



Biologi

ACTINOBACTERIA

Alimuddin Ali & Herlina Rante

BIOLOGI ACTINOBACTERIA

nasmedia
PENERBIT ANGGOTA IKAPI

Batua Raya No. 550 Makassar 90233
Tajem Baru No. 11 Yogyakarta 55281
+62812 1313 3800
redaksi@nasmediapustaka.id
www.nasmediapustaka.co.id
www.nasmedia.id

ISBN 978-623-6093-41-2



9 786236 093412



Dr. Alimuddin Ali
(Jurusan Biologi FMIPA UNM)

Dr. Apt. Herlina Rante
(Fakultas Farmasi UNHAS)

Biologi

ACTINOBACTERIA

Sanksi Pelanggaran Hak Cipta
UNDANG-UNDANG REPUBLIK INDONESIA
NOMOR 28 TAHUN 2014 TENTANG HAK CIPTA

Ketentuan Pidana

Pasal 113

- 1) Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
- 2) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).
- 3) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
- 4) Setiap Orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).

Biologi

ACTINOBACTERIA

Dr. Alimuddin Ali

(Jurusan Biologi FMIPA UNM)

Dr. Apt. Herlina Rante

(Fakultas Farmasi UNHAS)

BIOLOGI ACTINOBACTERIA

Dr. Alimuddin Ali
Dr. Apt. Herlina Rante

Copyright © Alimuddin, Herlina 2021
All rights reserved

Layout : Rizaldi Salam
Desain Cover : Muhammad Alim

Image Cover
Freepik.com

Cetakan Pertama, April 2021
xvi + 214 hlm; 15,5 x 23 cm
ISBN 978-623-6093-71-9

Diterbitkan oleh Penerbit Nas Media Pustaka

PT. Nas Media Indonesia

Anggota IKAPI

No. 018/SSL/2018

Jl. Batua Raya No. 550, Makassar 90233

Jl. Tajem Baru No. 11, Yogyakarta 55281

Telp. 0812-1313-3800

redaksi@nasmedia.id

www.nasmediapustaka.co.id

www.nasmedia.id

Instagram : @nasmedia.id

Fanspage : nasmedia.id

Dicetak oleh Percetakan CV. Nas Media Pustaka

Isi di luar tanggung jawab percetakan

KATA PENGANTAR

Seringnya terjadi kesalahan dalam memahami Actinomycetes (Actinobacteria) sebagai fungi (Jamur) menyebabkan kedudukan mikroba ini baik dalam taksonomi maupun pengertian yang dipahami oleh masyarakat akademik ikut menjadi rancu. Penggunaan kata *mycetes* yang membangun istilah itu menjadi faktor utama penyebab kekeliruan tersebut. Atas dasar itulah buku referensi ini disusun sebagai acuan dasar mahami seluk beluk tentang Actinomycetes (Actinobacteria). Memang tidak semua aspek kajian Actinobacteria dapat diulas dalam buku ini mengingat beragam dan pesatnya perkembangan penelitian tentang Actinobacteria. Akan tetapi tema-tema yang berkaitan dengan kajian Actinobacteria sudah dipaparkan dengan harapan untuk memberi wawasan dasar mengenai mikroba ini. Selain itu, ketersediaan buku-buku berbahasa Indonesia yang membahas secara khusus mengenai Actinobacteria masih sulit ditemukan. Oleh karena itu, kehadiran buku ini dimaksudkan untuk mengisi kekosongan referensi tersebut.

Buku ini mengulas berbagai aspek tentang Actinobacteria seperti morfologi, struktur serta karakteristik mikroba tersebut. Aspek lain yang dibahas dalam buku ini adalah cara mengisolasi, mengidentifikasi dan mengkarakterisasi serta menelusuri taksnomi berdasarkan pendekatan klasik maupun molekular. Disamping itu, aplikasi Actinobacteria dalam berbagai bidang seperti kesehatan, farmasi, pangan, pertanian, industri juga diulas dalam buku ini. Oleh sebab itu, buku ini dapat digunakan oleh berbagai kalangan seperti mahasiswa S1, S2, S3 atau dosen baik Biologi, Farmasi, Pertanian, Perikanan dan Kedokteran.

