

## **TINGKAT KEBERHASILAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI ISOLAT *ACTINOMYCETES* DARI RIZHOSFER MANGROVE *Rhizopora mucronata* TERHADAP RESISTENSI BAKTERI *Eschericia coli***

**<sup>1</sup>Siti Imamatul Imroah, <sup>2</sup>Haryo Triajie <sup>3</sup>Abdus Salam Junaedi**

<sup>1,2,3</sup>Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Trunojoyo

Penulis korespondensi: haryotriajie@trunojoyo.ac.id dan

200351100008@student.trunojoyo.ac.id

### **ABSTRAK**

Mangrove termasuk ekosistem interfase antara lingkungan pantai dan darat yang unik dan kaya hayati yang membentuk komunitas dengan istilah hutan mangrove atau hutan bakau. Struktur kimia yang amat kompleks ini diduga mikroorganisme di ekosistem mangrove mampu menghasilkan senyawa yang dapat menjadi sintesis obat baru bagi bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotik diduga memiliki potensi sebagai antibiotik yang resisten. Oleh karena itu, untuk menanggulangi suatu infeksi penyakit perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas antibakteri pada *Actinomyces*. Prosedur yang digunakan dalam penelitian ini yaitu preparasi sampel, isolasi, karakterisasi morfologi koloni bakteri, purifikasi, saving bakteri, uji antibakteri, pewarnaan gram dan uji biokimia. Hasil uji antibakteri terhadap *Actinomyces* menggunakan bakteri patogen *E.coli* menggunakan metode *Agar Well Difussion*. Hasil pengujian diperoleh bahwa 6 isolat *Actinomyces* mampu menghambat bakteri *E.coli* karena ditemukan zona bening disekitar isolat. Hasil uji pewarnaan gram diperoleh 6 isolat bersifat positif, sedangkan uji biokimia menggunakan 2 jenis uji yaitu uji katalase dan uji KOH 3%. Hasil uji katalase diperoleh 2 isolat positif, sedangkan uji KOH3% diperoleh hasil 6 isolat positif.

**Kata kunci:** *Actinomyces*, Rizhosfer, Agar Well Difussion

### **ABSTRACT**

*Mangroves are a unique and biologically rich interphase ecosystem between coastal and terrestrial environments that form communities known as mangrove forests or mangrove forests. This very complex chemical structure is thought to mean that microorganisms in the mangrove ecosystem are capable of producing compounds that can be used to synthesize new drugs for pathogenic bacteria that are resistant to antibiotics, which are thought to have the potential to become antibiotic resistant. Therefore, to overcome a disease infection, it is necessary to carry out research to determine the antibacterial activity of Actinomyces. The procedures used in this research were sample preparation, isolation, morphological characterization of bacterial colonies, purification, saving bacteria, antibacterial tests, gram staining and biochemical tests. Results of antibacterial tests against Actinomyces using the pathogenic bacteria E.coli using the Agar Well Difussion method. The test results showed that 6 Actinomyces isolates were able to inhibit E. coli bacteria because there are clear zone was found around the isolates. The results of the gram staining test showed that 6 isolates were positive, while the biochemical test used 2 types of tests, namely the catalase test and the 3% KOH test. The catalase test results obtained 2 positive isolates, while the KOH3% test resulted in 6 positive isolate*

**Keywords:** *Actinomyces*, Rizhosfer, Agar Well Difussion

## I. PENDAHULUAN

Mangrove termasuk ekosistem interfase antara lingkungan pantai dan darat yang unik dan kaya hayati yang membentuk komunitas dengan istilah hutan mangrove atau hutan bakau. Luas hutan mangrove dunia pada tahun 2010 mencapai 16.530.000 hektare yang meliputi 7.441.000 hektare di Asia, 3.258.000 hektare di Afrika dan 5.831.000 hektare di Amerika. Indonesia merupakan salah satu negara yang mempunyai hutan mangrove terluas yakni mencapai 3.735.250 hektare. Indonesia di kawasan Asia memiliki hutan mangrove sekitar 50% dan 25% skala dunia (Khairunnisa *et al.*, 2020). Ekosistem mangrove terdiri dari lingkungan abiotik dan lingkungan biotik yang saling berinteraksi. Produktifitas perairan di ekosistem mangrove baik di muara sungai maupun pantai tergolong tinggi dan mempunyai struktur kimia yang amat kompleks. Lingkungan yang ekstrim seperti salinitas tinggi, tekanan angin kuat, suhu tinggi, substrat berlumpur dan anerob serta pasang surut yang tinggi menyebabkan organisme di ekosistem mangrove memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi baik secara fisiologis, morfologis, biologis maupun ekologis. Kondisi ini diduga mikroorganisme di ekosistem mangrove mampu menghasilkan senyawa yang dapat menjadi sintesis obat baru bagi bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotic (Fitriah *et al.*, 2013).

