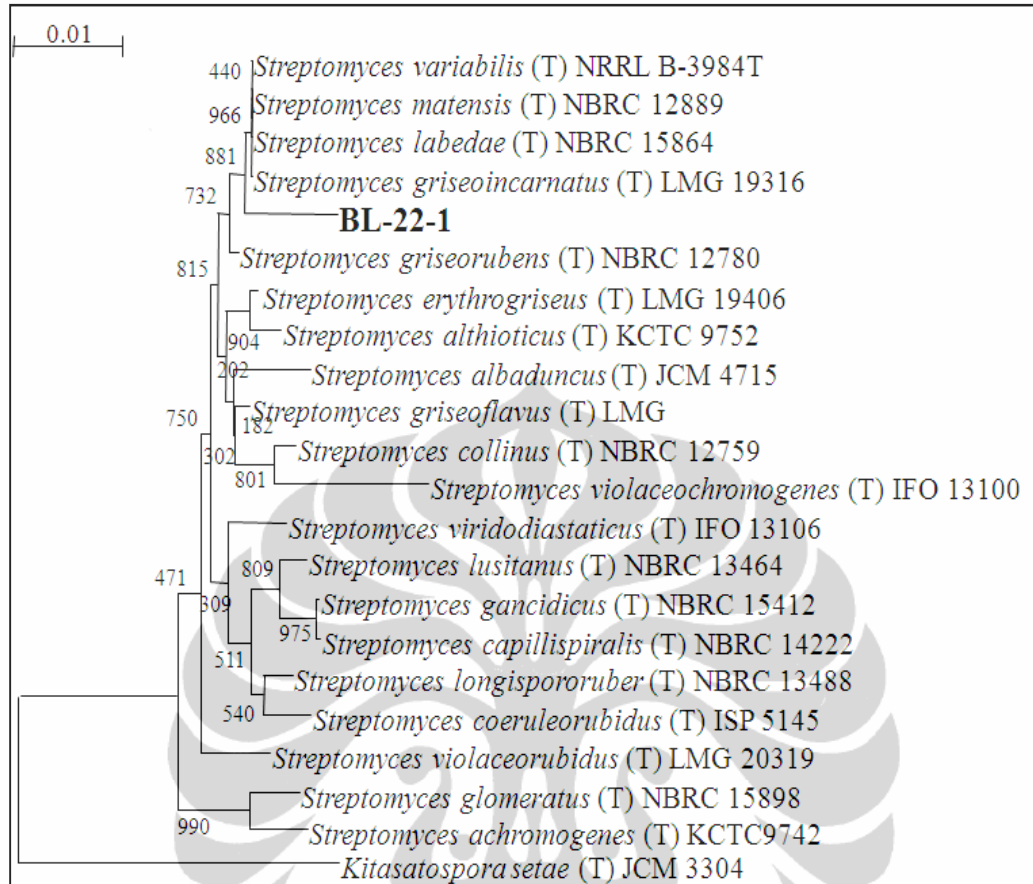
Karakter pembeda	Isolat RC-SS-37-16	<i>S. costaricanus</i> (T) *
Aktivitas antimikroba	anti Gram positif, antifungi	antifungi
<i>Aerial miselium</i>	ada	ada
Bentuk rantai spora	<i>spiral</i>	<i>spiral</i>
Medium YSA		
Warna koloni	abu-abu	abu-abu
Produksi pigmen	kuning	kuning
Warna koloni bawah	hitam	hitam
Medium ISP-2		
Warna koloni	putih	putih
Produksi pigmen	kuning	kuning
Warna koloni bawah	kuning	kuning
Suhu pertumbuhan	20 – 37 °C	20 – 37 °C
Toleransi salinitas	< 5 %	< 5 %
Toleransi pH	7 – 9	3,5 – 9
Asimilasi gula	glukosa, manosa, manitol, n-asetil glukosamin, maltose, glukonat	glukosa, manosa, manitol, n-asetil glukosamin, maltose, glukonat, adipat, malat, fenil asetat
Produksi enzim	arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase	Tidak diukur

Keterangan : *) data berdasarkan Esnard *et al.* (1995).

Hasil karakterisasi antara isolat RC-SS-37-6 menunjukkan kemiripan dengan isolat terdekatnya (*S. costaricanus*) dan juga isolat RC-SS-37-4. Sedikit perbedaan pada aktivitas antimikroba, toleransi suhu pertumbuhan dan asimilasi gula kemungkinan bukan merupakan faktor pembeda spesies. Hal tersebut karena isolat RC-SS-37-16 memiliki homologi gen 16S rRNA yang tinggi terhadap dua isolat terdekatnya, yaitu RC-SS-37-4 dan *S. costaricanus*.

Karakterisasi isolat BL-22-1

Isolat BL-22-1 secara filogenetik terpisah jauh dari spesies-spesies terdekatnya (Gambar II.8). Spesies terdekat dari isolat tersebut adalah *Streptomyces labedae* (T); NBRC 15864 dengan homologi gen 16S rRNA yang relatif rendah (94,6 %). Bukti ini dapat menjadi salah satu dasar bahwa BL-22-1 merupakan kandidat spesies baru.



Gambar II.8. Pohon filogenetik isolat BL-22-1 yang diidentifikasi berdasarkan *full sequence* gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi *bootstrap*

Isolat BL-22-1 diisolasi dari sampel serasah di Pulau Batanta, Raja Ampat. Spesies terdekatnya, *Streptomyces labedae* (T) NBRC 15864, diisolasi dari sampel tanah di kota New Mexico pada tahun 1987 (NBRC 2005). Karakterisasi antara kedua isolat tersebut seperti pada Tabel II.8. Sampai saat ini belum ditemukan publikasi yang melaporkan bahwa *Streptomyces labedae* memiliki aktivitas antibakteri dan antifungi. Isolat BL-22-1 memiliki aktivitas anti bakteri Gram positif dan antifungi.

Tabel II.8. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-22-1 dan spesies terdekatnya, *S. labedae* (T) NBRC 15864

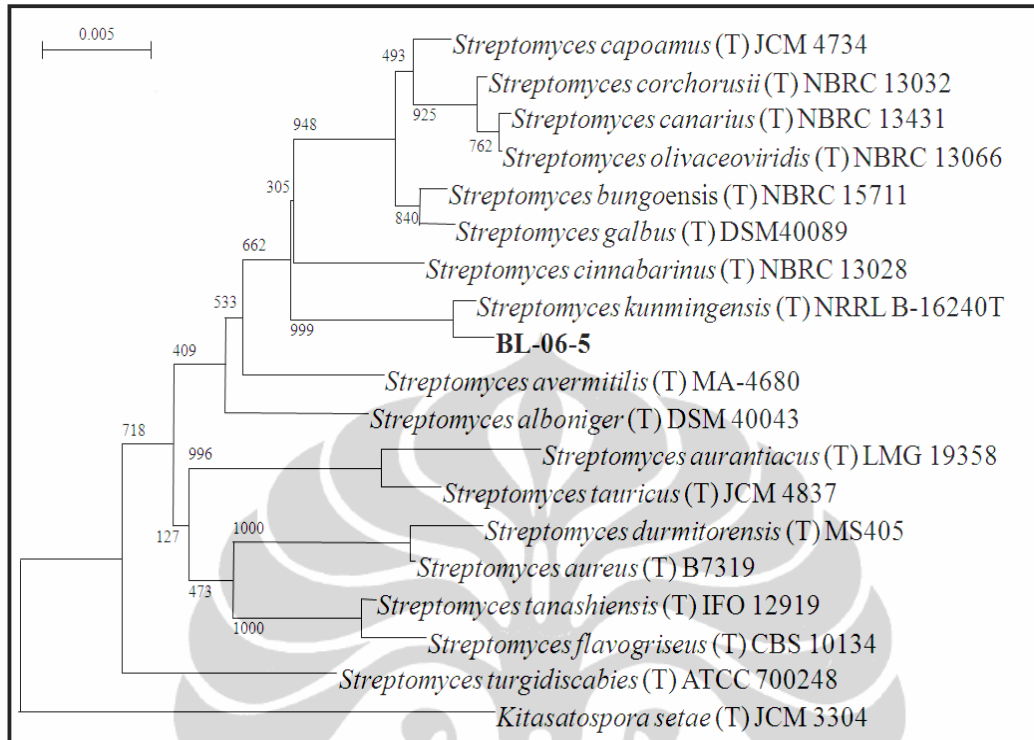
Karakter pembeda	Isolat BL-22-1	<i>S. labedae</i> (T) *
Aktivitas antimikroba	anti Gram positif, antifungi	-
<i>Aerial miselium</i>	ada	ada
Bentuk rantai spora	<i>spiral</i>	<i>spiral</i>
Medium YSA		
Warna koloni	kuning	putih
Produksi pigmen	-	kuning
Warna koloni bawah	kuning	putih
Medium ISP-2		
Warna koloni	kuning	putih
Produksi pigmen	-	kuning
Warna koloni bawah	kuning	putih
Suhu pertumbuhan	20 – 37 °C	20 – 37 °C
Toleransi salinitas	< 3 %	10 %
Toleransi pH	7 – 9	7 – 9
Asimilasi gula	glukosa, manosa, n-asetil glukosamin, maltose, glukonat, kaprat, adipat, malat, citrate	glukosa, arabinosa, manosa
Produksi enzim	arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase	arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase

Keterangan : *) data berdasarkan Lacey (1987).

Isolat BL-22-1 secara morfologi dan fisiologi memiliki banyak perbedaan dengan spesies terdekatnya, *S. labedae* (Tabel II.8). Perbedaan terdapat pada aktivitas antimikroba yang dihasilkan, warna koloni dan produksi pigmen, kemampuan asimilasi gula, dan toleransi salinitas. Perbedaan yang cukup banyak secara molekuler dan morfologi serta fisiologi dengan spesies terdekatnya tersebut memperkuat dugaan bahwa isolat BL-22-1 merupakan kandidat spesies baru.

Karakterisasi isolat BL-06-5

Berdasarkan analisis filogenetik, isolat BL-06-5 berkerabat dekat dengan *Streptomyces kunmingensis* (T); NRRL B-16240T (Gambar II.9). Walaupun demikian, nilai homologi gen 16S rRNA hanya sebesar 96,2 %. Isolat BL-06-5 merupakan kandidat spesies baru, jika analisis lain seperti hibridisasi DNA-DNA, uji kemotaksonomi, dan fisiologi menunjukkan perbedaan dengan spesies terdekatnya tersebut.



Gambar II.9. Pohon filogenetik isolat BL-06-5 yang diidentifikasi berdasarkan *full sequence* gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi *bootstrap*

Isolat BL-06-5 memiliki aktivitas antifungi dengan menghambat pertumbuhan *S. cerevisiae* dan *C. albicans*. Sampai saat ini belum ditemukan laporan adanya aktivitas antifungi dan antibakteri dari *Streptomyces kunmingensis*.

Isolat BL-06-5 diisolasi dari sampel serasah di Pulau Batanta, Raja Ampat. Spesies terdekatnya, *Streptomyces kunmingensis* (T) NRRL B-16240T, diisolasi dari sampel tanah pada tahun 1985 (NBRC 2005). Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-06-5 telah dilakukan. Analisis perbandingan antara isolat BL-06-5 dan spesies terdekatnya, *S. kunmingensis*, juga dilakukan (Tabel II.9).

