

## V. HASIL DAN PEMBAHASAN

### V.1 Seleksi aktinomisetes yang memiliki aktivitas terhadap *R. Solani*

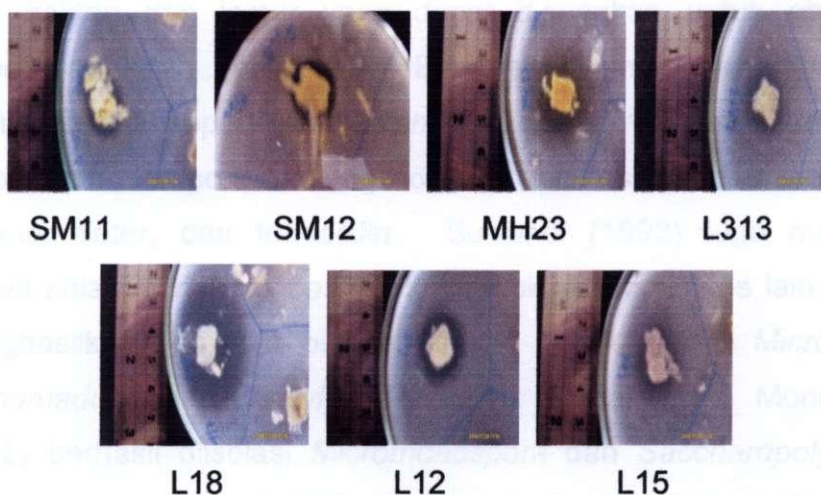
Aktinomistes koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA UNRI yang berasal dari tanah gambut Riau ada 41 isolat. Setelah dilakukan peremajaan hanya 20 isolat yang berhasil diremajakan. Hal ini mungkin disebabkan karena salah satu sifat dari aktinomisetes yaitu pertumbuhan yang sangat lambat, umumnya membutuhkan masa inkubasi 7-14 hari. Masa inkubasi yang lama ini menyebabkan seringnya biakan aktinomisetes terkontaminasi oleh jamur/bakteri lain. Setelah pertumbuhannya stabil dilakukan seleksi masing-masing isolat terhadap jamur patogen *R. Solani* dengan metode *agar disk*. Hasil pengujian diperoleh 7 isolat yang memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan *R. solani*. Hasil seleksi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 2 Hasil seleksi daya hambat aktinomisetes terhadap pertumbuhan *R.solani*

| Kode isolat | Zona bening (cm) |
|-------------|------------------|
| Isolat L18  | 3.2              |
| Isolat L223 | -                |
| Isolat L421 | -                |
| Isolat L11  | -                |
| Isolat L12  | 2.1              |
| Isolat L15  | 2.1              |
| Isolat L17  | -                |
| Isolat L121 | -                |
| Isolat L513 | -                |
| Isolat L221 | -                |
| Isolat L313 | 1.0              |
| Isolat SM11 | 2.1              |
| Isolat SM12 | 1.9              |
| Isolat SM13 | -                |
| Isolat SM14 | -                |
| Isolat SM15 | -                |
| Isolat SM16 | -                |
| Isolat SM17 | -                |
| Isolat MH23 | 2.2              |
| Isolat MH11 | -                |