Kebutuhan antibiotik baru tergolong tinggi, terutama yang efektif dalam menghambat bakteri patogen yang resisten, sehingga senyawa aktif antibakteri di bidang kesehatan merupakan informasi yang amat penting dalam menanggulangi suatu penyakit yang disebabkan oleh bakteri (Pratiwi, 2019). Penyakit infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen. Penyakit infeksi mampu menjadi penyebab utama untuk morbiditas dan mortalitas manusia. Tahun 2015 *The Global Burden of Disease (GDBS)* memperkirakan bahwa penyakit infeksi masuk dalam 10 penyebab kematian terbesar di dunia. Perkembangan dunia pengobatan yang kian pesat telah mengeksplor beragam jenis obat-obatan baru. Penggunaan antibiotik sintetik dapat memberikan efek samping sehingga diperlukan penemuan antibiotik baru (Tyas, 2020). Produksi obat-obatan yang terus berkembang diharapkan mampu mengatasi masalah resistensi obat. Mikroorganisme yang mampu menghasilkan senyawa metabolit baru yakni *Actinomycetes* (Hamidah, 2013).

*Actinomycetes* merupakan salah satu mikroorganisme yang berasal dari laut dan dapat ditemukan di permukaan air laut, dasar air laut, sedimen, batu karang maupun pada tanah. *Actinomycetes* bersifat prokariotik seperti bakteri namun memiliki miselium dan tergolong mikrobial yang mempunyai potensi dalam menghasilkan metabolit sekunder (Tati *et al.*, 2023). *Actinomycetes* mampu menghasilkan senyawa bioaktif antibiotika (70%), fungi (20%) dan bakteri (10%) (Rante *et al.*, 2010). *Actinomycetes* telah diakui sumber senyawa bioaktif kurang lebih 10.000 yang dihasilkan dari genus *Streptomyces*. Jenis *Actinomycetes* yang mampu menghasilkan senyawa antimikroba seperti Amfoterisin B, Nistatin, dan Natamisin. Ekosistem mangrove tumbuh di substrat berlumpur yang berpotensi mengandung mikroorganisme seperti *Actinomycetes*. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui uji aktivitas antibakteri *Actinomycetes* dari rizosfer mangrove *Avicennia alba* terhadap bakteri patogen *E. coli* dan peneliti tertarik untuk melakukan penelitian ini

## II. METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian dilakukan pada Bulan September-Desember 2023 meliputi pengambilan sampel rizosfer di pantai sepulu Kabupaten Bangkalan, dilanjutkan dengan analisa