Tabel II.9. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-06-5 dan spesies terdekatnya, *S. kunmingensis* (T) NRRL B-16240T

Karakter pembeda	Isolat BL-06-5	<i>S. kunmingensis</i> (T) *
Aktivitas antimikroba	antifungi	-
Aerial <i>miselium</i>	ada	ada
Bentuk rantai spora	<i>verticillate</i>	<i>verticillate</i>
Medium YSA		
Warna koloni	putih	putih
Produksi pigmen	cokelat	-
Warna koloni bawah	abu-abu	abu-abu
Medium ISP-2		
Warna koloni	cokelat	putih
Produksi pigmen	cokelat	-
Warna koloni bawah	cokelat	Cokelat
Suhu pertumbuhan	20 – 37 °C	20 – 37 °C
Toleransi salinitas	< 3 %	5 %
Toleransi pH	7 – 9	7 – 9
Asimilasi gula	glukosa, arabinosa, manosa, manitol, n-asetil glukosamin, maltose, glukonat, malat	Glukosa, arabinosa, manosa, manitol, n-asetil glukosamin, maltose, glukonat, malat
Produksi enzim	pengasaman glukosa, arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase	pengasaman glukosa, arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase

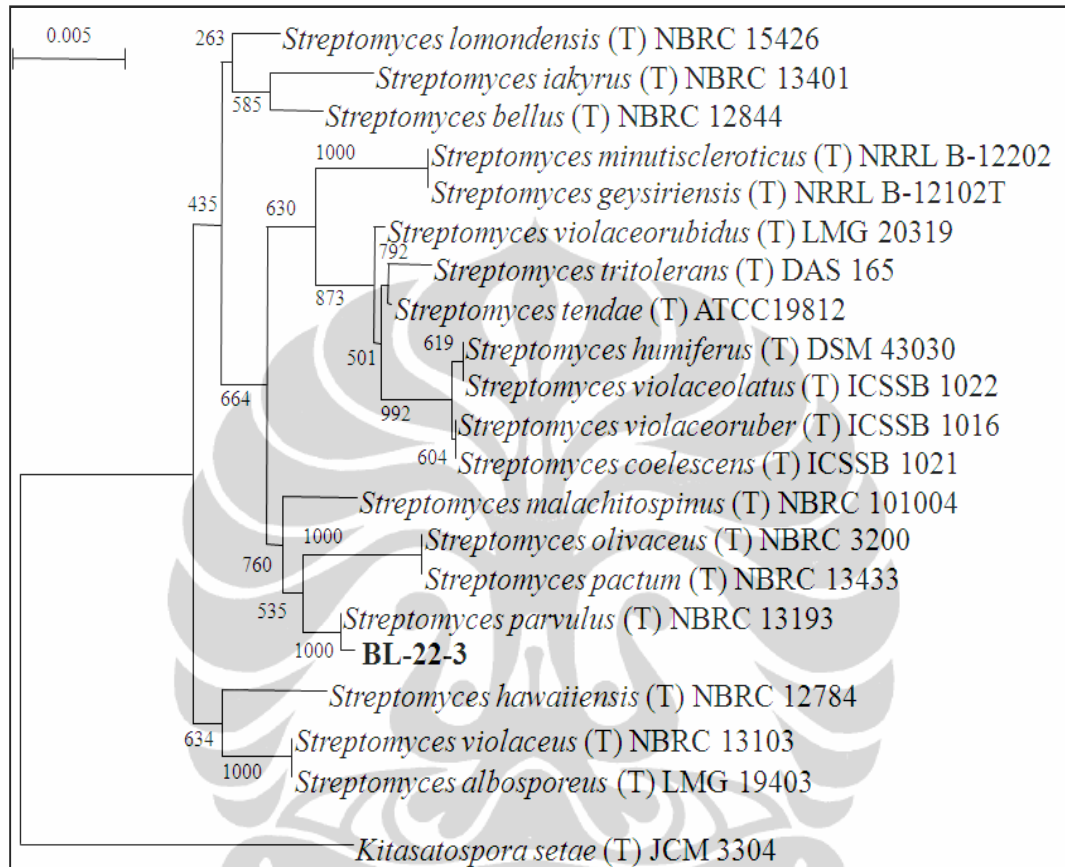
Keterangan : *) data berdasarkan Ruan *et al.* (1985).

Studi perbandingan isolat BL-06-5 dengan spesies terdekatnya, *S. kunmingensis* (Tabel II.9) menunjukkan terdapat beberapa perbedaan pada aktivitas antimikroba, warna koloni, produksi pigmen, dan toleransi salinitas. *Streptomyces kunmingensis* tidak memiliki aktivitas antimikroba, tidak menghasilkan pigmen yang larut pada medium agar, dan memiliki toleransi salinitas mencapai 5 %. Nilai homologi gen 16S rRNA yang rendah dan perbedaan karakter morfologi dan fisiologi antara isolat BL-06-5 dan *S. kunmingensis* mengindikasikan bahwa isolat BL-06-5 merupakan kandidat spesies baru.

Karakterisasi isolat BL-22-3

Streptomyces parvulus (T); NBRC 13193 merupakan spesies terdekat dengan isolat BL-22-3 berdasarkan sekuen gen 16S rRNA (Gambar II.10). Nilai homologi kedua isolat tersebut adalah sebesar 98,6 %. Persentase homologi yang

tinggi (98,6 %) antara kedua isolat tersebut mendukung bahwa BL-22-3 bukan merupakan spesies baru.



Gambar II.10. Pohon filogenetik isolat BL-22-3 yang diidentifikasi berdasarkan *full sequence* gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi *bootstrap*

Isolat BL-22-3 memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan khamir. *Streptomyces parvulus*, yang merupakan spesies terdekat dari BL-22-3, telah dilaporkan banyak menghasilkan senyawa antibakteri, antifungi dan juga anti kanker (Rahman *et al.* 2010; Usha *et al.* 2010). Actinomisin D merupakan antibiotik yang dihasilkan oleh *Streptomyces parvulus*, pertama kali diisolasi oleh Waksman dan Woodruff (1940). Senyawa tersebut selain sebagai antibiotik, juga digunakan sebagai antikanker (Turan *et al.* 2006; Khatua *et al.* 2004).

Isolat BL-22-3 diisolasi dari sampel serasah di Pulau Batanta, Raja Ampat. Spesies terdekatnya, *Streptomyces parvulus* (T) NBRC 13193, diisolasi dari sampel tanah pada tahun 1954 (NBRC 2005). Perbandingan karakter morfologi dan fisiologi antara isolat BL-22-3 dan *S. parvulus* telah dilakukan seperti pada Tabel II.10.

Tabel II.10. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-22-3 dan spesies terdekatnya, *S. parvulus* (T) NBRC 13193

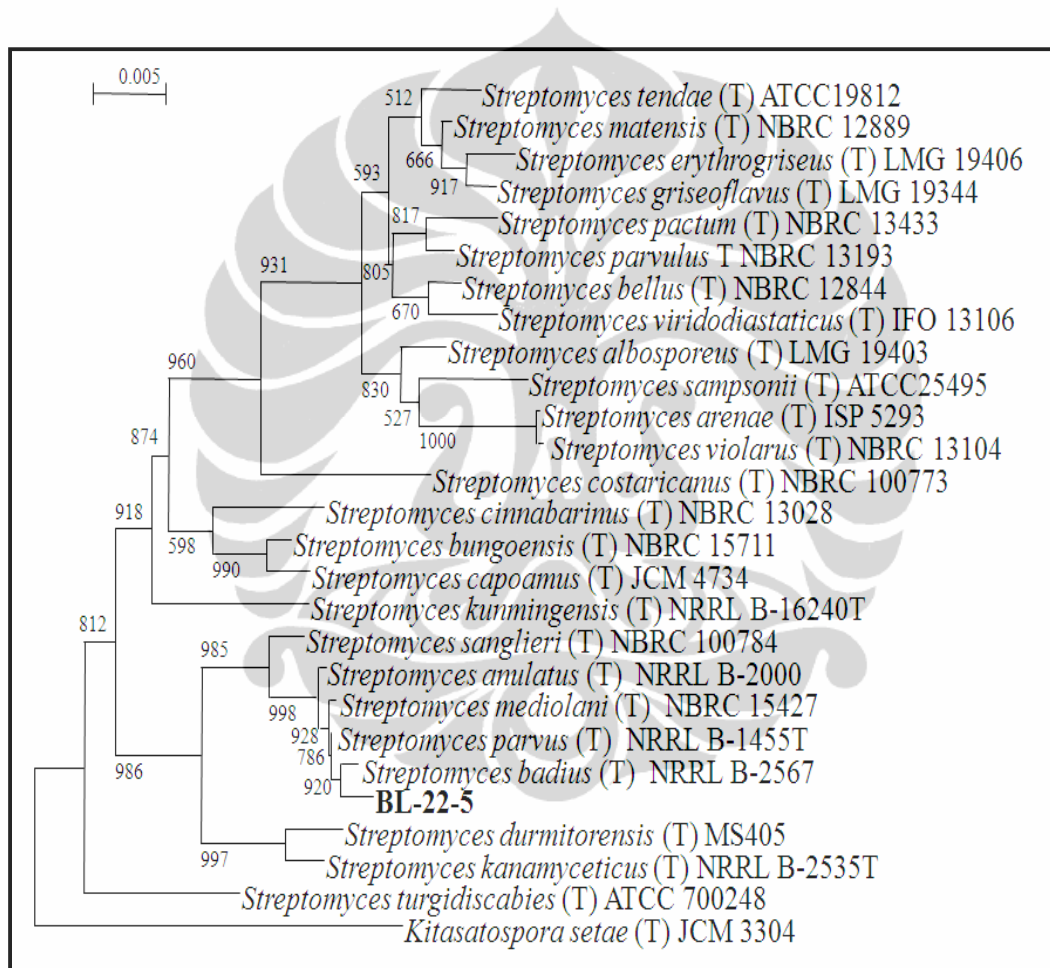
Karakter pembeda	Isolat BL-22-3	<i>S. parvulus</i> (T) *
Aktivitas antimikroba	anti Gram positif, antifungi	anti Gram positif, anti Gram negatif, antifungi
Aerial <i>miselium</i>	Ada	ada
Bentuk rantai spora	<i>Verticillate</i>	<i>verticillate</i>
Medium YSA		
Warna koloni	abu-abu	abu-abu
Produksi pigmen	kuning	kuning
Warna koloni bawah	abu-abu	abu-abu
Medium ISP-2		
Warna koloni	putih	putih
Produksi pigmen	-	-
Warna koloni bawah	putih	putih
Suhu pertumbuhan	20 – 37 °C	20 – 37 °C
Toleransi salinitas	< 5 %	< 5 %
Toleransi pH	7 – 9	7 – 9
Asimilasi gula	glukosa, arabinosa, manosa, manitol, n-asetil glukosamin, maltosa, maltose, glukonat, kaprat, adipat, malat, citrat	glukosa, arabinosa, manosa, manitol, n-asetil glukosamin, maltosa, maltose, glukonat, kaprat, adipat, malat, citrat
Produksi enzim	arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase	arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase

Keterangan : *) data berdasarkan Holt *et al.* (1994).

Isolat BL-22-3 memiliki kemiripan yang tinggi dengan spesies terdekatnya, *S. parvulus* (Tabel II.10) berdasarkan karakterisasi morfologi dan fisiologi. Walaupun demikian, terdapat sedikit perbedaan pada aktivitas antimikroba. Isolat BL-22-3 memiliki aktivitas anti bakteri Gram positif dan antifungi, sedangkan *S. parvulus* memiliki aktivitas yang lebih luas, yaitu anti bakteri Gram positif dan negatif dan juga antifungi.

Karakterisasi isolat BL-22-5

Spesies terdekat BL-22-5 berdasarkan persamaan gen 16S rRNA adalah *Streptomyces badius* (T); NRRL B-2567 dengan nilai homologi mencapai 98,9 %. Profil filogenetik pada Gambar II.11 menunjukkan bahwa isolat BL-22-5 berada dalam satu cabang yang sama dengan spesies terdekatnya, yaitu *Streptomyces badius* (T); NRRL B-2567 dengan nilai bootsrap mencapai 920. Hal ini menunjukkan bahwa isolat BL-22-5 bukan merupakan spesies baru.



Gambar II.11. Pohon filogenetik isolat BL-22-5 yang diidentifikasi berdasarkan *full sequence* gen 16S rRNA, metode Neighbor-Joining dengan 1.000 replikasi *bootstrap*

Metabolit yang diproduksi oleh isolate BL-22-5 mampu menghambat semua mikroba yang diujikan dalam penelitian ini. Spesies terdekatnya,

Streptomyces badius, memiliki aktivitas antibiotik dan antifungi (Debananda *et al.* 2011). Walaupun demikian, sampai saat ini belum ditemukan produk komersial antibakteri atau antifungi dari *S. badius*. Penelitian yang dilaporkan hanya terbatas pada uji antagonis terhadap mikroba patogen.