Ket: ( - ) tidak memiliki aktivitas

Aktinomisetes dikenal sebagai penghasil metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkannya mampu menghambat pertumbuhan jamur yang sangat merugikan. Aktinomisetes yang memiliki aktivitas ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar isolat aktinomisetes. Artinya pertumbuhan aktinomisetes tersebut mampu menghambat pertumbuhan jamur patogen *R.solani*. Zona bening yang terbentuk menunjukkan bahwa isolat aktinomisetes termasuk isolat yang potensial menghasilkan senyawa antifungi. Isolat aktinomisetes yang mampu menghambat pertumbuhan *R. solani* tadalah isolat L18, L12, L15, L313, SM11, SM12 dan LMH23. Tidak semua isolat aktinomisetes yang mampu menghambat *R. solani*. Hal ini disebabkan karena tidak semua aktinomisetes mampu menghambat pertumbuhan jamur target seperti *R. solani*. Diduga metaboli sekunder (bioaktif) yang dimiliki aktinomisetes yang diuji tidak mampu menghambat pertumbuhan jamur target atau aktinomisetes yang diujikan tidak mampu menghasilkan senyawa bioaktif terhadap jamur target. Masing-masing aktinomisetes memiliki mekanisme serangan yang berbeda terhadap jamur target. Kemampuan daya hambat masing-masing isolat aktinomisetes terhadap *R. solani* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1 Aktivitas Isolat Aktinomisetes dengan jamur *R.solani* dalam medium CGA

Hasil penelitian Linda (2006) isolat aktinomisetes L18, L11, L12 dan L15 tidak memiliki aktivitas terhadap *R.solani* dengan metode penumbuhan antara aktinomisetes dan jamur target serentak dalam medium PDA. Sebaliknya, isolat L223 dan L421 uji sebelumnya memiliki aktivitas masing-masing 4 mm dan 2 mm. Dugaan, pertama isolat L223 dan L421 tidak stabil dalam memproduksi senyawa antifungi, kedua isolat L223 dan L421 waktu produksi senyawa bioaktifnya sebelum hari ke-7. Sedangkan isolat L18, L11, L12 dan L15 dengan metode *agar disk*, aktinomisetes yang diinkubasi selama 7 hari pada medium CGA produksi senyawa antifungi lebih baik. Hal ini disebabkan karena pertumbuhan aktinomisetes pada umumnya membutuhkan waktu 7-14 hari.

Menurut Kenneth (2000) mekanisme serangan senyawa antimikroba yang dihasilkan aktinomisetes berbeda-beda terhadap mikroba target, seperti *Streptomyces orientales* penghasil vankomisin mampu menghambat pembentukan dinding sel dari mikroba target, *Micromonospora* penghasil gentamisin mampu menghambat proses sintesis protein, *Streptomyces noursei* penghasil nistatin mampu merusak membran sitoplasma dan *Nocardia mediterranei* penghasil rifampisin mampu menghambat proses replikasi sel.

Hwang *et al.* (1994) lebih dari 4000 senyawa antibiotik dihasilkan oleh bakteri dan jamur yang dapat digunakan untuk obat manusia, peternakan dan pertanian. Penghasil umumnya dari kelompok aktinomisetes, seperti *Streptomyces* sp. yang banyak menghasilkan antibiotik kelompok aminoglikosida, makrosida,  $\beta$ -laktam, peptida, polienapolieter, dan tetrasiklin. Suwandi (1993) juga menambahkan bahwa selain *Streptomyces* sp. kelompok aktinomisetes lain yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif adalah *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Actinomadura*, dan *Dactylosporangium*. Dipihak lain, Moncheva *et al.* (2002) berhasil diisolasi *Micromonospora* dan *Saccharopolyspora* yang merupakan sumber antibiotik dari kelompok makrolida, *Actinomadura* sp. dan *Amycolatopsis* yang dikenal sebagai *Nocardia* mampu menghasilkan antibiotik vankomisin sejenis glikopeptida, dan antibiotik naftasin-quinon.

Augustine *et al.* (2005) mengatakan bahwa kemampuan aktinomisetes dalam menghambat pertumbuhan jamur target disebabkan karena aktinomisetes mampu menghasilkan senyawa antimikroba yang dapat bersifat fungisida. Menurut Suwanto (1994) mekanisme serangan senyawa antifungi dalam menekan pertumbuhan jamur target dapat disebabkan oleh produksi asam organik dan siderofor (protein pengkelat besi). Kemungkinan penyebab lain adalah karena dihasilkannya enzim kitinase dari aktinomisetes yang dapat melisis dinding sel dari jamur patogen. Meryandini *et al.* (2004) menjelaskan bahwa enzim kitinase banyak dihasilkan oleh aktinomisetes, sehingga akan menjadi kontrol biologi yang efektif.