Berkenaan dengan penulisan buku referensi ini, maka penulis mengucapkan terima kasih kepada Allah swt atas limpahan rahmat dan karuniaNya sehingga buku ini dapat diselesaikan sebagaimana

yang diharapkan. Ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya penulis haturkan pula kepada semua guru-guru penulis yang telah memberikan pencerahan ilmu yang sangat luar biasa. Kepada: Prof. drh. Widya Asmara, Ph.D (Fak. Kedokteran Hewan UGM), Ir. Jaka Widada, Ph.D (Fak. Pertanian UGM), Prof. Dr. Musofa, M.Kes (Fak. Kedokteran UGM), Prof. Langkah Sembiring, M.Sc, Ph.D (Fak. Biologi UGM), Prof. Dr. M.Natsir Djide, MS (Fak. Farmasi UNHAS) Dra. Risco B Gobel, MS (Jurusan Biologi Fak. FMIPA UNHAS), Prof. Dr. Sartini, M.Si, Apt (Fak. Farmasi UNHAS) serta kolega di Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Makassar Prof. Dr. Ir. Yusminah Hala, MS; Prof. Oslan Jumadi, Si,Si, M.Phil, Ph.D, Dr. Ir. Muhammad Junda, M.Si atas kerjasamanya yang sangat menyenangkan. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada putri-putri tersayang Istiftah A, Dini Naswah Alimuddin, dan Salwa Intani Alimuddin dan Rizhany Afseen Alimuddin sebagai inspirasi atas pengertian serta waktu yang terabaikan menemani mereka di saat-saat penulisan naskah buku ini.

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

Makassar, Maret 2021

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	1
DAFTAR TABEL	1
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. PENGERTIAN ACTINOBACTERIA	1
B. ARTI PENTING ACTINOBACTERIA	6
BAB II. MORFOLOGI DAN ANATOMI	
ACTINOBACTERIA	18
A. KARAKTER UMUM ACTINOBACTERIA	18
B. STRUKTUR UMUM ACTINOBACTERIA	21
C. PERTUMBUHAN ACTINOBACTERIA	33
BAB III. METABOLISME DAN METABOLIT	
ACTINOBACTERIA	50
A. PENGERTIAN METABOLISME.....	50
B. METABOLIT PRIMER ACTINOBACTERIA	53
C. METABOLIT SEKUNDER ACTINOBACTERIA	55
D. BIOSINTESIS SENYAWA POLIKETIDA.....	61
E. MEKANISME BIOSINTESIS NYSTATIN	66
F. MEKANISME BIOSINTESIS HERBIMYCIN A.....	70
G. METABOLIT ACTINOBACTERIA LAUT (Marine)....	73
BAB IV. ISOLASI DAN IDENTIFIKASI	
ACTINOBACTERIA	84
A. ISOLASI ACTINOBACTERIA	84
B. PENGOLAHAN SAMPEL DI LABORATORIUM	89
C. PERALATAN LABORATORIUM	90

D. TEKNIK ISOLASI DAN PEMURNIAN	
ACTINOMCETES	91
E. MEDIA ACTINOBACTERIA	97
F. IDENTIFIKASI AWAL ACTINOBACTERIA	104
G.PENYIMPANAN KULTUR/ISOLAT	
ACTINOBACTERIA	106
BAB V. KARAKTERISASI ACTINOBACTERIA SECARA	
MORFO-FISIOLOGIK	109
A. PENDEKATAN KLASIK.....	109
B. PENDEKATAN MOLEKULAR	110
C. PENDEKATAN POLIFASIK	111
BAB VI. KARAKTERISASI ACTINOBACTERIA SECARA	
MOLEKULAR	141
A. KARAKTERISASI TEKNIK MOLEKULAR	141
B. METODEDE SKRINING GENOTIFIK	147
BAB VII. PERANAN DAN MANFAAT	
ACTINOBACTERIA.....	160
A. ACTINOBACTERIA PENGHASIL SENYAWA	
OBAT	160
B. LINGKUNGAN DAN ACTINOBACTERIA	162
C. PERTANIAN DAN ACTINOBACTERIA	163
D. PANGAN DAN ACTINOBACTERIA	176
BAB VIII. TAKSONOMI ACTINOBACTERIA.....	182
DAFTAR PUSTAKA	196