Isolat BL-22-5 diisolasi dari sampel serasah di Pulau Batanta, Raja Ampat. Spesies terdekatnya, *Streptomyces badius* (T) NRRL B-2567, diisolasi dari sampel tanah dari dekat kota Moscow, Rusia pada tahun 1958 (NBRC, 2005). Karakter morfologi dan fisiologi isolat BL-22-5 telah diamati, dan perbandingan karakter dengan isolat terdekatnya juga telah dilakukan (Tabel II.11).

Tabel II.11. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat BL-22-5 dan spesies terdekatnya, *S. badius* (T) NRRL B-2567

Karakter pembeda	Isolat BL-22-5	<i>S. badius</i> (T) *
Aktivitas antimikroba	anti Gram positif, anti Gram negatif, antifungi	anti Gram positif, anti Gram negatif, antifungi
Aerial <i>miselium</i>	ada	ada
Bentuk rantai spora	<i>Rectiflexibiles</i>	<i>Rectiflexibiles</i>
Medium YSA		
Warna koloni	kuning	cokelat
Produksi pigmen	kuning	kuning
Warna koloni bawah	kuning	kuning
Medium ISP-2		
Warna koloni	kuning	cokelat
Produksi pigmen	kuning	kuning
Warna koloni bawah	kuning	kuning
Suhu pertumbuhan	20 – 37 °C	20 – 37 °C
Toleransi salinitas	< 5 %	< 5 %
Toleransi pH	7 – 9	7 – 9
Asimilasi gula	glukosa, arabinosa, manosa, manitol, n-asetil glukosamin, maltosa, maltose, glukonat, adipat, malat, citrate	glukosa, arabinosa, manosa, manitol, n-asetil glukosamin, maltosa, maltose, glukonat, adipat, malat, citrat
Produksi enzim	arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase	arginin dehidrolase, urease, β -glukosidase, protease, β -galaktosidase

Keterangan : *) data berdasarkan Goodfellow *et al.* (2011).

Berdasarkan Tabel II.11 terlihat bahwa isolat BL-22-5 dan *S. badius* memiliki karakter morfologi dan fisiologi yang sama. Kedekatan karakter tersebut didukung dengan tingginya nilai homologi gen 16S rRNA antar kedua isolat. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat BL-22-5 bukan merupakan spesies baru.

Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat actinomycetes

Berdasarkan hasil observasi karakter morfologi dan fisiologi seperti pada Tabel II.3 – II.11 dan Lampiran 16, diketahui bahwa sembilan isolat terpilih memiliki karakter yang berbeda. Semua isolat memiliki kemampuan memproduksi metabolit yang bersifat sebagai antimikroba, namun selektif terhadap jenis mikroba tertentu, seperti isolat BL-14-2 hanya memiliki aktivitas antibakteri dan satu isolat BL-06-5 hanya memiliki aktivitas antifungi. Tujuh isolat yang lain memiliki aktivitas antibakteri dan antifungi. Semua isolat memiliki *aerial* miselium tetapi memiliki bentuk rantai spora yang berbeda, yang dikategorikan menjadi empat bentuk.

Actinomycetes asal Raja Ampat dapat menghasilkan pigmen, warna koloni, dan miselium yang berbeda jika ditumbuhkan pada medium yang berbeda (ISP-2 dan YSA). Hal tersebut menunjukkan bahwa perbedaan komposisi medium dapat mempengaruhi sebagian karakter morfologi dari actinomycetes. Semua isolat memiliki toleransi suhu dan pH pertumbuhan yang sama, yaitu 20-37 °C dan 7-9. Toleransi salinitas bervariasi, namun tidak lebih dari 3 %. Kemampuan asimilasi gula menunjukkan profil yang berbeda untuk setiap isolat, tidak ada isolat yang memiliki kemampuan menggunakan jenis gula yang sama. Uji produksi enzim menunjukkan hasil yang positif. Pada kemampuan pengasaman glukosa, semua tidak aktif kecuali isolat BL-06-5.

Berdasarkan analisis filogenetik dan hasil identifikasi, isolat RC-SS-37-4 dan RC-SS-37-16 merupakan spesies yang sama. Kedua isolat tersebut teridentifikasi sebagai *Streptomyces costaricanus*. Analisis *alignment* menggunakan program Clustal X 2.0.11 dan *BLAST 2 sequences* pada *NCBI gene bank* menunjukkan tidak terdapat perbedaan nukleotida antara kedua isolat dengan homologi sebesar 100 %. Data karakter antara kedua isolat tersebut hampir sama. Walaupun demikian terdapat sedikit perbedaan pada karakter fisiologi, yaitu isolat RC-SS-37-16 dapat menghambat *B. subtilis* sedangkan RC-SS-37-4 tidak dapat. Isolat RC-SS-37-4 mampu mengasimilasi adipat, malat, dan fenil asetat, sedangkan isolat RC-SS-37-16 tidak mampu mengasimilasi gula tersebut. Sedikit perbedaan karakter antar kedua isolat kemungkinan hanya menunjukkan

perbedaan pada level strain, sedangkan spesiesnya tetap sama, yaitu *Streptomyces costaricanus*.

Dugaan bahwa isolat RC-SS-37-4 dan RC-SS-37-16 adalah satu spesies, namun kemungkinan berbeda strain atau sub spesies didukung oleh data penelitian lain. Penelitian yang dilakukan oleh Esnard *et al.* (1995) menyatakan bahwa actinomycetes dalam satu spesies dapat memiliki karakter morfologi dan fisiologi yang berbeda, seperti yang terjadi pada *S. hygrosopicus* dan *S. hygrosopicus* subsp. *decoyinus*. Kedua spesies *S. hygrosopicus* tersebut memiliki perbedaan warna koloni, kemampuan asimilasi gula, toleransi salinitas dan pH, serta resistensi beberapa jenis antibiotik. Walaupun demikian, sekuen gen 16S rRNA kedua isolat tersebut identik.

Ada banyak metode yang harus dilakukan untuk memecahkan persoalan identifikasi yang kompleks dan deskripsi spesies baru. Analisis kemotaksonomi dan fisiologi yang biasa digunakan dalam identifikasi adalah tipe *diamino acid* dinding sel, tipe murein, tipe menaquinon, mol G+C, ada tidaknya *mycolic acid*, dan komposisi asam lemak dinding sel atau *fatty acid methyl ester* (FAME) (Embley & Stackebrandt 1994; Miyadoh 1997). Hibridisasi DNA-DNA dengan spesies terdekat sangat diperlukan untuk mengetahui identitas pasti dari isolat yang diperoleh (Jauh-Hsun *et al.* 2002; Patel *et al.* 2004). Pendekatan *multilocus gene* juga diperlukan untuk pembeda antar spesies (Embley & Stackebrandt 1994).

Studi filogenetik yang telah dilakukan terhadap isolat actinomycetes tidak hanya berperan dalam mengetahui hubungan kekerabatan terhadap spesies lain maupun perubahan evolusi dari nenek moyang bersama secara genetik. Analisis filogenetik dapat digunakan untuk mengelompokkan aktivitas biologi seperti antimikroba dan antikanker. Adanya senyawa aktif dapat dijadikan salah satu karakter kunci pada tingkatan taksonomi spesies tertentu. Hal tersebut dapat mempermudah pencarian senyawa aktif berdasarkan kedekatan kekerabatan secara taksonomi.

KESIMPULAN

Berdasarkan identifikasi menggunakan pendekatan molekuler gen 16S rRNA *full sequence* dan karakterisasi morfologi serta fisiologi, sembilan isolat yang memiliki aktivitas antimikroba termasuk dalam genus *Streptomyces*. Isolat-isolat tersebut teridentifikasi dalam delapan spesies. Isolat RC-SS-37-4 dan RC-SS-37-16 teridentifikasi sebagai *Streptomyces costaricanus*, namun kemungkinan berbeda sub spesies. Isolat BL-22-3 dan BL-22-5 teridentifikasi sebagai *Streptomyces parvulus* dan *Streptomyces badius*. Terdapat lima isolat yang merupakan kandidat spesies baru, yaitu *Streptomyces* sp. BL-36-1 (95,2 %), *Streptomyces* sp. BL-20-2 (97,4 %), *Streptomyces* sp. BL-14-2 (93,9 %), *Streptomyces* sp. BL-22-1 (94,6 %), dan *Streptomyces* sp. BL-06-5 (96,2 %).

SARAN

Penelitian tentang deskripsi dan validasi dapat dilakukan terhadap lima isolat actinomycetes yang mengindikasikan kandidat spesies baru. Analisis paling penting adalah hibridisasi DNA-DNA dengan menggunakan spesies terdekat. Analisis pendukung lain seperti uji biokimia, sesuai standar deskripsi spesies baru, juga perlu dilakukan. Analisis senyawa dari actinomycetes yang teridentifikasi sebagai kandidat spesies baru perlu dilakukan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA Pusat Penelitian Biologi LIPI, kementerian Riset dan Teknologi, dan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Ucapan terimakasih kami ucapkan kepada Mashohito Suzuki, Tomohiko Tamura dari NBRC Jepang atas diskusi molekuler yang intensif. Terimakasih juga disampaikan kepada Dian Alfian dari Puslit Biologi LIPI, atas bantuan selama sekuensing.

DAFTAR ACUAN

- Avise, J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman & Hall.
- Baxevanis, A.D. & Oulette, B.F.E. 1998. *Bioinformatics : a practical guide to the analysis of genes and proteins*. A John Wiley and Sons Inc., London.
- Bokhove, M., P.N. Jimenez, W.J. Quax & B.W. Dijkstra. 2010. The quorum-quenching N-acyl homoserine lactone acylase PvdQ in an Ntn-hydrolase with an unusual substrate-binding pocket. *Journal Natural Science* **107**(2): 686--691.
- Cavalli-Sforza, L.L. & Balfourier. 1997. Phylogenetic analysis : model and estimation procedures. *Journal Human Genetetic* **19**: 122--257.
- Embley T. M. & E. Stackebrandt. 1994. The Molecular Phylogeny and Systematics of the Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* **48**: 257--289.
- Esnard, J., N.M. Mandoza & B.M. Zuckerman. 1998. Effect of three microbial broth cultures an organic amendment on growth and populations of free living and plant-parasitic nematoda on banana. *European Journal of Plant Phatology* **104**(5): 457--463.
- Esnard, J., T.L. Potter & B.M. Zuckerman. 1995. *Streptomyces costaricanus* sp. nov., isolated from Nematode-suppressive soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **5**(4): 775--779.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limitson phylogenies: an approach using the *bootstrap*. *Journal Organism Evolution* **39**: 783--789.
- Goodfellow, M., P. Kämpfer, H.J. Busse, M.E. Trujillo, K.I. Suzuki, W. Ludwig & W.B. Whitman. 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition volume 5*. Springer, New York.
- Higashide, E. 1995. Screening of new antibiotics produced by actinomycetes and their production. *Journal Actinomycetology* **9**(1): 75--82.

- Holt, G.H., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley & S.T. Williem. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology 9th edition*. Williams & Wilkins, USA.
- Jauh-Hsun, C., T. Vinh, J.K. Davies & D. Figdor. 2002. Molecular approaches to the differentiation of Actinomycetes spesies. *Journal of Molecular Oral Microbiology* **14**: 250--256.
- Khatua, S., C. Nair & C. Ghosh. 2004. Imune-mediated thrombocytopenia following dactinomycin therapy in a child with alveolar rhabdomyosarcoma : the unresolved issues. *Journal Pediatrics Hematology Oncology* **26**(11): 777--779.
- Koonin, E.V. 2003. Comparative genomics, minimal gene-sets and the last common universal ancestor. *Natural Review of Microbiology* **1**: 127--136.
- Kurtboke, I. 2001. *Selective isolation of rare Actinomycetes*. Queensland, Australia.
- Lacey, J. 1987. Nomenclature of *Saccharopolyspora erythraea* Labeda 1987 and *Streptomyces erythreus* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1948, and proposals for the alternative epithet *Streptomyces labedae* sp. nov. *International Journal Systematic of Bacteriology* **37**: 458--462.
- Madigan, M.T., J.M. Martiko & J. Parker. 2003. *Biology of Microorganisms. Tenth Edition*. Pearson Education, Inc. USA.
- Masato, T & H. Seto. 1970. Biosynthetic studies with carbon-13, Piericidin. *Journal Organic Chemistry* **35**(6): 2087--2088.
- Misumi, M. & N. Tanaka. 1980. Mechanism of inhibition of translocation by kanamycin and viomycin : a comparative study with fusidic acid. *Journal Biochemistry Biophysiology Research Community* **92**: 647--654.
- Miyadoh, S. 1997. *Atlas of Actinomycetes*. Asakura Publishing Co Ltd. Japan.
- Miyadoh, S. 1997. *Atlas of Actinomycetes*. Asakura Publishing Co Ltd. Japan.
- NBRC. 2005. Kataloque of biological resources. *Microorganism, Genomic DNA clones and cDNAs 1st edition*. NIITE, Chiba, Japan.
- Nitiss, J.L. & J. Heitman. 2007. *Khamir as a tool in cancer research*. Springer press, Dorderecht, Netherland.