Zona bening yang terbentuk dari masing-masing isolat potensial aktinomisetes terhadap pertumbuhan *R. solani* memperlihatkan diameter zona bening yang beragam. Penyeleksiaan menggunakan metode *agar disk* diperoleh daya hambat terbesar pada isolat L18 yaitu sebesar 3.2 cm dan yang terendah pada isolat L313 yaitu 1 cm. Ukuran diameter zona bening yang terbentuk sangat menentukan kemampuan daya hambat dari masing-masing isolat. Semakin besar diameter zona bening yang terbentuk, maka semakin besar pula kemampuan aktinomisetes untuk menghambat pertumbuhan *R. solani*. Hasil penelitian Yuan dan Crawford 1995 aktivitas *S. lydicus* WYEC108 terhadap *R. solani* sebesar 2,0 cm dengan masa inkubasi 5 hari. Zona bening yang terbentuk merupakan hasil dari metabolisme sekunder berupa senyawa bioaktif yang mampu menghambat pertumbuhan *R. solani*. Hasil analisa uji nilai tengah ke 7 isolat dapat dikelompokkan seperti pada Tabel 3.

Tabel 3 Aktivitas zona bening dari analisa uji nilai tengah

| Kode isolat | Zona bening (cm) | Kriteria |
|-------------|------------------|----------|
| Isolat L313 | 1.0              | Rendah   |
| Isolat SM12 | 1.9              | Sedang   |
| Isolat SM11 | 2.1              | Sedang   |
| Isolat L15  | 2.1              | Sedang   |
| Isolat L12  | 2.1              | Sedang   |
| Isolat MH23 | 2.2              | Sedang   |
| Isolat L18  | 3.2              | Tinggi   |

Pengelompokkan isolat aktinomisetes berdasarkan uji nilai tengah (median) dibagi atas kriteria tinggi, sedang dan rendah. Isolat aktinomisetes yang memiliki kriteria tinggi ( $>2.32$  cm) yaitu isolat L18 dengan persentase sebesar 21.92%. Isolat dengan kriteria sedang (1,5-2,32 cm) sebanyak 71.23% terdapat pada isolat SM12, SM11, L15, L12 dan MH23. Isolat aktinomisetes yang termasuk ke dalam kriteria rendah ada sebanyak 6.85% yaitu L313 sebesar ( $<1.5$  cm).

## V.2 Aktivitas aktinomisetes menggunakan medium fermentasi

Aktinomisetes yang diketahui memiliki aktivitas terhadap *R.solani* selanjutnya dilakukan pengujian tahap kedua dengan menggunakan media fermentasi. Uji dalam media fermentasi untuk melihat pada hari ke berapa aktinomisetes memiliki aktivitas tertinggi. Aktivitas aktinomisetes dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4 Aktivitas aktinomisetes dalam medium fermentasi terhadap *R.solani* dengan metode sumur agar

| Kode isolat  | Aktivita (cm) |      |      |       |       |       |       |
|--------------|---------------|------|------|-------|-------|-------|-------|
|              | 7 hr          | 8 hr | 9 hr | 10 hr | 11 hr | 12 hr | 13 hr |
| Isolat L18   | 2.1           | 2.4  | 3.3  | 4.5   | 3.5   | 2.5   | 1.3   |
| Isolat SM 11 | 1.2           | 1    | 0.7  | -     |       |       |       |
| Isolat L313  | 0.9           | 1.3  | 1.9  | 2.3   | 2.0   |       |       |
| Isolat L12   | -             | 3.5  | 3.7  | 4.1   | 2.0   |       |       |
| Isolat L15   | -             | -    | -    | -     | -     | -     | -     |
| Isolat MH23  | -             | 2.0  | 3.1  | 2.9   |       |       |       |
| Isolat SM12  | -             | -    |      |       |       |       |       |