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1.	Pohon filogenetik yang menggambarkan hubungan antar familia dan ordo dari kelompok Actinobacteria berdasarkan hasil analisis sekuen gen 16S rRNA.	3
Gambar. 1.2.	Pohon filogenetik universal yang dikonstruksi berdasarkan perbandingan sekuen RNA ribosomal.....	4
Gambar. 1.3.	Pengelompokan bakteri berdasarkan kandungan G+C.....	5
Gambar 1.4.	Struktur kimia geosmin.....	5
Gambar 1.5.	Metabolit yang berasal dari Actinobacteria	9
Gambar 1.6.	Sumber senyawa aktif dari kelompok mikroba ..	11
Gambar 2.1.	Morfologi koloni Actinobacteria yang ditumbuhkan pada media Starch Nitrate agar. ...	18
Gambar 2.2.	Struktur umum peptidoglikan (R = variasi asam amino).....	22
Gambar 2.3.	Asam diamino pada peptidoglikan.....	23
Gambar 2.4.	Tipe peptidoglikan pada beberapa bakteri.	24
Gambar 2.5.	Variasi asam amino pada jembatan intrapeptida pada peptidoglikan.	25
Gambar 2.6.	Diagram komponen penyusun dinding sel mikolata.....	28
Gambar 2.7.	Struktur ribosom dan sub-sub unitnya.....	30
Gambar 2.8.	Subunit ribosom prokariotik.....	31
Gambar 2.9.	Struktur sekunder gen 16S rDNA <i>Streptomyces coelicolor</i> . Lokasi yang digunakan untuk menentukan kelompok <i>Streptomyces</i> ditandai dengan (α , β dan γ)	32

Gambar 2.10.	Daur hidup <i>Streptomyces</i> sp. Spora tunggal yang berasal dari miselium vegetatif mengalami proses perkecambahan lalu diikuti dengan pertumbuhan hifa aerial. Hifa ini selanjutnya mengalami proses penyekatan lalu akhirnya membentuk rantai spora untuk akhirnya mengalami siklus baru kembali.....	34
Gambar 2.11.	Penampang melintang pertumbuhan <i>Actinobacteria</i> pada media agar	35
Gambar 2.12.	(a).Sporangium, hifa membentuk kantung pada <i>Spirillospora</i> , (b). Konidiospora atau konidia, ujung hifa bersekat-sekat membentuk rantai spora pada <i>Streptomyces</i> sp.GMR22.....	36
Gambar 2.13.	Model pertumbuhan hifa pada <i>Actinobacteria</i> ...	37
Gambar 2.14.	Skema tahapan pembentukan spora (konidia) dari <i>Streptomyces</i> , yaitu terjadinya perubahan pada hifa melalui pembentukan sekat-sekat yang akan menjadi rantai spora (a), dan <i>Bacillus</i> sp (b).....	38
Gambar 2.15.	Mekanisme pembentukan rantai spora pada <i>Actinobacteria</i>	39
Gambar 2.16.	Konfigurasi konidiospora atau rantai spora.....	41
Gambar 2.17.	Ornamen permukaan rantai spora pada <i>Streptomyces</i>	41
Gambar 2.18.	Morfologi spora genera <i>Actinoplanetes</i> . A. <i>Actinoplanes</i> , B. <i>Ampullariella</i> , C. <i>Pilimelia</i> , D. <i>Dactylosporangium</i>	44
Gambar 3.1.	Jalur Embden Meyerhoff-Parnas (EMP).....	51
Gambar 3.3.	Hubungan antara beberapa prekursor metabolisme primer dan produksi antibiotika....	55
Gambar 3.4.	Pembentukan metabolit sekunder pada siklus hidup mikroba.	58