- Nurkanto, A., F. Listyaningsih, H. Julistiono & A. Agusta. 2010. Eksplorasi keanekaragaman Actinomycetes tanah Ternate sebagai sumber antibiotik. *Jurnal Biologi Indonesia* **6**(3): 325--339.
- Palys, T., L.K. Nakamura & F.M. Cohan. 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* **47**: 1145--1156.
- Patel, J.B., R.J. Wallace Jr., B.A. Cokelat-Elliott, T. Taylor, C. Imperatrice, D.B.G. Leonard, R.W. Wilson, L. Mann, K.C. Jost & I. Nachamkin. 2004. Sequence-based identification of aerobic Actinomycetes. *Journal Clinical microbiology* **42**(6): 2530--2540.
- Pestka, S. 1975. The use of inhibitors in studies of protein synthesis. *Journal Methods of enzymology* **30**: 261--282.
- Pitcher, D.G., N.A. Saunders & R.J. Owen. 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with Guanidium thiocyanate. *Journal Letter Applied Microbiology* **8**: 108--114.
- Rahman, M.A., M.Z. Islam, P. Khondkar & M.A. Ul-Islam. 2010. Characterization and antimicrobial activities of polypeptide antibiotic isolated from a new strain of *Streptomyces parvulus*. *Bangladesh Pharmacy Journal* **13**(1): 14--17.
- Ruan, J., M. P. Lechevalier, C. Jiang & H.A. Lechevalier. 1985. *Chainia kunmingensis*, a new actinomycete species found in soil. *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**: 164--168.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The Neighbor-Joining method : a new method for reconstruction phylogenetic tree. *Journal Molecular Biology Evolution* **4**: 406--425.
- Santos, S.R. & H. Ochman. 2004. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and protein. *Journal Environmental Microbiology* **6**: 754--759.
- Suriyachadkun, C., S. Chunhametha, T. Tamura, C. Thawai, W. Potacharoen, K. Kirtikara & J.J. Sanglier. 2010. *Planotetraspora thailandica* sp. nov.,

- isolated from soil in Thailand. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**(9): 2076--2081.
- Takisawa, M., R.R. Colwel & R.T. Hill. 1993. Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake bay. *Journal Applied Environmental Microbial* **59**: 997--1002.
- Techaoei, S., S. Lumyong, W. Prathumpai, D. Santiarwarn & P. Leelapornpisid. 2011. Screening Characterization and Stability of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* SCMU106 Isolated from Soil in Northern Thailand. *Asian Journal of Biological Sciences* **4**: 340--351.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak & D.G. Higgins. 1997. Clustal X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Journal Nucleic Acids Reserach* **25**: 4876--4882.
- Turan, T., O. Karacay, G. Tulunay, N. Boran, K.S. Bozok & M. Kose. 2006. Results with EMA/CO (etoposide, methotrexate, actinomycin D, cyclophosphamide, vincristine) chemotherapy in gestational trophoblastic neoplasia. *International Journal Gynecology Cancer* **16**(3): 1432--1438.
- Usha, R., P. Anaathaselvi, C.K. Venil & M. Palaniswamy. 2010. Antimicrobial and antiangiogenesis activity of *Streptomyces parvulus* KUAP106 from mangrove soil. *European Journal of Biological Science* **2**(4): 77--83.
- Waksman, S.A. & H.B. Woodruff. 1940. Bacteriostatic and bacteriocidal substances produced by soil actinomycetes. *Journal Society Expert Biology* **45**: 609--614.
- Wink, J. 2011. How can actinomycete taxonomy and natural product research work together? The Sanofi-Aventis approach. *Journal Microbiology Australia* **5**: 81--85.
- Yukphan, P., W. Potacharoen , S. Tanasupawat, M. Tanticharoen, & Y. Yamada. 2004. *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 313--316.

DISKUSI PARIPURNA

Penapisan antimikroba dilakukan terhadap 100 isolat actinomycetes terseleksi. Pemilihan isolat actinomycetes untuk penapisan didasarkan pada pengamatan morfotipe. Perbedaan morfotipe pada actinomycetes dapat menjadi salah satu ciri perbedaan spesies (Miyadoh 1997; Madigan *et al.* 2003). Diketahui bahwa morfologi actinomycetes paling bervariasi dibandingkan dengan kelompok bakteri yang lain (Kurtboke 2001; Goodfellow *et al.* 2011). Seleksi morfotipe didasarkan pada warna koloni, bentuk koloni, produksi pigmen, dan bentuk spora yang dihasilkan. Hal tersebut perlu dilakukan untuk meminimalisasi adanya duplikasi isolat. Seleksi yang dilakukan diharapkan bahwa isolat yang digunakan berasal dari jenis atau strain yang berbeda, sehingga dapat memberikan gambaran tentang profil aktivitas antimikroba metabolit actinomycetes yang berasal dari Raja Ampat. Hal tersebut dianggap penting karena belum ada laporan tentang aktivitas antimikroba dari actinomycetes asal Raja Ampat, sehingga hasil dari penelitian ini merupakan informasi pertama.

Hasil penapisan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak organik lebih aktif dibanding dengan ekstrak air. Senyawa aktif tersebut secara umum bersifat kompleks sehingga kelarutan dalam air rendah. Senyawa aktif yang larut dalam air jumlahnya sedikit atau terbatas. Eloff (1998) menyatakan bahwa senyawa yang memiliki aktivitas antimikroba sebagian besar tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik. Cowan (1999) menyatakan beberapa kelompok senyawa aktif seperti fenol, terpenoid, alkaloid, lektin, polipeptida, poliasetilen, hanya sebagian kecil fenol dan polipeptida saja yang larut dalam pelarut polar atau air.

Diantara keseluruhan jenis actinomycetes yang telah diskriming aktivitas biologinya, isolat BL-22-5 memperlihatkan potensi yang lebih baik dibandingkan isolat-isolat lainnya. Ekstrak organik (etil asetat-metanol) dari kultur mikroba ini memperlihatkan diameter daerah hambat terhadap bakteri uji jauh melampaui ekstrak organik dari isolat actinomycetes lainnya yakni sebesar 24 mm. Hal yang sama terjadi pada aktivitas antifungi dari ekstrak organik kultur mikroba ini

terlihat lebih kuat dibandingkan ekstrak mikroba lainnya dengan daya hambat 30 mm (Lampiran 1).

Disisi lain, penapisan senyawa antifungi dapat digunakan untuk tahap awal guna mendapatkan senyawa antikanker. Metode tersebut lebih efektif karena dapat dilakukan dengan cepat dan biaya operasional yang relatif murah dibandingkan jika penapisan dilakukan langsung menggunakan sel kanker secara *in vitro*. Nitiss & Hetman (2007) menyatakan bahwa sel kanker memiliki kesamaan dengan sel fungi, terutama khamir sehingga sel khamir dapat dijadikan dasar dalam studi kanker.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa metabolit F.5.1 yang diproduksi actinomycetes BL-22-5 bersifat toksik terhadap semua sel kanker yang diujikan, namun tidak toksik terhadap sel normal. Nilai IC_{50} diatas 500 $\mu\text{g/ml}$ dianggap tidak toksik (Machana *et al.* 2011). Rata-rata tingkat toksisitas ekstrak BL-22-5 terhadap sel kanker lebih tinggi, namun terhadap sel normal lebih rendah dibandingkan doksorubisin. Hasil positif diperoleh dari penelitian ini, karena diketahui bahwa kebanyakan senyawa antikanker juga bersifat toksik terhadap sel normal (Blagosklonny 2005; Gou *et al.* 2011). Hasil penelitian menunjukkan bahwa doksorubisin memiliki IC_{50} terhadap sel normal masih di bawah 20 $\mu\text{g/ml}$. Hal tersebut mengindikasikan bahwa doksorubisin juga masih bersifat toksik terhadap sel normal.

Penggunaan doksorubisin dalam kemoterapi kanker akan memberikan efek samping terhadap kerusakan sel normal. Efek samping tersebut berkaitan dengan mekanisme kerja doksorubisin itu sendiri. doksorubisin bersifat DNA interkalasi dan menghambat replikasi DNA. Dengan terhambatnya replikasi DNA, maka pembelahan sel akan terhenti (Momparker *et al.* 1976; Frederick *et al.* 1990; Fornari *et al.* 1994). Penghambatan replikasi DNA oleh doksorubisin tidak hanya terjadi pada sel kanker, tetapi juga pada sel normal yang masih aktif membelah. Menurut Rodriguez *et al.* (1994), sel masih aktif membelah yang biasanya terpengaruh oleh doksorubisin adalah folikel rambut, sumsum tulang, dan leukosit. Doksorubisin juga menyebabkan kerusakan hati dan ginjal pada dosis kemoterapi tertentu (0,2-10 mg/kg berat badan) (El-Sayyad *et al.* 2009).

Isolat BL-22-5 memiliki spesies terdekat dengan *Streptomyces badius*. Actinomycetes tersebut memiliki aktivitas antibiotik dan antifungi (Debananda *et al.* 2011). Walaupun demikian, sampai saat ini belum ditemukan produk komersial antibiotik atau antifungi dari *S. badius*. Penelitian baru sebatas uji antagonis terhadap mikroba patogen. Hal tersebut membuka peluang besar bahwa metabolit murni F.5.1 yang diproduksi isolat BL-22-5 bisa merupakan kandidat jenis obat baru sebagai antibakteri, antifungi, dan antikanker.

Sebanyak sembilan isolat yang memiliki aktivitas antimikroba terbaik telah diidentifikasi dan dikarakterisasi. Semua isolat teridentifikasi menjadi delapan spesies yang berbeda namun semua masuk dalam genus *Streptomyces*. Diketahui bahwa *Streptomyces* merupakan genus dominan pada actinomycetes. *Streptomyces* memiliki 502 spesies dari 2.335 spesies actinomycetes yang teridentifikasi (Madigan *et al.* 2003, Goodfellow *et al.* 2011). *Streptomyces* memproduksi 55 % dari total antibiotik yang telah dikomersialkan. *Streptomyces* juga memproduksi 31 % dari total senyawa bioaktif selain antibiotik (Watve *et al.* 2001).

Hasil identifikasi menggunakan pendekatan gen 16S rRNA, analisis filogenetik, dan karakterisasi morfologi serta fisiologi menunjukkan bahwa lima isolat merupakan kandidat spesies baru. Isolat tersebut adalah BL-36-1, BL-20-2, BL-14-2, BL-22-1, dan BL-06-5. Namun untuk memastikan bahwa isolat-isolat tersebut adalah spesies baru masih diperlukan analisis lanjut yang meliputi hibridisasi DNA-DNA dan analisis kemotaksonomi. Hibridisasi DNA-DNA harus dilakukan terhadap *type strain* spesies-spesies terdekatnya. Jika nilai homologi hibridisasi kurang dari 70 %, maka dapat dikategorikan menjadi jenis baru (Jauh-Hsun *et al.* 2002; Patel *et al.* 2004). Pengujian lain yang perlu ditambahkan untuk deskripsi jenis baru diantaranya adalah analisis kemotaksonomi. Analisis tersebut diantaranya adalah *diamino acid* dinding sel, tipe murein, menakuinon, mol G+C, ada tidaknya *mycolic acid*, dan *fatty acid methyl ester* (FAME) (Embley & Stackebrandt 1994; Miyadoh 1997; Goodfellow *et al.* 2011). Walaupun demikian, analisis hibridisasi dan kemotaksonomi tidak dilakukan dalam penelitian ini karena bukan merupakan target utama dari penelitian kami saat ini.