sampel dan analisa data di Laboratorium Biologi Laut Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cetok, pH soil, Refraktometer, Mortar dan Pastel, Timbangan analitik, Loyang, Tabung reaksi, Rak tabung reaksi, Mikropipet, Gelas beaker, Cawan petri, Erlenmeyer, Inkubator, Media dan Bacetria fridge, Spatula, Jarum ose, Magnetic stirrer, Autoclave, Hot Plate, Bunsen, L-glass, Vortex, Mikrotip, Object glass, Botol semprot, Gelas Ukur, Penggaris, mikroskop. Adapun bahan-bahan yang digunakan yaitu sampel Rizhosfer, plastic sampel, NaCl fisiologis 9%, Aquades, Alkohol 70%, E. coli, MHA, ISP2, NB, immersion oil, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KOH 3%, Cloramphenicol, Nystatin, Crystal violet, iodine, decolorizer, safranin, spirtus, kertas HVS, masker, gloves, alumunium foil, kain kasa, kapas.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolate bakteri *Actinomyces* yang diambil dari rizosfer mangrove *Rhizophora mucronata*. Pengambilan sampel rizosfer dilakukan secara acak di 1 stasiun dengan pengambilan sampel pada 3 titik kedalaman yang berbeda. Kedalaman 1 dengan rentang 0-5 cm, kedalaman 2 yaitu 5-10 cm dan kedalaman 3 antara 10-15 cm dari permukaan sedimen. Pengambilan sampel rizosfer dengan berbagai variasi kedalaman bertujuan untuk memaksimalkan potensi rizosfer yang terdapat bakteri *Actinomyces* yang bervariasi pula. 3 titik pengambilan sampel diukur Ph, suhu dan salinitas menggunakan pH soil, dan Refraktometer, kemudian rizosfer yang didapat diambil menggunakan alat congkel dan dimasukkan ke wadah plastic sampel sesuai kode. Sampel kemudian dikeringkan (diangin-anginkan) dibawah sinar matahari selama 5-7 hari supaya kering dan mengantisipasi pertumbuhan mikroba lainnya. Isolasi *Actinomyces* dilakukan di Laboratorium Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo. Rizosfer yang diambil selanjutnya ditimbang sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml NaCl fisiologis 9%. Sampel selanjutnya di vortex hingga homogen ( $10^{-1}$ ). Kemudian lakukan serial delution hingga tingkat pengenceran ( $10^{-6}$ ). Media yang digunakan yaitu *Yeast Malt Agar Nomor 2* dan dituang ke dalam cawan petri steril. Kemudian mengisolasi sampel pengenceran  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  (duplo) sebanyak 0,1 ml ke dalam cawan petri secara spread plate dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C.

Tahapan dilanjutkan dengan melakukan karakterisasi makroskopis yakni mengidentifikasi karakteristik koloni pada setiap isolate, kemudia dilakukan pemurnian (purifikasi) pada setiap karakter koloni untuk memperoleh isolate murni. Isolate terbetuk kemudian dilakukan karakterisasi mikroskopis yakni gram staining untuk mengetahui karakteristik bentuk bakteri dan warna dan dilanjutkan dengan uji Antibiotik menggunakan metode *Agar Well Difussion* serta uji biokimia yakni uji KOH3% untuk mengetahui apakah isolate *Actinomyces* mengandung lender atau tidak.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Hasil pengukuran kualitas air sedimen

Kedalaman	pH	Salinitas	Suhu
0-5 cm	5,1	34 ppt	29 <sup>0</sup> C
5-10 cm	10,8	32 ppt	29 <sup>0</sup> C
10-15 cm	4,5	33 ppt	30 <sup>0</sup> C

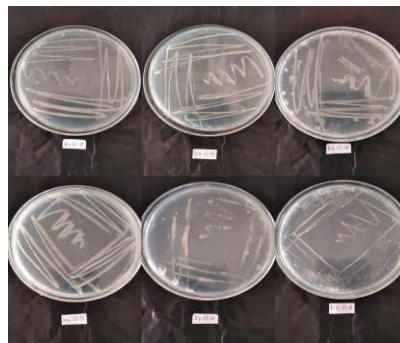
Pengukuran kualitas air sedimen diambil 3 parameter meliputi pH, salinitas dan suhu. pH sedimen diukur menggunakan pH soil dan didapat hasil yang bervariasi dengan nilai tertinggi pada tingkat kedalaman 5-10 cm yang perbedaannya cukup signifikan dengan kedua titik lainnya. Salinitas di wilayah rizosfer mangrove tergolong tinggi yakni 33-34 ppt dengan nilai tertinggi pH pada kedalaman 0-5 cm. Nilai suhu diperoleh nilai tertinggi yakni 30<sup>0</sup>C pada tingkat kedalaman 10-15 cm.