Menurut Pelczar & Chan (1993) ada 6 faktor yang mempengaruhi daya kerja senyawa antimikroba yaitu (a) konsentrasi atau intensitas bahan antimikroba; (b) jumlah mikroorganisme; (c) suhu; (d) spesies mikroorganisme; (e) adanya bahan organik; dan (f) keasaman atau kebasaan (pH). Selain itu, masa inkubasi juga mempengaruhi produksi

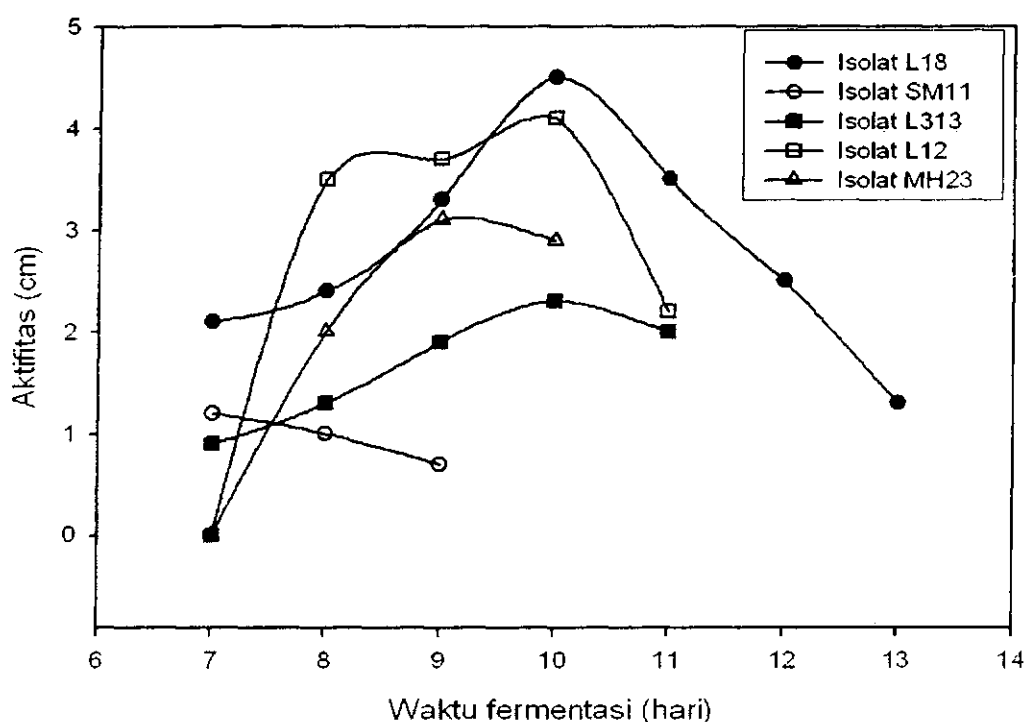
senyawa bioaktif. Hal ini mendorong peneliti untuk melanjutkan penelitian lebih jauh sehingga potensi aktinomisetes yang mengandung senyawa bioaktif dapat dikembangkan.