Hasil yang menarik dari penelitian ini adalah telah diperoleh satu isolat asal Raja Ampat, Papua yang memiliki beberapa aktivitas biologi sekaligus. Aktivitas tersebut adalah antibakteri, antifungi, dan antikanker yang berasal dari metabolit murni yang diisolasi dari kultur cair isolat BL-22-5. Aktivitas antimikroba relatif lebih rendah dibanding antimikroba komersial (kloramfenikol, eritromisin, nistatin, dan kabisidin), namun bersifat spektrum luas. Walaupun demikian, aktivitas antikanker secara umum lebih tinggi dibanding antikanker komersial (doksorubisin).

RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN

Penapisan terhadap seratus actinomycetes asal Raja Ampat, Papua Barat telah dilakukan. Sebanyak 44 % actinomycetes dari tempat tersebut memiliki aktivitas antimikroba. Telah diperoleh Sembilan isolat unggul penghasil antimikroba dengan aktivitas tertinggi. Semua isolat tersebut masuk dalam genus *Streptomyces* berdasarkan identifikasi molekuler gen 16S rRNA. Lima isolat merupakan kandidat spesies baru. Dari seratus isolat telah diperoleh satu isolat paling unggul, yaitu *Streptomyces badius* BL-22-5. Isolat tersebut menghasilkan metabolit yang memiliki aktivitas antibakteri, antifungi dan anti kanker sekaligus.

Hasil penelitian ini membuka peluang besar untuk dikembangkan. Metabolit murni yang dihasilkan dapat dielusidasi menggunakan analisis spektroskopi yang meliputi analisis NMR, IR, UV dan MS untuk mengetahui struktur molekulnya. Mekanisme kerja metabolit BL-22-5 terhadap antikanker perlu dipelajari. Uji lanjut aktivitas antikanker dapat ditingkatkan menuju penelitian *in vivo*. Jika memenuhi syarat standar obat baru, penelitian dapat dilanjutkan lagi pada uji klinik. Lima isolat yang merupakan kandidat jenis baru juga dapat dianalisis lanjut, seperti hibridisasi DNA-DNA dan uji kemotaksonomi.

DAFTAR ACUAN

- Anand, P.A., B. Kunnumakkara, C. Sundaram, K.B. Harikumar, S.T. Tharakan, S.L. Oiki, B. Sung & B.B. Anggarwai. 2008. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Journal pharma Research* **25**(9): 2097--2116.
- Blagosklonny, M.V. 2005. Perspective teratogens as anti-cancer drugs. *Journal Cell Cycle* **4**(11): 1518--1521.
- Conservation International. 2006. *Atlas sumber daya pesisir Kabupaten Raja Ampat Propinsi Irian Jaya Barat*. CI, Jakarta.
- Conservation International. 2006. *Atlas sumber daya pesisir Kabupaten Raja Ampat Propinsi Irian Jaya Barat*. CI, Jakarta.
- Cowan, M.M. 1999. Plant product as antimicrobial agents. *Journal Clinical Microbial Reviews* **12**(4): 564--582.
- Dewick P.M. 2002. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2nd ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons.
- Donaldio, S., S. Maffioli, P. Monciardini, M. Sosio & D. Jabes. 2010. Antibiotic discovery in the twenty-first century. *Journal Antibiotics* **63**: 423--453.
- Eloff, J.N. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial component? *Journal Ethnopharmacology* **60**: 1--8.
- El-Sayyad, H.I., M.F. Ismail, F.M. Shalabi, R.F.A. El-Magd, R.L. Gaur, A. Fernando, M.H.G. Raj & A. Ouhtit. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. *International Journal Biological Science* **5**(5): 466--473.
- Embley T. M. & E. Stackebrandt. 1994. The Molecular Phylogeny and Systematics of the Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* **48**: 257--289.
- Fornari, F.A., J.K. Randolph, J.C. Yolawich, M.K. Ritke & D.A. Gewirtz. 1994. Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Journal Molecular Pharmacology* **45**(4): 649--656.

- Frederick, C.A., L.D. Williams & G. Ugetto. 1990. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes : Adriamycin and daunomycin. *Journal Biochemistry* **29**(10): 2538--2549.
- Goodfellow, M., P. Kämpfer, H.J. Busse, M.E. Trujillo, K.I. Suzuki, W. Ludwig & W.B. Whitman. 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition volume 5*. Springer, New York.
- Gou, M.L., H.S. Shi, G. Gou, K. Men, J. Zhang, L. Zhang, Z.Y. Li, F. Luo, Z.Y. Qian, X. Zhao & Y.Q. Wei. 2011. Improving anticancer activity and reducing systemic toxicity of doxorubicin by self-assembled polymeric micelles. . *Journal Nanotechnology* **22**(9): 44--57.
- Jauh-Hsun, C., T. Vinh, J.K. Davies & D. Figdor. 2002. Molecular approaches to the differentiation of Actinomycetes spesies. *Journal Molecular Oral Microbiology* **14**: 250--256.
- Kurtboke I. 2001. *Selective isolation of rare Actinomycetes*. Queensland, Australia.
- Lechevalier, H. 1992. Actinomycetes and their products: a look at the future *Journal Microbiology and Biotechnology* **8**(1): 72--73.
- Lisdianti, P., M. Otoguro, S. Ratnakomala, Y. Lestari, R. D. Hastuti, E. Triana, A. Katsuhiko & Y. Widyastuti. 2010. *Actinokineospora baliensis* sp. nov., *Actinokineospora cibodasensis* sp. nov. and *Actinokineospora cianjurensis* sp. nov., isolated from soil and plant litter . *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology* **60**(10): 2331--2335.
- Lomovskaya, N., L. Fonstein, X. Ruan, D. Katz & C.R. Hutchinson. 1997. Gene disruption and replacement in the rapamycin producing 1997. Gene disruption and replacement in the rapamycin producing *Streptomyces hygroscopicus* strain ATCC 29253. *Journal Microbiology* **143**: 875--883.
- Machana, S., N. Weerapreeyakul, S. Barusru, A. Nonpunya, B. Sripanidkulchai, T. Thitimetharoch. 2011. Cytotoxic and apoptotic affects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. *Journal Chinese Medicine* **6**: 39-46.

- Madigan, M.T., J.M. Martiko & J. Parker. 2003. *Biology of Microorganisms. Tenth Edition*. Pearson Education, Inc. USA.
- Marwoto, B. & R. Sunaryanto. 2010. Marine Actinomycetes screening of Banten West Coast and their antibiotics purification. *Jurnal Biodiversitas* **11**(4): 176-181.
- McKenna, S.A., G.R. Allen & S. Suryadi. 2002. *A Marine Rapid Assessment of the Raja Ampat Islands, Papua Province, Indonesia*. RAP Bulletin of Biological Assessment, Conservation international, Washington DC.
- Mirwanto, E., O. Efendi, A. Ruskandi & Nurdin. 2007. Vegetasi Hutan Waigeo bagian selatan. *Dalam Arief, A.J., E.B. Walujo, Mulyadi & H. Julistyono. Laporan teknik Pusat Penelitian Biologi LIPI*. Pusat Penelitian Biologi, Bogor.
- Miyadoh, S. 1997. *Atlas of Actinomycetes*. Asakura Publishing Co Ltd. Japan.
- Momparler, R.L., M. Karon, S.E., Siegel & F. Avila. 1976. Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell free systems and intact cells. *Journal Cancer Research* **36**(8): 2891--2895.
- National Cancer Institute. 2010. What is cancer ? www.cancer.gov. 7 Desember 2010.
- Newman D.J. & G.M. Cragg. 2004. Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. *Journal Current Medical Chemistry* **11**: 1693--1713.
- Newman D.J., G.M. Cragg & K.M. Snader. 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Journal Natural Product* **17**: 215--234.
- Nitiss, J.L. & J. Heitman. 2007. *Khamir as a tool in cancer research*. Springer press, Dorderecht, Netherland.
- Nurkanto, A. 2009. Cellulolytic activities of Actinomycetes isolated from soil rhizosphere of Waigeo, Raja Ampat, West Papua. *Jurnal Tanah Tropica* **14**(3) : 239--244.
- Otoguro, M., H. Yamamura, T. Tamura, R. Irzaldi, S. Ratnakomala, R. Ridwan, G. Kartina, E. Triana, A. Nurkanto, Y. Lestari, P. Lisdiyanti, Y. Widyastuti & K. Ando. 2010. *Actinophytocola timorensis* sp. nov. and

- Actinophytocola corallina* sp. nov., isolated from soil in Indonesia. *International Journal of Systematic and Evolution Microbiology* **61**(4) : 834--838.
- Patel, S., N. Gheewala, A. Suthar & A. Shah. 2009. *In-vitro* cytotoxicity activity of *Solanum nigrum* extract against *Hela* cell line and *vero* cell line. *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Science* **1**(1): 38--46.
- Phobe, J.C.H., J. Combie, F.G. Albert, K.V. Tran, J. Cabrera, J. Correira, Y. Guo, J. Lindermuth, N. Rauert, W. Galbaith & C.P. Selitrennikoff. 2001. Extremophilic as unexplomera source of antifungal compounds. *Journal Antibiotics* **54**: 56--65.
- Pozzi, R., M. Simone, C. Mazzeti, S. Maffioli, P. Monciardini, L. Cavaletti, R. Bamonte, M. Sosio & S. Donadio. 2011. The genus *Actinoallomurus* and some its metabolites. *Journal Antibiotics* **64**: 133--139.
- Renu, S., M. Khanna & R. Lal. 2008. Bioactive compounds from marine Actinomycetes. *Indian Journal Microbiology* **48**: 410--431.
- Rodriguez, R., M. Machiavelli, B. Leone, A. Romero, M.A. Cuevas, M. Langhi, L.R. Acuna, J.R. Acuna, S. Amato, M. Barbieri, C. Vallejo, M. Robinovich, J. Perez, C. Sabatini, E. Ortiz, M. Salvadori & Lacava. 1994. *Journal Annals of Oncology* **5**(8): 767--770.
- Sunaryanto, R. & B. Marwoto. 2010. Marine Actinomycetes screening of Banten West Coast and their antibiotics purification. *Jurnal Biodiversitas* **11**(4): 176-181.
- Takisawa, M., R.R. Colwel & R.T. Hill. 1993. Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake bay. *Journal Apply Environmental Microbial* **59**: 997--1002.
- Watve, M.G., R. Tickoo, M.M. Jog & B.D. Bhole. 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Journal Archaea Microbiology* **176**(5): 386--390.
- World Health Organization. 2011. Global health observatory metadata. <http://apps.who.int/athena/>

Lampiran 1. Hasil penapisan antimikroba dengan konsentrasi ekstrak masing-masing 1000 µg/ml. Angka menunjukkan rata-rata diameter zona hambat dalam mili meter (mm).