Gambar 3.5.	Struktur kimia Streptomycin	60
Gambar 3.6.	Struktur kimia Eritromisin.....	60
Gambar 3.7.	Struktur kimia Candicidin.....	61
Gambar 3.8.	Struktur kimia Nystatin.....	67
Gambar 3.9.	Biosintesis makrolakton nystatin pada <i>S. noursei</i> ATCC 11455.	69
Gambar 3.10.	Jalur biosintesis Herbimycin A.....	70
Gambar 3.11.	Gen membentuk modul yang bertanggung jawab terhadap penggabungan asam amino yang dikenali pada aras protein.	72
Gambar 3.12.	Struktur kimia senyawa Saliniketal, Arenicolide dan Chalcomycin.....	75
Gambar 3.13.	Struktur kimia senyawa Marinomycin A.....	76
Gambar 3.14.	Struktur kimia senyawa Manumycin A	76
Gambar 3.15.	Struktur kimia senyawa Daryamide	77
Gambar 3.16.	Struktur kimia Salinipyrone, Pacificanone, Nonactin.....	77
Gambar 3.17.	Struktur kimia Komodoquinone dan Chartreusin.....	78
Gambar 3.18.	Struktur kimia Tetracenomycin dan Resistomycin	79
Gambar 3.19.	Struktur kimia senyawa Marmycin dan Griseorhodin	79
Gambar 3.20.	Gen NRPS dan primer PCR degenerated target terhadap gen NRPS pada sekuen dari Actinobacteria.	80
Gambar 3.21.	Struktur kimia senyawa Actinomycin	81
Gambar 3.22.	Struktur kimia Proximicin dan Mechercharmycin.....	81
Gambar 3.23.	Struktur kimia Thiocoraline, Arenamide, Piperazimycin.....	82
Gambar 3.24.	Struktur kimia Salinosporamide dan Lajollamycin	83

Gambar 4.1.	Tahapan umum isolasi Actinobacteria sampel endofit tumbuhan.....	94
Gambar 4.2.	Teknik dan arah goresan untuk pemurnian isolat Actinobacteria. Nomor dalam kotak menunjukkan arah goresan (tanda panah), setiap akhir goresan jarum ose harus disterilkan.....	96
Gambar 5.1.	Profil koloni isolat yang ditumbuhkan selama 2 minggu pada media SNA	114
Gambar 5.2.	Penentuan warna miselium udara dan miselium substrat.....	115
Gambar 5.3.	Harmoni warna yang dapat digunakan untuk menentukan warna pada isolat Actinobacteria. Setiap warna diberi kode angka yang berbeda sesuai dengan warna yang ditunjuk.	115
Gambar 5.4.	Struktur L-DOPA (3, 4-dihydroxy phenyl-L-alanine).....	116
Gambar 5.5.	Teknik penyediaan sampel untuk pengamatan mikroskopik miselium Actinobacteria	118
Gambar 5.6.	Pengamatan mikroskopik (400x) karakteristik morfologi isolat GMR22 yang menunjukkan morfologi dan ornamen spora <i>Streptomyces</i> spp. ..	119
Gambar 5.7.	Bentuk-bentuk morfologi Actinobacteria	119
Gambar 5.8.	Scanning Electrone Micrograph (SEM) yang menunjukkan morfologi dan ornamen spora <i>Streptomyces</i> sp.	120
Gambar 5.9.	Metode penentuan sifat Gram actnobacteria menggunakan uji string.....	124
Gambar 5.10.	Alur analisis Asam Diaminopimelat (DAP).....	136
Gambar 5.11.	Analisis FAME menggunakan kromatografi gas.....	137
Gambar 5.12.	Struktur Isoprenoid quinones	138

Gambar 5.13.	Profil protein terlarut isolat bakteri amilolitik penghasil PHB terpilih dan strain acuan	139
Gambar 5.14.	Dendrogram yang menunjukkan hubungan kemiripan antara strain bakteri amilolitik penghasil PHB dan 4 strain acuan anggota genus <i>Bacillus</i> didasarkan atas analisis SS_M dan algoritma UPGMA terhadap profil protein selular.	140
Gambar 6.1.	Struktur basa nukleotida	145
Gambar 6.2.	Struktur molekul dNTP	146
Gambar 6.3.	Tahapan analisis gen penyandi RNA ribosom untuk identifikasi fenotipik.....	147
Gambar 6.4.	Hasil amplifikasi gen penyandi RNA ribosomal	150
Gambar 6.5.	Contoh kromatogram hasil sekuensing gen RNA ribosomal.....	151
Gambar 6.6.	Hasil sequencing gen penyandi RNA Ribosomal dengan primer 27F/1492R.....	152
Gambar 6.7.	Pohon filogeni yang dikonstruksi berdasarkan algoritma Neighbour-joining gen 16S rRNA isolat GMR22.....	152
Gambar 6.8.	Karakter genetik isolat Actinobacteria pada tegakan hutan kayu putih yang dianalisis melalui amplifikasi elemen BOX menggunakan metode rep-PCR dengan primer BOXA1R	155
Gambar 6.9.	Dendrogram hubungan kemiripan karakter genetik isolat Actinobacteria tegakan hutan kayu putih yang diamplifikasi dengan menggunakan metode rep-PCR dengan primer BOXA1R.....	156
Gambar 6.10.	Skematis profil pita-pita gen penyandi RNA ribosomal yang dipotong dengan enzim restriksi untuk analisis ARDRA	157