Hasil yang diperoleh masing-masing isolat berbeda lama inkubasi. Aktivitas tertinggi masing-masing isolat dalam medium fermentasi adalah L18 (4,5 cm), SM11 (1,2 cm), L313 (2,3 cm), L12 (4,1 cm), MH23 (3,1 cm). Uji dalam medium fermentasi tidak semua isolat aktinomisetes memiliki aktivitas yaitu isolat L15 dan SM12. Hal ini diduga senyawa bioaktif yang dihasilkan isolat tidak dalam jumlah banyak sehingga konsentrasinya tidak mampu menghambat jamur target, selain itu diduga waktu produksi senyawa bioaktif kedua isolat sebelum hari ke-7. Ke lima isolat yang memiliki aktivitas pada medium fermentasi empat diantaranya aktivitasnya lebih tinggi dari aktivitas mempergunakan metode *agar disk* yaitu isolat L18, L11, L313, dan MH23, sedangkan untuk isolat SM11 aktivitasnya menurun. Diduga senyawa bioaktif untuk isolat SM11 diproduksi sebelum hari ke 7. Hal ini dapat diatasi dalam penelitian berikutnya dengan optimalisasi sehingga produk metabolisme yang dihasilkan lebih optimal (waktu, medium, aerasi dan pH medium). Menurut Panday *et al.* 2002 selama seleksi metabolit sekunder, aktinomisetes sering dijumpai memiliki aktivitas terhadap mikroba pada medium padat, tapi tidak memiliki aktivitas pada medium fermentasi. Zona bening yang dihasilkan menggunakan medium fermentasi dengan metode difusi agar dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Aktivitas Aktinomisetes dalam medium cair terhadap *R.solani* dengan metode difusi agar

Masing-masing isolat aktinomisetes memiliki waktu produksi senyawa bioaktif yang berbeda-beda. Hasil penelitian Shahrokhi *et al.* 2005 aktivitas *S.olivaceus* strain 115 terhadap *R. solani* menghasilkan senyawa bioaktif tertinggi 2,0 cm pada masa inkubasi 7 hari menggunakan medium CG cair inkubasi pada 30°C, 130 rpm. Gambar 3 di bawah ini memperlihatkan waktu inkubasi optimal dari masing-masing isolat aktinomisetes uji. Isolat L18, L12 dan L313 produksi senyawa aktif tertinggi pada waktu inkubasi 10 hari, SM11 dan MH23 masing-masing pada hari ke 7 dan ke 9.



Gambar 3 Aktivitas masing-masing isolat aktinomisetes dalam medium fermentasi terhadap *R. solani*

Isolat aktinomisetes yang memiliki senyawa bioaktif dapat digunakan untuk mengatasi penyakit rebah semai (*damping-off*) yang disebabkan oleh *R. Solani* pada tanaman sawi dan cabe. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dilanjutkan pada penelitian selanjutnya yang bertujuan mengisolasi dan mengetahui jenis, sifat senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh aktinomisetes terpilih yang bersifat anti jamur patogen *R.*

*solani* dan menguji masing-masing senyawa bioaktif dengan jamur target *R.solani* secara in vitro. Dengan demikian dimasa yang akan datang aktinomisetes yang mengandung senyawa bioaktif diharapkan dapat menjadi alternatif pengganti fungisida untuk menangani tanaman sawi dan cabe yang diserang oleh jamur patogen *R. Solan*. Sehingga diperoleh produk pertanian sawi dan cabe yang organik.

## V.2 Karakterisasi Aktinomisetes penghasil senyawa bioaktif

Morfologi isolat aktinomisetes asal tanah gambut hasil seleksi pada medium CGA dapat dilihat pada Gambar 4.