No	Kode Isolat	Pelarut etil asetat : metanol						Pelarut air					
		<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>c. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>c. albicans</i>
1	BL 03 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	BL 03 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	BL 03 3	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-
4	BL 03 4	-	8	-	10	9	-	-	-	-	-	-	-
5	BL 03 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	BL 03 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	BL 03 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	BL 03 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	BL 03 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	BL 06 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	BL 06 2	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-
12	BL 06 4	-	-	-	-	7	14	-	-	-	-	-	8
13	BL 06 5	-	-	-	-	20	25	-	-	-	-	-	-
14	BL 06 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	BL 06 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	BL 06 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	BL 06 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	BL 13 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	BL 13 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	BL 13 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	BL 13 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	BL 13 5	-	9	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-
23	BL 13 6	-	7	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-
24	BL 14 1	-	-	-	-	-	-	7	8	-	9	-	-
25	BL 14 2	-	19	18	-	-	-	10	18	-	-	-	-
26	BL 14 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	BL 14 4	-	11	13	-	17	-	-	-	-	-	-	-
28	BL 14 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	BL 20 1	-	-	-	-	-	-	8	19	9	-	-	-
30	BL 20 2	7	21	22	22	27	-	-	-	-	-	-	-
31	BL 20 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	BL 20 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	BL 20 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	BL 20 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	BL 22 1	-	21	22	20	27	-	-	-	-	-	-	-
36	BL 22 2	-	9	10	9	-	-	-	-	-	-	-	-
37	BL 22 3	-	23	20	20	25	-	-	13	14	14	-	-
38	BL 22 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	BL 22 5	12	24	24	22	30	-	8	16	18	16	-	-
40	BL 22 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	BL 26 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Lampiran 1. (Sambungan)

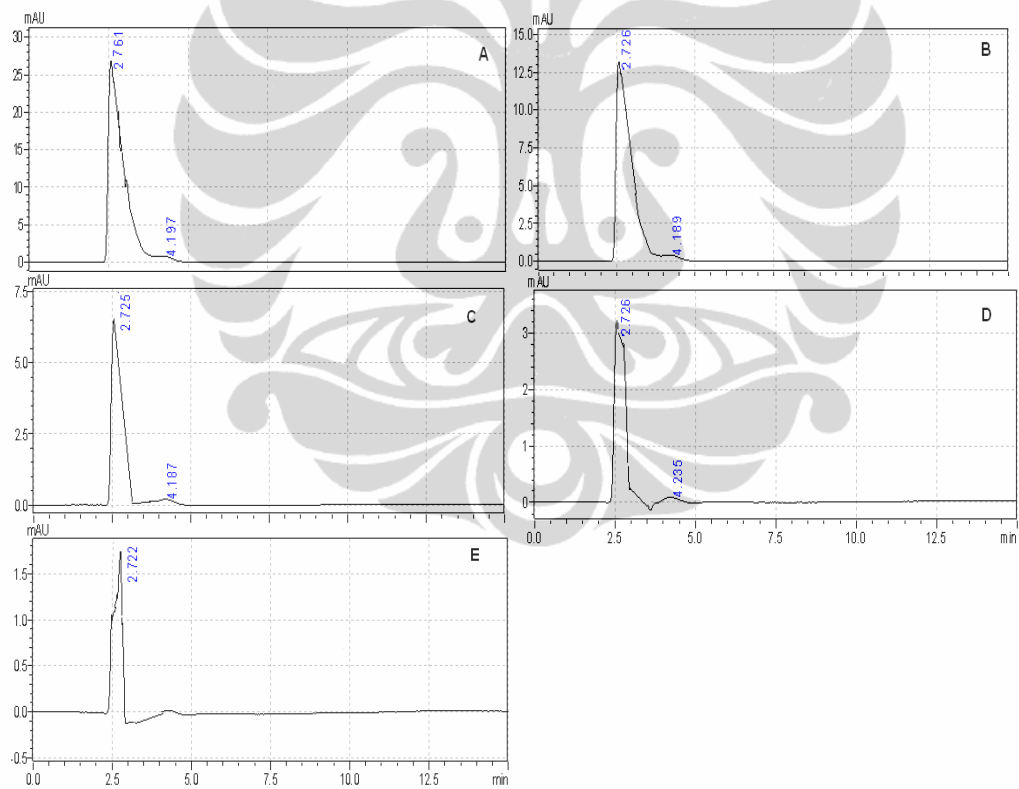
42	BS 14 1	-	-	-	-	-	-	-	8	10	-	10	7
43	BS 22 6	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-
44	BS 25 1	-	-	-	-	24	-	-	-	-	-	-	-
45	BS 25 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	BS 25 4	-	-	-	7	12	-	-	-	-	-	-	-
47	BS 25 5	-	-	-	-	23	-	-	-	-	-	-	-
48	BS 25 6	-	7	8	7	24	-	-	-	-	-	-	-
49	BS 32 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	BS 33 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	RC BL 14 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	RC BL 14 10	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-
53	RC BL 14 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	RC BL 14 12	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	RC BL 14 13	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-
56	RC BL 14 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	RC BL 14 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-
58	RC BL 14 6	-	14	-	13	16	-	-	-	-	-	7	-
59	RC BL 14 7	-	8	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-
60	RC BL 14 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	RC BS 03 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	RC SL 36 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	RC SL 36 2	-	8	-	9	12	-	-	-	-	-	-	-
64	RC SL 36 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	RC SL 36 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	RC SS 37 13	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-
67	RC SS 37 16	-	21	-	10	22	-	-	13	19	15	16	-
68	RC SS 37 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	RC SS 37 18	-	11	-	12	14	-	-	-	-	-	-	-
70	RC SS 37 21	-	6	-	9	-	8	-	-	-	-	-	-
71	RC SS 37 22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	RC SS 37 3	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-
73	RC SS 37 4	-	23	-	22	25	-	-	-	-	-	-	-
74	RC SS 37 5	-	14	13	-	15	-	-	-	-	-	-	-
75	RC SS 37 7	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	10	-
76	RC SS 37 9	-	8	11	11	11	-	-	-	-	-	-	-
77	BL 36 1	-	7	6	20	15	-	-	-	-	-	-	-
78	SL 36 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	SL 36 3	-	7	-	15	18	-	-	-	-	-	-	-
80	SL 36 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
81	SL 36 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	SL 36 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
83	SL 36 8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	SL 36 9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85	SL 37 1	-	18	-	21	30	-	-	9	11	12	11	-
86	SL 37 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
87	SL 37 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
88	W 26 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
89	W 33 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	W 33 2	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-	-
91	W 40 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	G2 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
93	SL100	-	-	-	-	14	-	-	8	-	-	8	-
94	RC W16 1	-	-	-	-	-	-	-	7	13	-	-	-
95	RC W26 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	SDS W 40 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Lampiran 1. (Sambungan)

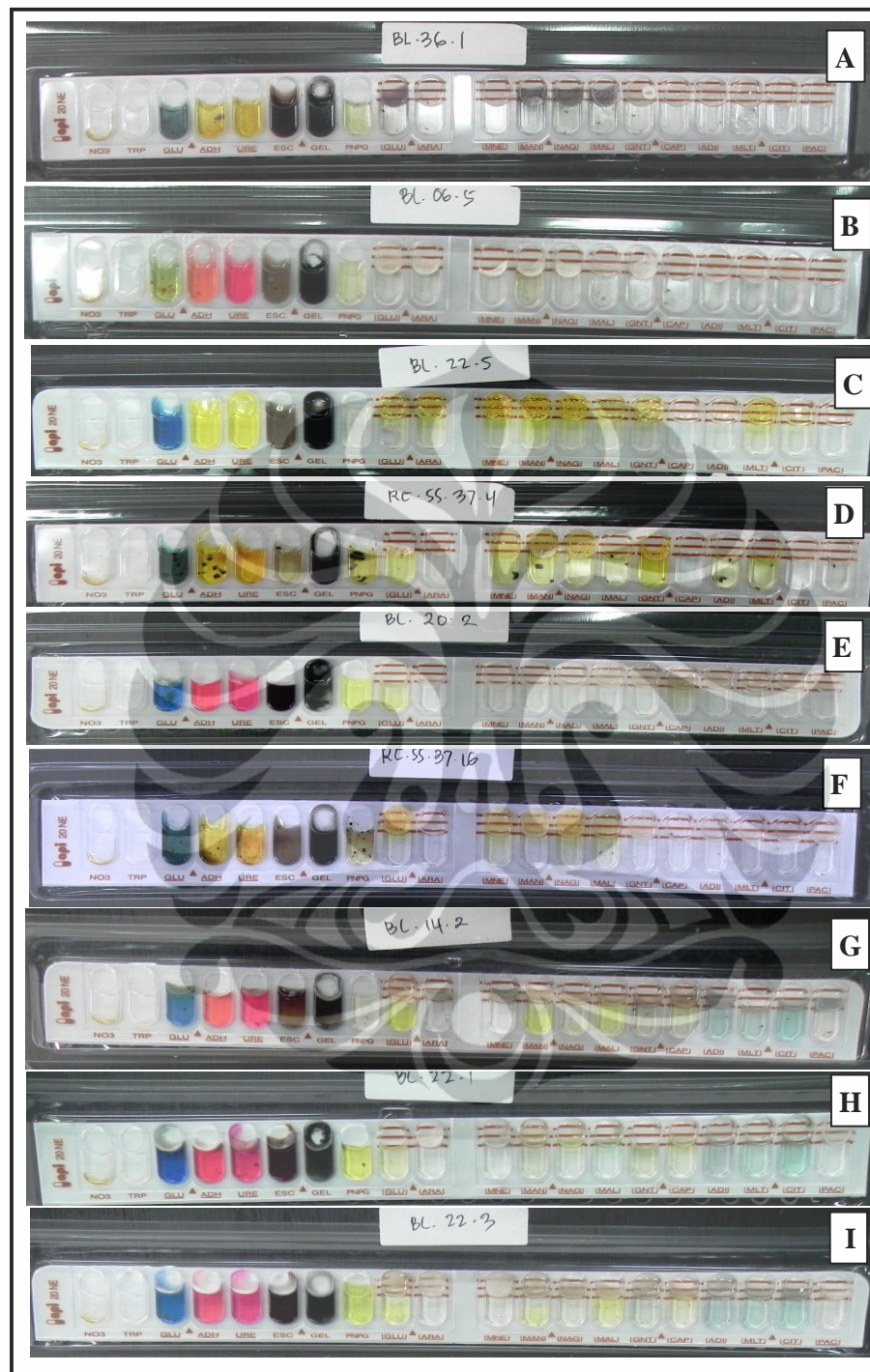
97	SDS W27 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98	RC G2 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99	RC G2 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100	RC G2 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Lampiran 2. Kontrol negatif dan positif yang digunakan pada pengujian antimikroba

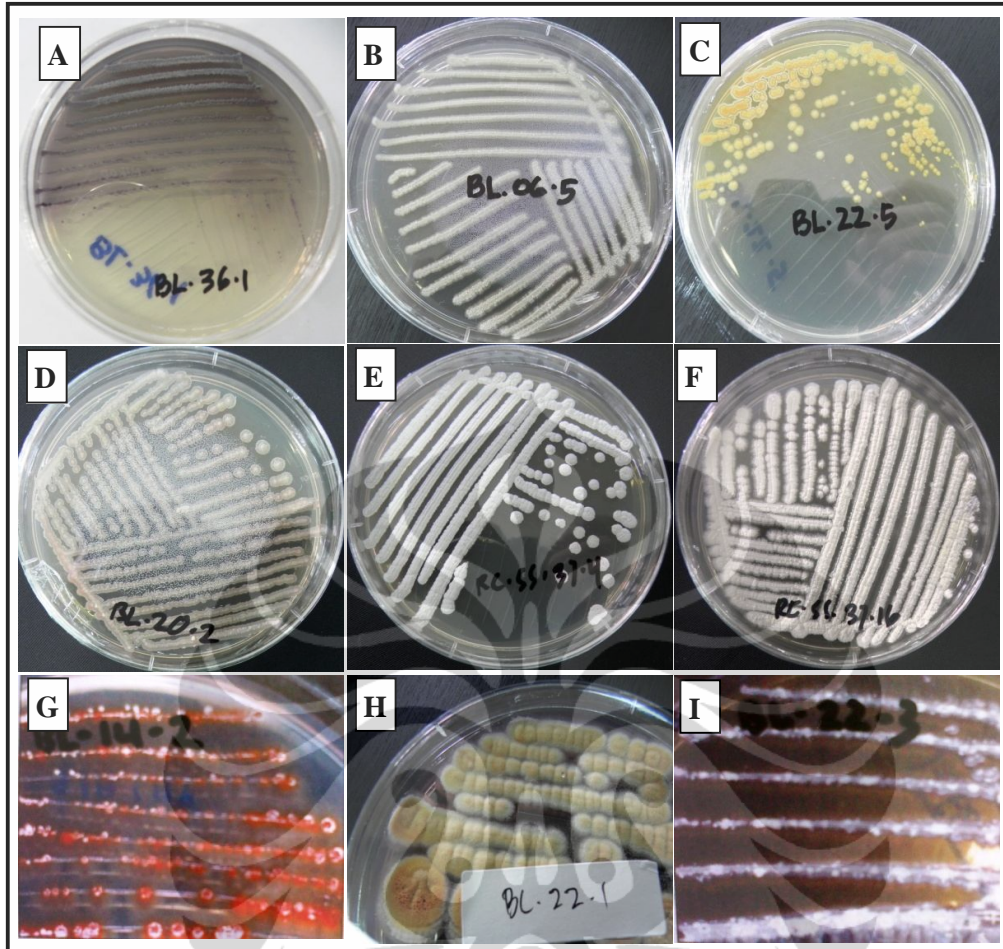
Microorganisme uji	Kontrol negatif		Kontrol positif			
	1 % DMSO	aquades	kloramfenikol	eritromisin	nistatin	kabisidin
<i>E. coli</i>	-	-	+	+	-	-
<i>M. luteus</i>	-	-	+	+	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	+	+	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	+	+	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	+	+



Lampiran 3. Standar urasil 5 ppm (A), 2,5 ppm (B), 1,25 ppm (C), 0,63 (D) dan 0,31 ppm (E) pada analisis KCKT dengan fase gerak acetonitril : aquades (1:9).