Tabel 2. Karakterisasi Makroskopis

Pengenceran	Isolat	Karakter			
		Substrat Miselium	Aerial Miselium	Pigmen	Elevation
RK1.-4.1	K1.CI.A	Cream	Cream	Pigmented	Raised
	K1.CI.B	Grey	White	Non pigmented	Umbonate
	K1.CI.C	<i>Non bacterial Actinomycetes (Slimy)</i>			
RK1.-4.2	K1.CI.D	Orange	Orange	Pigmented	Convex
RK1.-5.1	K1.CI.A	Cream	Cream	Pigmented	Raised
	K1.CI.B	Grey	White	Non pigmented	Umbonate
	K1.CI.C	<i>Non bacterial Actinomycetes (Slimy)</i>			
RK1.-5.2	K1.CI.A	Cream	Cream	Pigmented	Raised
	K1.CI.B	Grey	White	Non pigmented	Umbonate
	K1.CI.C	<i>Non bacterial Actinomycetes (Slimy)</i>			
RK1.-6.1	K1.CI.A	Cream	Cream	Pigmented	Raised
	K1.CI.C	<i>Non bacterial Actinomycetes (Slimy)</i>			
RK1.-6.2	K1.CI.A	Cream	Cream	Pigmented	Raised
	K1.CI.B	Grey	White	Non pigmented	Umbonate
RK2.-4.1	K2.CI.B	Grey	White	Non pigmented	Umbonate
RK2.-4.2	K2.CI.A	Cream	Cream	Pigmented	Raised
	K2.CI.B	Grey	White	Non pigmented	Umbonate
RK2.-5.1	K2.CI.A	Cream	Cream	Pigmented	Raised
	K2.CI.B	Gray	White	Non pigmented	Umbonate
	K2.CI.C	<i>Non bacterial Actinomycetes (Slimy)</i>			
RK2.-5.2	K2.CI.A	Cream	Cream	Pigmented	Raised
	K2.CI.B	Grey	Grey	Non pigmented	Umbonate
	K2.CI.C	<i>Non bacterial Actinomycetes (Slimy)</i>			
RK2.-6.1	K2.CI.A	Cream	Cream	Pigmented	Raised
	K2.CI.B	Grey	White	Non pigmented	Umbonate
	K2.CI.C	<i>Non bacterial Actinomycetes (Slimy)</i>			
RK2.-6.2	K2.CI.A	Cream	Cream	Cream	Raised

	K2.CI.C	<i>Non bacterial Actinomycetes (Slimy)</i>			
RK3.-4.1	K3.CI.A	Cream	Cream	Cream	Raised
	K3.CI.B	Grey	White	White	Umbonate
	K3.CI.C	<i>Non bacterial Actinomycetes (Slimy)</i>			
RK3.-4.2	K3.CI.A	Cream	Cream	Pigmented	Raised
	K3.CI.B	Grey	White	Non pigmented	Umbonate
	K3.CI.C	<i>Non bacterial Actinomycetes (Slimy)</i>			
RK3.-5.1	K3.CI.A	Cream	Cream	Pigmented	Raised
	K3.CI.B	Grey	White	Non pigmented	Umbonate
RK3.-5.2	K3.CI.B	Grey	White	Non pigmented	Umbonate
	K3.CI.C	<i>Non bacterial Actinomycetes (Slimy)</i>			
RK3.-6.1	K3.CI.A	Cream	Cream	Pigmented	Raised
	K3.CI.B	Grey	White	Non pigmented	Umbonate
RK3.-6.2	K3.CI.A	Cream	Cream	Pigmented	Raised
	K3.CI.B	Grey	White	Non pigmented	Umbonate

Tahap pengelompokan karakteristik morfologi koloni didapat 4 koloni dengan karakteristik yang berbeda yaitu isolate yang berkode CI.A., CI.B., CI.C., CI.D. Hasil karakterisasi yang telah diperoleh kemudian dilanjutkan pemurnian (purifikasi) untuk mendapatkan isolate murni. Isolat CI.C merupakan *Non bacterial Actinomycetes (Slimy)*. Faktor yang mempengaruhi tumbuhnya isolate tersebut diduga terjadinya kontaminasi pada proses inokulasi.