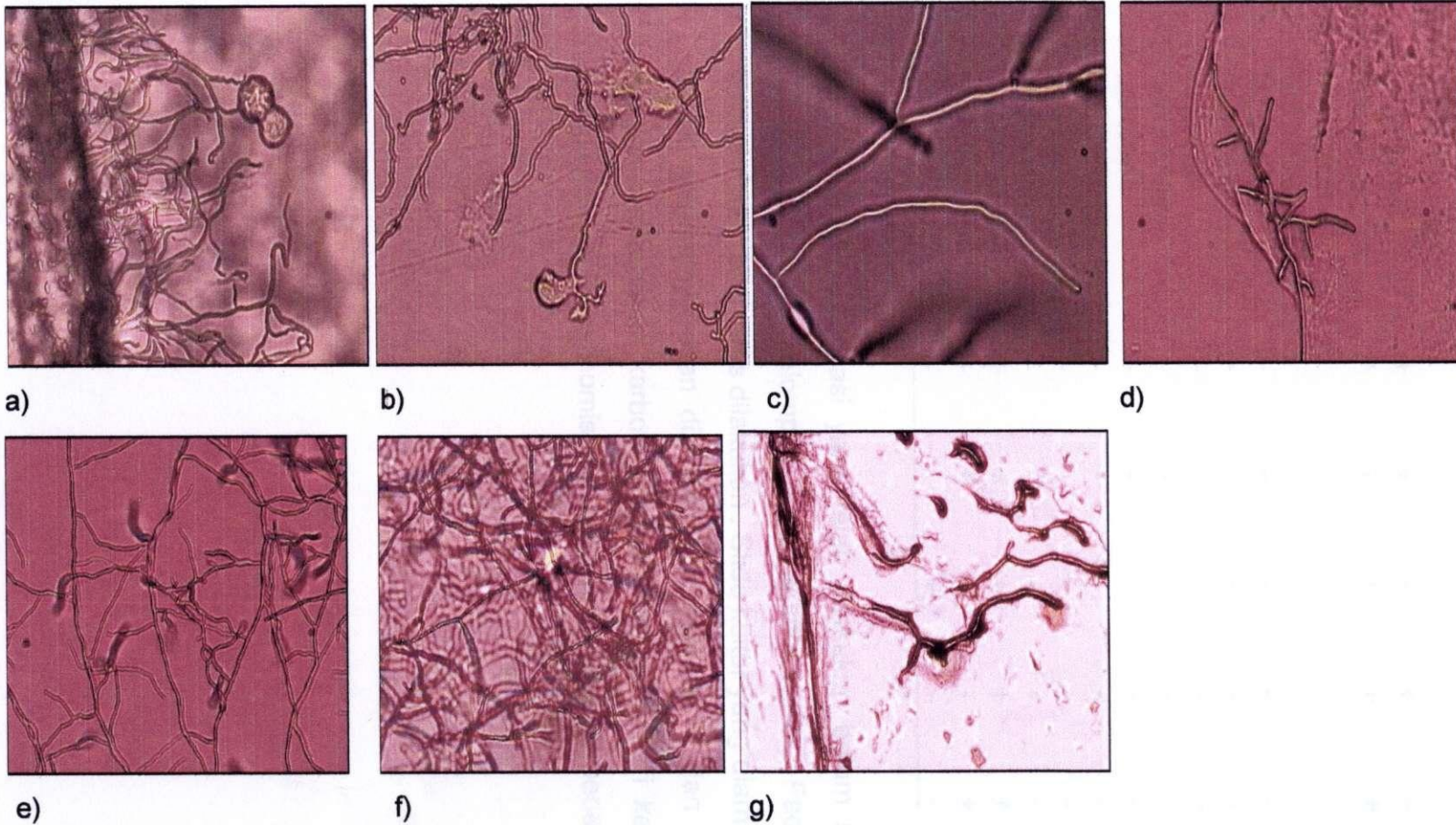
Gambar 4 Pertumbuhan isolat aktinomisetes dalam medium agar

Pada medium CGA setelah berumur 7 hari terjadi perubahan warna. Isolat aktinomisetes L12, L15, L18, SM11 dan SM12 inkubasi 3 hari berwarna putih. Isolat MH23 berwarna kuning, diduga menghasilkan melanin, isolat L313 berwarna krem. Setelah hari ke 7-15, L12 berserbuk abu-abu sampai kehitaman, L15 berserbuk putih, L18 berserbuk putih sampai kecoklatan, SM11 dan SM12 berserbuk putih sampai abu-abu, MH23 berserbuk putih sampai kecoklatan, dan L313 berserbuk putih. Umumnya warna yang dihasilkan dari masing-masing isolat aktinomisetes yaitu putih yang pada akhirnya akan berubah jika umur koloni makin dewasa dengan permukaan yang bertepung. Ketujuh isolat berbau serah