Gambar 6.11.	Kemampuan mendiskriminasi/pembeda secara taksonomi teknik skrining sidikjari genotifik	158
Gambar 7.1.	Struktur tetrasiklin dan kloramfenicol	161
Gambar 7.2.	Struktur kimia auksin, indole-3-acetic acid	167
Gambar 7.3.	Aktivitas mikroba yang berkaitan dengan biofertilizer.....	169
Gambar 7.4.	Isolat pelarut posfat hasil isolasi dari risofer dan endofit.....	171
Gambar 7.5.	Aplikasi Actinobacteria pelarut posfat untuk pupuk hayati.....	172
Gambar 7.6.	Karakteristik morfologi sel Bifidobacteria sp	176
Gambar 7.7.	Peranan Bifidobacteria pada manusia dan hewan.....	177
Gambar 7.8.	Mekanisme peran Bifidobacteria pada usus manusia dan hewan.....	179
Gambar 7.9.	Produk komersil probiotic Bifidobacterium	180
Gambar 8.1.	(A) Garis taksonomi filum Actinobacteria berdasarkan List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature dan (B) Taksonomi yang diusulkan untuk Actinobacteria dalam Bergey's Manual of Systematic Bacteriology berikutnya.....	184
Gambar 8.2.	Pohon filogenetik yang dikonstruksi berdasarkan gen 16S rRNA mewakili genus Actinobacteria ...	185

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1. Jumlah senyawa yang ditemukan pada kelompok Actinobacteria	7
Tabel 1.2. Kelompok utama metabolit sekunder bioaktif	7
Tabel 1.3. Kelompok utama antibiotik dan genera Actinobacteria penghasil antibiotik.....	10
Tabel 1.4. Senyawa alami non-antibiotik yang dihasilkan oleh Actinobacteria	11
Tabel 1.5. Kelompok enzim yang dihasilkan oleh Actinobacteria	12
Tabel 2.1. Pola-pola gula sel utuh Actinobacteria	26
Tabel 2.2. Tipe-tipe dinding sel Actinobacteria	27
Tabel 3.1. Gen-gen PKS, gen modifikasi Post-PKS dan gen regulasi serta gen transpor yang diketahui pada kluster gen dalam biosintesis nystatin dari <i>S. noursei</i>	68
Tabel 4.1. Jenis Perlakuan dan Praperlakuan proses isolasi Actinobacteria	88
Tabel 4.2. Kunci identifikasi awal identifikasi Actinobacteria	105
Tabel 5.1. Karakteristik morfologi isolat <i>Streptomyces</i> sp.	113
Tabel 5.2. Karakter umum genus Actinobacteria berdasarkan tipe dinding sel dan deskripsi mikromorfologi.....	121
Tabel 6.1. Metode yang digunakan untuk mengkonstruksi filogenetik bakteri	148

A black and white micrograph showing a dense network of branching, filamentous structures, characteristic of Actinobacteria. The filaments are thin and interconnected, forming a complex web-like pattern. A dark, semi-transparent banner with the text 'BAB 1' is overlaid on the right side of the image.

BAB 1

PENDAHULUAN

A. PENGERTIAN ACTINOBACTERIA

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

Actinobacteria dipandang sebagai bentuk transisi antara bakteri dan fungi, sehingga kadang-kadang istilah Actinobacteria disebut juga