Tabel 3. Pewarnaan Gram

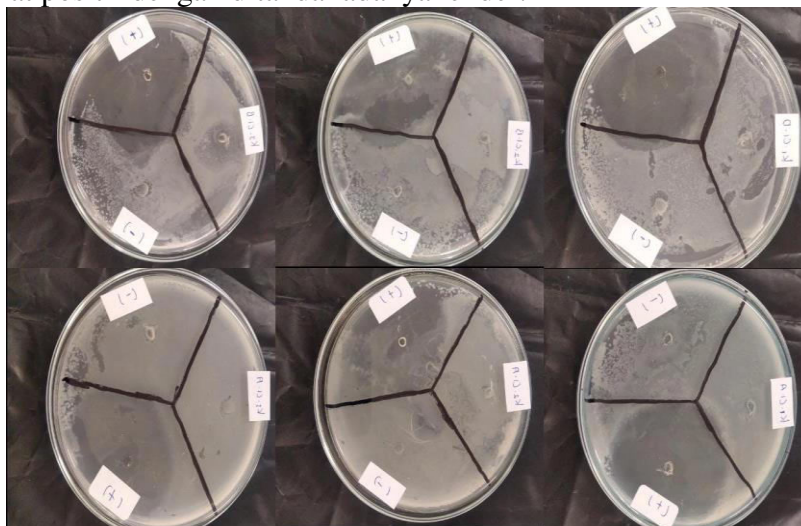
No.	Kode Isolat	Bentuk	Gram
1.	K1.CI.A	Basil	+
2.	K1.CI.D	Basil	+
3.	K2.CI.A	Basil	+
4.	K2.CI.B	Basil	+
5.	K3.CI.A	Basil	+
6.	K3.CI.B	Basil	+

Hasil uji pewarnaan gram bakteri *Actinomycetes* diperoleh 6 isolat positif. Indikasi positif diperoleh dari perubahan warna bakteri menjadi ungu. Perubahan warna ini dikarenakan bakteri gram positif mempunyai peptidoglikan (dinding sel) yang tebal sehingga ketika ditetaskan warna sekunder (safranin) mampu mempertahankan zat warna *crystal violet*. Menurut Tyas (2020) Bakteri *Actinomycetes* merupakan bakteri yang bersifat positif.

Tabel 4. Uji Biokimia

No.	Kode Isolat	Katalase	KOH 3%
1.	K1.CI.A	-	+
2.	K1.CI.D	-	+
3.	K2.CI.A	-	+
4.	K2.CI.B	+	+
5.	K3.CI.A	-	+
6.	K3.CI.B	+	+

Hasil uji katalase menunjukkan bahwa terdapat 2 isolat bersifat positif dan 4 isolat bersifat negatif. Hasil uji katalase positif ditunjukkan oleh kode sampel K2.CI.B dan K3.CI.B. Hasil uji katalase negative ditunjukkan pada isolate dengan kode K1.CI.A., K1.CI.D., K2.CI.A., K2.CI.A. Tanda isolat yang bersifat positif ditunjukkan terbentuknya gelembung udara ketika sampel ditetaskan dengan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Menurut Damayanti *et al* (2020) hasil positif pada isolate ditandai bahwa bakteri tersebut mampu menghasilkan enzim katalase. Fungsi dari enzim katalase yaitu untuk mengkatalisis senyawa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menjadi senyawa H<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub>. Isolat yang bersifat negative tidak ditandai dengan terbentuknya gelembung udara pada isolat saat ditetesi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> di kaca preparat (Pulungan dan Tumangger, 2018). Uji KOH 3% menunjukkan semua isolate bersifat positif dengan ditandai adanya lender.



Hasil uji antibakteri terhadap 6 isolat *Actinomycetes* menggunakan metode *Agar Well Difussion*. Penggunaan metode ini dikarenakan sangat cocok untuk bakteri *Actinomycetes* karena memiliki hifa atau benang-benang halus. Metode ini dilakukan dengan pencongkelan media agar yang kemudian isolate kultur cair dimasukkan kedalam lubang media uji yang telah di swab dengan bakteri patogen, sehingga kultur cair bakteri *Actinomycetes* didapatkan hifa *Actinomycetes* dan tidak tertinggal pada media sebelumnya (Ramadhani dan Sulistyan, 2018). Hasil pengujian Antibakteri selama inkubasi 7 hari pada bakteri patogen *E.coli* menunjukkan hasil bahwa bakteri