atau tanah yang diduga mengeluarkan senyawa geosmin (Alexander, 1977). Terjadi perubahan warna koloni setelah pengamatan 7-14 hari karena aktinomisetes mampu menghasilkan zat-zat warna hasil pigmentasi yang dapat melarut ke dalam medium dengan warna dan intensitas yang berbeda-beda tergantung dari komposisi medium (Sutedjo *et al.* 1991). Pada medium GYEA, isolat yang tumbuh lebih dominan berwarna coklat. Untuk medium GAA, isolat yang tumbuh lebih menunjukkan warna-warna yang terang yaitu warna kemerahan dan orange, selain itu isolat agak cepat pertumbuhannya. Pada medium SCA semua isolat mampu tumbuh.

Pertumbuhan aktinomisetes dapat dipengaruhi oleh medium, waktu inkubasi, pH dan suhu. Penelitian tentang aktinomisetes khususnya *Streptomyces* banyak menggunakan medium *International Streptomyces Project* (ISP). Li *et al.* (2004) menggunakan 7 medium untuk melihat karakteristik aktinomisetes strain YIM 31530<sup>T</sup> berdasarkan miselium aerial dan miselium substrat serta warna yang terlarut yaitu ISP medium 2, ISP medium 3, ISP medium 4, ISP medium 5, Czapek's agar, Potato agar dan Nutrien agar. Pandey *et al.* (2002) telah melakukan penelitian menggunakan medium SCA dan GAA dan didapatkan 461 aktinomisetes yang diisolasi dari 575 sampel tanah dari daerah Khumbu. Medium SCA dapat dikelompokkan ke medium ISP 4 yaitu *Inorganik Salt Starch Agar* yang dimodifikasi dengan penambahan kasein sebagai sumber nitrogen asam amino.

Pengamatan dari *slide* kultur dapat dilihat pada Gambar 5. Isolat aktinomisetes diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 400x terlihat aktinomisetes memiliki filamen seperti jamur. Namun filamen yang dimiliki aktinomisetes tidak bersekat seperti jamur-jamur pada umumnya. Karakterisasi isolat aktinomisetes dapat dilihat pada Tabel 5.



Gambar 4. Pengamatan isolat aktinomisetes dengan mikroskop cahaya (400x) . a) SM12 ; b) SM11 ; c) MH23 ; d) L313 ; e) L18; f) L12 dan g) L15 (40x).

Tabel 4. Karakterisasi Aktinomisetes yang tahan terhadap *R. solani*

| Karakteristik              | SM12 | SM11 | MH23 | L313 | L18 | L12 | L15 |
|----------------------------|------|------|------|------|-----|-----|-----|
| Rantai spora               | -    | -    | -    | -    | -   | +   | -   |
| Produksi enzim:            |      |      |      |      |     |     |     |
| • Protease                 | +    | +    | +    | +    | +   | +   | +   |
| • Amilase                  | +    | +    | +    | +    | +   | +   | *   |
| Perombakan Karbon (5 hari) |      |      |      |      |     |     |     |
| Selobiosa                  | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   |
| Dextrosa                   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   |
| Fruktosa                   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   |
| Galaktosa                  | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   |
| Laktosa                    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   |
| Manitol                    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   |
| Sukrosa                    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   |
| Xilosa                     | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   |
| Tween 80                   | +    | +    | +    | +    | +   | +   | *   |
| Gelatin                    | +    | +    | +    | -    | +   | +   | -   |
| Melanin                    | -    | -    | +    | -    | -   | -   | -   |

\*: tidak terdeteksi

Hasil karakterisasi yang telah dilakukan belum mencukupi data untuk menentukan kelompok isolat aktinomisetes. Pada tahun kedua karakterisasi akan terus dilakukan. Slide kultur yang diamati baru berumur 5 hari selanjutnya akan diamati pada hari ke 14 dan 21. Begitu juga dengan perombakan karbon akan diamati pada hari ke 7, 14 dan 21. Diduga ke-7 isolat aktinomisetes endogenus Riau berbeda spesies.