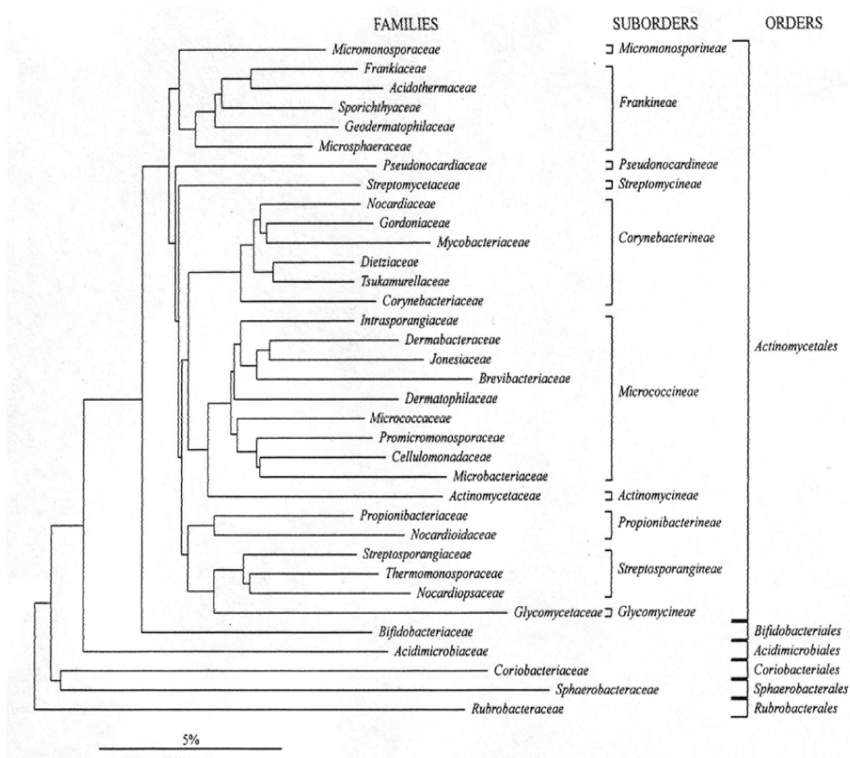
“*bakteri tingkat tinggi*” atau “*bakteri berfilamen*”. Komposisi dinding sel Actinobacteria berbeda dengan fungi, karena tidak ditemukan adanya *kitin* dan *selulosa* yang umumnya ditemukan pada dinding sel fungi. Penjelasan lebih rinci tentang morfologi dan karakter Actinobacteria akan dipaparkan pada Bab berikutnya.

Tidak ada definisi resmi untuk “Actinomycetes” karena kata itu kehilangan statusnya sebagai kelas dalam waktu yang lama pada nomenklatur bakteri. Namun, kebanyakan digunakan istilah “Actinomycetes” sebagai istilah yang merujuk pada bakteri dari ordo *Actinomycetales* (yaitu, *Streptomyces* dan sejenisnya).

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

Tampaknya bahwa “Actinomycetes” adalah nama lama untuk kelas, dan kemudian digantikan menjadi “Actinobacteria”. Tetapi jika dicermati lebih lanjut untuk menelusuri lebih jauh klasifikasi dari Actinomycetes tersebut, maka akan ditemukan bahwa Actinobacteria juga sebagai nama filum. Dengan demikian apakah Actinobacteria (kelas atau filum) sama dengan Actinomycetes? Penjelasan tentang hal tersebut dapat dipahami jika topik pembicaraan tentang istilah Actinomycetes [sinonim Actinobacteria] merujuk pada bakteri berfilamen yang merupakan anggota dari ordo dari Actinomycetales

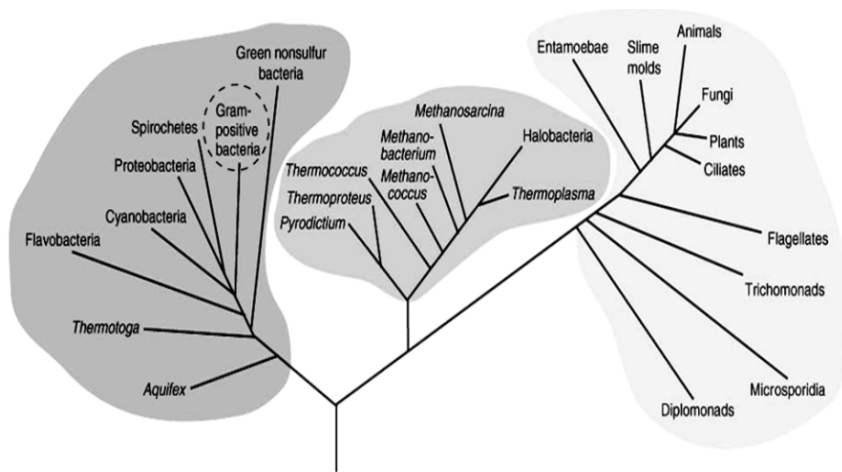
(salah satu dari 5 ordo dalam filum Actinobacteria). Sebaliknya jika pembicaraan merujuk pada filum, maka istilah Actinobacteria merupakan filum yang beranggotakan ordo Acidimicrobiales [genus *Acidimicrobium*], Bifidobacteriales [genus *Bifidobacterium*], Coriobacteriales [genus *Coriobacterium*], Rubrobacteriales [genus *Rubrobacter*] serta Actinomycetales [genus *Streptomyces*] itu sendiri.