*Actinomyces* mampu menghambat bakteri patogen *E.coli* dengan didapat pada isolate K1.CI.A., K1.CI.D., K2.CI.A., K2.CI.B., dan K3.CI.A dengan kemampuan sangat rendah karena ditunjukkan adanya zona bening. Lebar zona bening pada kelima isolate tersebut sangat kecil sehingga memiliki kemampuan sangat rendah. Isolat K3.CI.B menunjukkan zona bening yang cukup lebar sehingga isolate tersebut memiliki kemampuan antibakteri medium. Hasil uji dengan control negative menggunakan aquabides tentu tidak terdapat zona bening sedangkan kontrol positif menggunakan kloramfenikol didapatkan mampu menghambat bakteri *E.coli* dengan ditandai zona bening yang lebar.

#### IV. KESIMPULAN

Hasil uji antibakteri terhadap *Actinomyces* menggunakan bakteri patogen *E.coli* menggunakan metode *Agar Well Diffusion*. Hasil pengujian diperoleh bahwa 6 isolat *Actinomyces* mampu menghambat bakteri *E.coli* karena ditemukan zona bening disekitar isolat. Hasil uji pewarnaan gram diperoleh 6 isolat bersifat positif, sedangkan uji biokimia menggunakan 2 jenis uji yaitu uji katalase dan uji KOH 3%. Hasil uji katalase diperoleh 2 isolat positif, sedangkan uji KOH3% diperoleh hasil 6 isolat positif.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Damayanti, SS, Komala, O. and Effendi, M, 2020. Identifikasi bakteri dari pupuk organik cair isi rumen sapi. *Ekologia: Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar dan Lingkungan Hidup* , 18 (2), hlm.63-71.
- Fitriah, E., Maryuningsih, Y., Chandra, E., & Mulyyani, A. (2013). Studi Analisis Pengelolaan Hutan Mangrove Kabupaten Cirebon. *Jurnal Scientiae Educatia*, 2(2), 1–18.
- Hamidah, H., Ambarwati, SP dan Indrayudha, P., 2013. Isolasi dan identifikasi isolat *actinomyces* dari rizosfer padi (*Oryza sativa* L.) Sebagai Penghasil Antifungi (Disertasi Doktor, Universitas Muhammadiyah Surakarta).
- Hati, EK, 2020. Gambaran Angka Lempeng Total (ALT) Pada Bakteri *Escherichia coli*. ATTC 25922 Sebelum dan Sesudah Diliofilisasi dan Disimpan Selama 30 Hari pada Suhu 40C (Disertasi Doktor, Poltekkes Kemenkes Yogyakarta).
- Khairunnisa, C., Thamrin, E., & Prayogo, H. (2020). KEANEKARAGAMANJENIS VEGETASI MANGROVE DI DESA DUSUN BESAR KECAMATANPULAU MAYA KABUPATEN KAYONG UTARA (Species Diversity)
- Pratiwi, RH, 2017. Mekanisme pertahanan bakteri patogen terhadap antibiotik. *Jurnal pro-kehidupan* , 4 (3), hal.418-429.
- Pulungan, ASS dan Tumangger, DE, 2018. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Endofit Penghasil Enzim Katalase dari Daun Buasbuas (*Premnapubescens* Blume). *BIOLINK (Jurnal Biologi Lingkungan Industri Kesehatan)* , 5 (1),hlm.71-80.
- Ramadhani, MA and Sulistyan, NS, 2018. Uji Aktivitas Isolat *Actinomyces* (Kode Gst, Kp, Kp11, Kp16, T24, Dan T37) Terhadap *Staphylococcus Aureus* Atcc 25923 Dan *Escherichia Coli* Atcc 25922. *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product* , 1 ( 2).

Tyas, SP, 2020. Optimasi Pertumbuhan Isolat Actinomycetes (Isolat TE 235) dan Uji Aktivitas terhadap Bakteri Escherichia coli dan Staphylococcus aureus (Disertasi Doktor, Skripsi, Universitas Muhammadiyah Magelang).