Lampiran 4. Pengujian fisiologi isolat dengan menggunakan API-20®, dimana A : BL-36-1; B : BL-06-5; C : BL-22-5; D : BL-20-2; E : RC-SS-37-4; F : RC-SS-37-16; G : BL-14-2; H : BL-22-1; dan I : BL-22-3



Lampiran 5. Foto isolat actinomycetes terseleksi asal Raja Ampat, Papua dengan aktivitas antimikroba tertinggi, dimana A : isolat BL-36-1; B : isolat BL-06-5; C : isolat BL-22-5; D : isolat BL-20-2; E : isolat RC-SS-37-4; F : isolat RC-SS-37-16; G : isolat BL-14-2; H : isolat BL-22-1; dan I : isolat BL-22-3.

Lampiran 6. Urutan basa hasil *contiq* dari enam primer isolat BL-36-1.

CGATGAACCGGTCCTTCGGCCGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACT
 CTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACCACCGACCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAG
 CTCGGCGGCTGACAGGATGAGCCCGGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGGCAGCAGC
 GGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGC
 AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGT
 TGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTG
 CCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCG
 CTTGACAGCTCGGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTCGATACGGGAGGGCTAGAGTTCCG
 GTAGGGGAGGTAATCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGAACACCGGACACCTGGCGAAGG
 CGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTA
 GTCACAGCCGTAACCGTTGGGAACTAGGTGTGGCGACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTA
 AGTCCCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCCGGC
 GGAGCATGGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGCAACACTGGC
 AGATGGGTGCCCTTGTGGTCCGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGG
 GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTACA
 GGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTC AAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCT
 GCACACGCTACAATGGCCGTACAATGAGCTGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAACCCGGT
 CTCAGTTCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTTG
 CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCGTC

Lampiran 7. Urutan basa hasil *contiq* dari enam primer isolat BL-20-2.

ACGAACGCTGACGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCACTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAA
 CGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGAT
 AACACTTCCACTCTCCTGAGTGGAGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGGGCCTATCAGCTTG
 TTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGAGGTTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGCCACACTGGGAG
 TGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCA
 GCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACG
 GTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTC
 CGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGGCTTGTACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCG
 GGTCTGCAGTCGATACGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGC
 GCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGC
 GTGGGAGCGCAACAGGATTAGATACCTGGTATGTCACCGCTAAACCGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACA
 TTTCACGTTGTCCGTGCCGACGTAACGCATTAAGTCCCGCCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAAC
 TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCT
 TACCAAGGCTTACATACACCGGAAACGCTTGGAGACAGGGCCCGCTTGTGGTCCGGTGTACAGGTGGTGCA
 TGGTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCCCGTGTTC
 CAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTC AACTCGGAGGAAGGTGGGGACGAC
 GTC AAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACC
 GCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCC
 GAGTCGATGAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTC
 CGTACGAAAGTCGGTAACACCTGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGG
 ACTGGCGATTGGGACGAAGTCG

Lampiran 8. Urutan basa hasil *contiq* dari enam primer isolat BL-14-2.

CGCTGGCGGCTGTCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTG
 AGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATGACACC
 GGCCTTCGATGAGGGCTGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGACAGGATGAGCCCGGGCCTATCAGCTTGTGGTG
 AGGTAGTGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGAC
 GCCCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTACGGTACCT
 GCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCCTTGTCCGGAAT
 TATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCCTGTCGCTCGGTTGTGAAAGCCCGGGCTTAAACCCCGGGTCTG
 CAGTCGATACGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGA
 TATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGG
 GAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTGTACGCGGTAACCGGTGGGAACTAGGTGTGGCGACATTCCAC
 GTCGTCGGTCCCGCAGCTAACGCATTAAGTTCGCCCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTAAAAGG
 AATTGACGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAG
 GCTTGACATATACGGAAAGCATCAGAGATGGTCCCCCTTGTGGTCCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGT
 CGTCAGCTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTGCCAGCATG
 CCTTCGGGTGATGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGTC AAG
 TCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCAGGTACAATGAGCTGCGAAACCGTGTG
 GTAGAGCGAATCTCAAAAAGCCTGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTT

GCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACGTCA
CGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAG

Lampiran 9. Urutan basa hasil *contiq* dari enam primer isolat RC-SS-37-4

CGCTGGCGGCGTGTCTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTG
AGTAACACGTGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACC
ATCTTGGGCATCCTTGTAGTGTAAAGCTCCGGCCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGT
GAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAAGCGA
CGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTAC
CTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCCTTGTACGTCGATTGTGAAAAGCTCGGGGCTTAACCCGAGTC
TGCAGTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCA
GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGAACTAGCGTGTGGCGACATTC
CACGTCGTCGGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCGCAACAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGCAAGAACCTTACC
AAGGACTTGACATACACCGGAAAGCATTAGAGATAGTGGCCCTTGTGGTTCGGTGTACAGGTGGTGCATGG
CTGTCTGACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAG
CAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTC
AAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCATACCGT
GAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGA
GTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACGT
CACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTT

Lampiran 10. Urutan basa hasil *contiq* dari enam primer isolat RC-SS-37-16.

GACGAACGCTGGCGGCGTGTCTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTGGATTAGTGGCGA
ACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGG
ATATGACCATCTTGGGCATCCTTGTAGTGTAAAGCTCCGGCCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCT
TGTGGTGTAGGTAATGGCTCACC AAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATG
CAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGA
CGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTG
TCCGGAATATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCCTTGTACGTCGATTGTGAAAAGCTCGGGGCTTAAACC
CGAGTCTGCATCGATAACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGGCTGAAAT
GCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAA
GCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTGGGAACTAGGTGTGGCGA
CATTCCACGTCGTCGGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGCAAGAACC
TTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAAGCATTAGAGATAGTCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGC
ATGGCTGTCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCGTGTG
CCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGA
CGTCAAGTCATCAGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATAC
CGTAGGTTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTC
GGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTC
ACGTACGAAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGG
ACCAGCGATTGGGACGAAGTCG

Lampiran 11. Urutan basa hasil *contiq* dari enam primer isolat BL-22-1.

CGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACCTCCATCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATCTGACCAGCTG
AGGGCATCCAAGCGGTGGTCAAGGCTCCGGCCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGTG
GTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGACGCGACGCC
GCGTAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGC
AGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTA
TTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGGCTTGTACGTCGGTGTGAAAAGCCCGGGGCTTAAACCCGGGTCTGCA
GTCGATACGGGAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATA
TCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCCGGATCTCTGGGCCGATACGTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGA
GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGCACTAGGTGTGGGCGACATTCCACGT
CGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTGCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACCGCAAGAACCTTACCAAGG
CTTGACATACACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCTCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTG

GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCTGTGTTGCCAGCGGA
 TCATGCCGGGACTCACAGGAGACCGCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTACATC
 GCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGTACAATGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGC
 GAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAAGTCGGAGTCCGTAGTA
 ATCGCAGATCAGATTGCTGCAGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACAGAAAGT
 CGGTAACCCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGG
 ACGAAGTCGTAACAGGTA

Lampiran 12. Urutan basa hasil *contiq* dari enam primer isolat BL-06-5.

TCAGGACGAACGCTGGCGCGGTGCTTAACACATGCAAGTGAACGATGAACCACTTCGGGGTGGATTAGTGG
 CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAAACGGGGTCTAATAC
 CGGATAAACACTTCCCTCCTGGAAGGGTGAAGCCCTGGAAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACACTTCCC
 TCTCCGGAGGGTGGTTAAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGAGTGG
 TGGCTACCAAGGGCAGCAGCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCC
 CAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGACGCGACCGCCGT
 GAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAAGTACGGTACCTGCAGAA
 GAGAGCGCCGGTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGGGCGCAAGCGTGTCCGGAATTATTGG
 GCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTGCGCTCGGTTGTAAAGCCCGGGGCTTAAACCCGGGTCTGCAGTGC
 ATACGGGCAAGCTAGAGTGTGGTAGGGAGATCGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAG
 GAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA
 ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACACGGTGGGAACTAGGTGTTGGCGACATTCCACGTGTC
 GGTGCCGAGCTAACGCTAATTAAGTTCGCCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCGCAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTT
 GACATACACCGGAACGCTTGGAGACAGCGCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTC
 AGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCT
 TCGGGTGATGGGACTCACAGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAAT
 CATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGATACAATGAGCTGCGATACCGCAAGGTGG
 AGCGAATCTCAAAAAGTCCGCTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTGGAGTTGCTA
 GTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACAGAA
 AGTCCGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAGGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATT
 GGGACGAAGT

Lampiran 13. Urutan basa hasil *contiq* dari enam primer isolat BL-22-3.

ACGAACGCTGGCGCGGTGCTTAACACATGCAAAGTGAACGATGAACCACTTCGGTGGGGATTAGTGGCGA
 ACGGGTGGTAAACAGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAAACGGGGTCTAATACCGG
 ATACTGACCTTACCGGCATCTGTGAAGGTGGAAGAAAGGCTCCGGCGGTGACAGTCCGGCGGTGACAGGATG
 AGCCCGCGCCCTATCAGCTTGTGGTGGGTAATGGCTCACCAGGCGACGACGGTAGCCGGCCTGAGAG
 GGGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAC
 AATGGGCGAAAAGCCTGATGACGCGAGCCCGCTGAGGGATGACGCGCTTCGGGTTGTAACCTCTTTACGA
 GGGAGAAGCGAAAGTACGGTACCTGCAGAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATA
 CGTAGGGCGCAAGCGTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGCTTGTACGTCGGTGTGA
 AAGCCCGGGGCTTAAACCCGGTCTGCAGTCGATACGGGCAAGGCTAGAGTTCGGTGGGGAGATCGGAATT
 CCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGCCGATA
 CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGT
 GGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTCCCCCGCTGGGGAG
 TACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGTGGCTTAATT
 CGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGTCAGAGATGGGCGCCCCCTTGT
 GGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTGACGCTGTGCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
 CGCAACCCCTTGTCCCGTGTGCCAGCAGGCCCTTGTGGTGTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGTCAAC
 TCGGAGGAAGGTGGGAGCAGCTCAAGTCAATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGC
 CGGTACAATGAGCTGCGATACCGAAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCT
 GCAACTCGACCCATGAAGTCCGAGTGCAGTGTAAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGG
 GCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCCGTTAACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGG
 ACGGAGCTGTGCAAGGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTGC

Lampiran 14. Urutan basa hasil *contiq* dari enam primer isolat BL-22-5.

GTCGAACGATGAAATCACTTCGGTGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTT
 CACTCTGGGACAAGCCCTGGAAAACGGGGTCTAATACCGGATAAACACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTTGAA
 AGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAATGGCCTACCAAGGGCAGCA
 CGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACTTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCACGGGAGGCA
 GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGACGAGCAGCCCGTGGGGATGACGGCCTTCGG
 GTTGTAAACCTTTTACGAGGGGAAGAAGCGAAAAGTACGGGTACCTGCAGAAAGCGCCCGGTAACCTACG

TGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCG
 GCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGTCTGCATTGATACGGGTAGCTAGAGTGT
 GGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGCGAAG
 GCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGT
 AGTCCACGCCGTAACGTTGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGAGCTAACGCATT
 AAGTCCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCAG
 CGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAAGCATCAG
 AGATGGTGCCCCCTTGTGGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGG
 TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTGTGTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGTGGGGACTCACAG
 GAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTG
 CACACGTGCTACAATGGCCGGTACATGAGCTGCGATGCCGCGAGGCGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTC
 TCAGTTCCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCT
 GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACGTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAAGCCGG
 TGGCCAACCCTTGTGGGAGGGAGCTGTCGAAAGTGGGACTGGCGATTGGGACGAAGTCGTA

Lampiran 15. Hasil identifikasi gen 16 S rRNA isolat actinomycetes yang memiliki kemampuan antimikroba tertinggi, berdasarkan persentase homologi spesies terdekatnya.

No	Kode isolat	Jumlah basa (bp)	Isolat identik	Persentase homologi
1	BL-36-1	1328	<i>Streptomyces mobaraensis</i> (T); NRRL B-3729T; DQ442528	95,2
			<i>Streptomyces rapamycinicus</i> (T); NRRL B-5491; EF408733	94,3
			<i>Streptomyces cuspidosporus</i> (T); NBRC 12378; AB184090	93,7
			<i>Streptomyces ramulosus</i> (T); NRRL B-2714; DQ026662	93,6
			<i>Streptomyces sparsogenes</i> (T); NBRC 13086; AB184301	93,5
			<i>Amycolatopsis fastidiosa</i> (T); NBRC 14015; AB184566	93,5
			<i>Streptomyces misakiensis</i> (T); IFO 12891; AB217605	93,5
			<i>Streptomyces catenulae</i> (T); DSM 40258; AJ621613	93,5
			<i>Streptomyces yogyakartaensis</i> (T); NBRC 100779; AB249942	93,4
			<i>Streptomyces violaceusniger</i> (T); NBRC 13459; AB184420	93,4
2	BL-20-2	1454	<i>Streptomyces violarius</i> (T); NBRC 13104; AB184316	97,4
			<i>Streptomyces arenae</i> (T); ISP 5293; AJ399485	95,3
			<i>Streptomyces massaporeus</i> (T); NBRC 12796; AB184152	95,2
			<i>Streptomyces koyangensis</i> (T); VK-A60; AY079156	95,2
			<i>Streptomyces albosporeus</i> (T); LMG 19403; AJ781327	94,4
			<i>Streptomyces violaceus</i> (T); NBRC 13103; AB184315	94,4
			<i>Streptomyces janthinus</i> (T); NBRC 12879; AB184851	94,4

Lampiran 15. (Sambungan)

			<i>Streptomyces hawaiiensis</i> (T); NBRC 12784; AB184143	94,2
			<i>Streptomyces indiaensis</i> (T); NBRC 13964; AB184553	94,1
			<i>Streptomyces sampsonii</i> (T); ATCC25495; D63871	94,0
3	BL-14-2	1409	<i>Streptomyces kanamyceticus</i> (T); NRRL B-2535T; DQ442511	93,9
			<i>Streptomyces durmitorensis</i> (T); MS405; DQ067287	93,3
			<i>Streptomyces aureus</i> (T); B7319; AY094368	92,8
			<i>Streptomyces rectiviolaceus</i> (T); NRRL B-16374; DQ026660	92,7
			<i>Streptomyces turgidiscabies</i> (T); ATCC 700248; AB026221	91,2
			<i>Streptomyces tauricus</i> (T); JCM 4837; AB045879	91,1
			<i>Streptomyces umbrinus</i> (T); NBRC 13091; AB184305	91,1
			<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> (T); NBRC 3180; AB184738	91,1
			<i>Streptomyces atratus</i> (T); NRRL B-16927; DQ026638	90,9
			<i>Streptomyces sanglieri</i> (T); NBRC 100784; AB249945	90,7
4	RC-SS-37-4	1404	<i>Streptomyces costaricanus</i> (T); NBRC 100773; AB249939	100
			<i>Streptomyces murinus</i> (T); NBRC 12799; AB184155	100
			<i>Streptomyces griseofuscus</i> (T); NBRC 12870; AB184206	100
			<i>Streptomyces phaeogriseichromatogenes</i> (T); type strain: NRRL 2834; AJ391813	96,3
			<i>Streptomyces misionensis</i> (T); NRRL B-3230; EF178678	93,3
			<i>Streptomyces lanatus</i> (T); NBRC 12787; AB184845	92,0
			<i>Streptomyces phaeoluteichromatogenes</i> (T); type strain: NRRL B-5799; AJ391814	91,6
			<i>Streptomyces durhamensis</i> (T); NRRL B-3309; CSSP538; AY999785	91,6
			<i>Streptomyces filipinensis</i> (T); NBRC 12860; AB184198	91,1
			<i>Streptomyces yokosukanensis</i> (T); NRRL B-3353; DQ026652	90,9
5	RC-SS-37-16	1453	<i>Streptomyces costaricanus</i> (T); NBRC 100773; AB249939	99,8
			<i>Streptomyces murinus</i> (T); NBRC	99,7

Lampiran 15. (Sambungan)

			12799; AB184155	
			<i>Streptomyces griseofuscus</i> (T); NBRC 12870; AB184206	99,7
			<i>Streptomyces phaeogriseichromatogenes</i> (T); type strain: NRRL 2834; AJ391813	96,8
			<i>Streptomyces misionensis</i> (T); NRRL B-3230; EF178678	93,8
			<i>Streptomyces lanatus</i> (T); NBRC 12787; AB184845	92,2
			<i>Streptomyces durhamensis</i> (T); NRRL B-3309; CSSP538; AY999785	92,0
			<i>Streptomyces filipinensis</i> (T); NBRC 12860; AB184198	91,3
			<i>Streptomyces yokosukanensis</i> (T); NRRL B-3353; DQ026652	91,3
6	BL-22-1	1448	<i>Streptomyces labedae</i> (T); NBRC 15864; AB184704	94,6
			<i>Streptomyces variabilis</i> (T); NRRL B-3984T; DQ442551	94,2
			<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> (T); type strain: LMG 19316; AJ781321	94,1
			<i>Streptomyces variabilis</i> (T); NRRL B-3984T; DQ442551	94,0
			<i>Streptomyces matensis</i> (T); NBRC 12889; AB184221	93,9
			<i>Streptomyces althioticus</i> (T); KCTC 9752; CSSP673; AY999808	90,1
			<i>Streptomyces erythrogriseus</i> (T); type strain: LMG 19406; AJ781328	91,9
			<i>Streptomyces viridodiataticus</i> (T); IFO 13106; CSSP719; AY999852	91,9
			<i>Streptomyces achromogenes</i> (T); KCTC 9742; CSSP713; AY999846	91,4
			<i>Streptomyces griseorubens</i> (T); NBRC 12780; AB184139	91,0
7	BL-06-5	1515	<i>Streptomyces kunmingensis</i> (T); NRRL B-16240T; DQ442513	96,2
			<i>Streptomyces capoamus</i> (T); JCM 4734; AB045877	93,4
			<i>Streptomyces bungoensis</i> (T); NBRC 15711; AB184696	92,2
			<i>Streptomyces galbus</i> (T); DSM40089; X79852	92,1
			<i>Streptomyces avermitilis</i> (T); MA-4680; BA000030	92,1
			<i>Streptomyces olivaceoviridis</i> (T); NBRC 13066; AB184288	92,1
			<i>Streptomyces canarius</i> (T); NBRC 13431; AB184396	92,1
			<i>Streptomyces cinnabarinus</i> (T); NBRC 13028; AB184266	91,8

Lampiran 15. (Sambungan)

			<i>Streptomyces corchorusii</i> (T); NBRC 13032; AB184267	91,8
8	BL-22-3	1470	<i>Streptomyces parvulus</i> (T); NBRC 13193; AB184326	98,6
			<i>Streptomyces tendae</i> (T); ATCC19812; D63873	96,0
			<i>Streptomyces malachitospinus</i> (T); NBRC 101004; AB249954	95,9
			<i>Streptomyces olivaceus</i> (T); NBRC 3200; AB184743	95,9
			<i>Streptomyces bellus</i> (T); NBRC 12844; AB184849	95,8
			<i>Streptomyces violaceorubidus</i> (T); type strain:LMG 20319; AJ781374	95,7
			<i>Streptomyces pactum</i> (T); NBRC 13433; AB184398	95,6
			<i>Streptomyces iakyrus</i> (T); NBRC 13401; AB184877	95,5
			<i>Streptomyces albosporeus</i> (T); type strain:LMG 19403; AJ781327	94,6
			<i>Streptomyces violaceus</i> (T); NBRC 13103; AB184315	94,6
9	BL-22-5	1425	<i>Streptomyces badius</i> (T); NRRL B-2567; CSSP536; AY999783	98,9
			<i>Streptomyces parvus</i> (T); NRRL B-1455T; DQ442537	98,7
			<i>Streptomyces fimicarius</i> (T); ISP 5322; CSSP537; AY999784	98,4
			<i>Streptomyces sindenensis</i> (T); NBRC 3399; AB184759	98,1
			<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> (T); NBRC 12912; AB184240	98,0
			<i>Streptomyces flavofuscus</i> (T); NBRC 100768; AB249935	98,0
			<i>Streptomyces griseinus</i> (T); NBRC 12869; AB184205	97,9
			<i>Streptomyces baarnensis</i> (T); NBRC 14727; AB184615	97,9
			<i>Streptomyces anulatus</i> (T); NRRL B-2000; DQ026637	97,7
			<i>Streptomyces pluricolorescens</i> (T); NRRL B-2121T; DQ442540	97,7

Lampiran 16. Karakterisasi morfologi dan fisiologi isolat actinomycetes terseleksi asal Raja Ampat, Papua.

Karakterisasi	Isolat								
	B-36-1	BL-20-2	BL-14-2	RC-SS-37-4	RC-SS-37-16	BL-22-1	BL-06-5	BL-22-3	BL-22-5
Antimikroba									
<i>E.coli</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>B.subtilis</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<i>M. luteus</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>C.albicans</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>S. cereviceae</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Aerial mycelium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bentuk rantai spora									
<i>Rectiflexibiles</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Spirales</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>Verticillate</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>Rectinaculiaperti</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Warna koloni, miselium dan pigmen pada medium YSA									
Warna koloni	abu-abu	merah	Merah	abu-abu	abu-abu	kuning	Putih	abu-abu	Kuning
Produksi pigmen ke media	-	-	-	kuning	kuning	-	cokelat	kuning	Kuning
Koloni bawah	abu-abu	oranye	Merah	hitam	hitam	kuning	abu-abu	abu-abu	Kuning
Warna koloni, miselium dan pigmen pada medium ISP2									
Warna koloni	abu-abu	cokelat	Merah	putih	putih	kuning	cokelat	putih	Cokelat
Produksi pigmen ke media	abu-abu	-	-	kuning	kuning	-	cokelat	-	Kuning
Koloni bawah	abu-abu	cokelat	Merah	kuning	kuning	kuning	cokelat	putih	Kuning
Suhu pertumbuhan									
4 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Lampiran 16. (Sambungan)

37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toleransi salinitas									
0 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 %	-	-	-	+	+	-	-	+	+
5 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toleransi pH									
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asimilasi gula									
Glukosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinosa	-	+	-	-	-	-	+	+	+
Mannosa	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	-	+	+	+
N-acetyl glucosamine	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Gluconat	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Kaprat	-	+	+	-	-	+	-	+	-
Adipat	-	-	+	+	-	+	-	+	+
Malat	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Citrat	-	-	+	-	-	+	-	+	+
phenyl-acetat	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Produksi enzim									
Pengasaman glukosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Arginin dihidrolase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β -glucosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Protease	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β -galactosidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+