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

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

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

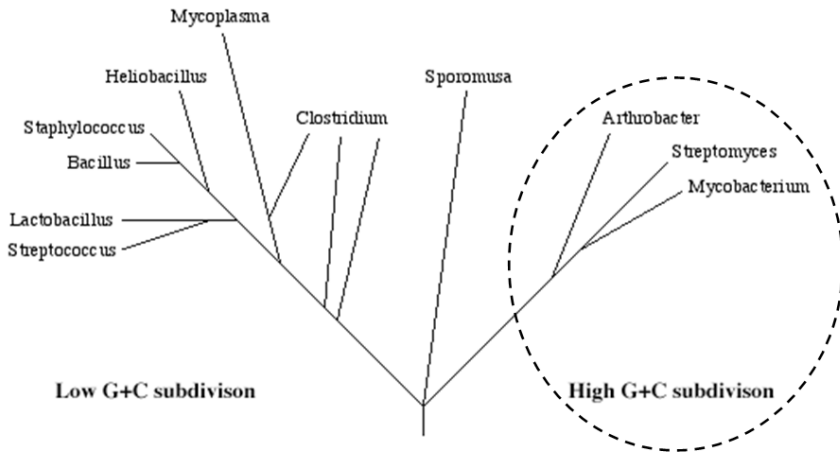


Gambar. 1.2. Pohon filogenetik universal yang dikonstruksi berdasarkan perbandingan sekuen RNA ribosomal

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

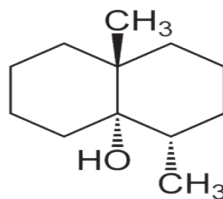
- Domain : Bacteria
- Filum : **Actinobacteria**
- Kelas : **Actinobacteria**
- Ordo : Actinomycetales
- Familia : Streptomycetaceae

Genus : Streptomyces
 Spesies : *Streptomyces coelicolor*



Gambar. 1.3. Pengelompokan bakteri berdasarkan kandungan G+C

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



Gambar 1.4. Struktur kimia geosmin

Geosmin dihasilkan oleh beberapa kelas mikroba termasuk Cyanobacteria (alga biru-hijau) dan Actinobacteria (khususnya genus Streptomyces), dan terlepas jika mikroba tersebut tumbuh. Masyarakat yang menggunakan air permukaan, biasanya secara berkala memiliki pengalaman yaitu air tampungan berbau kurang sedap/bau tanah. Hal ini terjadi jika populasi Actinobacteria dalam air tersebut tinggi, sehingga menyebabkan terjadinya pelepasan geosmin dalam air. Manusia yang memiliki tingkat sensitifitas tinggi terhadap bau geosmin, mampu mencium bau tersebut meski dalam konsentrasi di bawah 5 ppm.

B. ARTI PENTING ACTINOBACTERIA

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

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

tersebut yang berasal dari Actinobacteria dan kelompok senyawa yang dihasilkannya tertera pada Tabel 1.1 dan Tabel 1.2.

Tabel 1.1.

Jumlah senyawa yang ditemukan pada kelompok Actinobacteria

Genus	1974	1980	1984	1988	1992	1996	2005
<i>Streptomyces</i>	1934	2784	3477	4877	5645	6600	7630
<i>Micromonospora</i>	41	129	269	398	492	535	740
<i>Actinomadura</i>	0	16	51	164	248	315	345
<i>Streptovercillium</i>	19	41	64	168	169	244	258
<i>Nocardia</i>	45	74	107	262	270	287	357
<i>Actinoplanes</i>	6	40	95	146	169	195	248
<i>Streptosporangium</i>	7	20	26	39	57	66	79

Tabel 1.2.

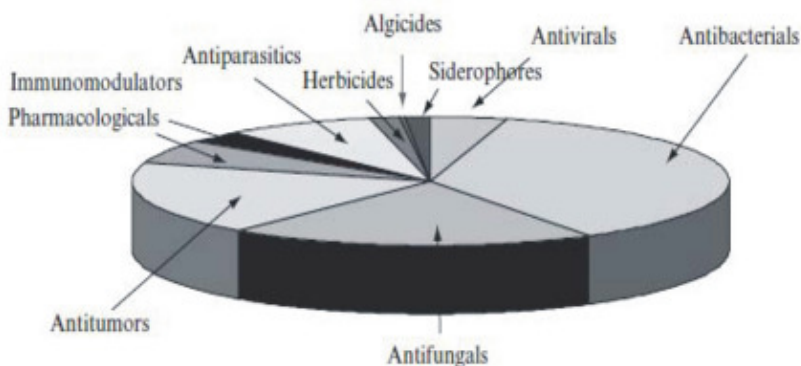
Kelompok utama metabolit sekunder bioaktif

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

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

Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh Actinobacteria menunjukkan aktivitas biologik yang beragam. Metabolit sekunder tersebut menunjukkan struktur yang sangat komplisit sehingga dibutuhkan banyak enzim untuk proses sintesisnya. Sebagai contoh adalah pembentukan antibiotik *Streptomycin* yang memerlukan kurang lebih 30 enzim berbeda yang terlibat dalam proses sintesis senyawa tersebut. Proses sintesis yang sangat komplisit ini tidak mudah dilakukan dengan proses secara kimiawi biasa. Bahkan metabolit sekunder tunggal tersebut justru mampu menunjukkan aktivitas biologik yang sangat beragam. *Avermectin* merupakan contoh metabolit tunggal yang dihasilkan oleh *S. hygrosopicus* menunjukkan aktivitas beragam seperti antibakteri, antifungi, antiparasit dan insektisida. Contoh lainnya adalah *Ascomycin* yang diproduksi oleh *S. hygrosopicus* var. *ascomyceticus* dilaporkan bersifat sebagai antifungi. Kajian lebih lanjut menunjukkan bahwa senyawa tersebut juga aktif sebagai immunosupresif. Analisis yang dilakukan mengungkap bahwa ascomycin tersusun atas dua senyawa yaitu FR900520 dan FR900523 yang berkaitan erat dengan senyawa FK506 sebagai immunosupresif dihasilkan oleh *S. tsukubaensis*. Keragaman dan kekhasan aktivitas senyawa yang dihasilkannya tersebut, maka tidak berlebihan jika dikatakan bahwa Actinobacteria merupakan mikroba paling penting dalam industri.

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



Gambar 1.5. Metabolit yang berasal dari Actinobacteria

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

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

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

- **Antibiotik**

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

Tabel 1.3.

Kelompok utama antibiotik dan genera Actinobacteria penghasil antibiotik

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

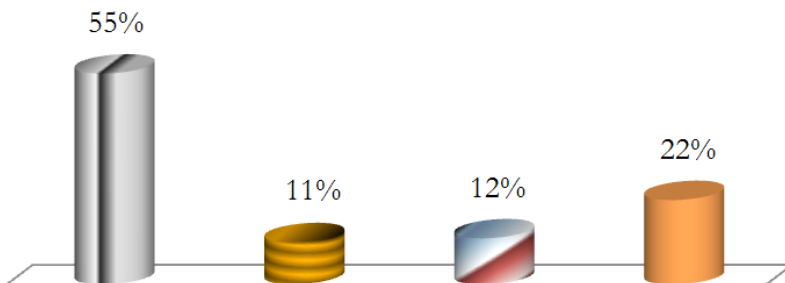
Tabel 1.4.

Senyawa alami non-antibiotik yang dihasilkan oleh Actinobacteria

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

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

■ Streptomyces ■ Actinomycetes lainnya ▽ Bakteri tak berfilamen ■ Fungi



Gambar 1.6. Sumber senyawa aktif dari kelompok mikroba

- **Enzim**

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

Tabel 1.5.

Kelompok enzim yang dihasilkan oleh Actinobacteria

Enzim	Aktivitas biologik	Jenis industri yang memanfaatkan	Mikroba penghasil	Pustaka
Ligno-sellulolitik	Hidrolisis lignin	Industri kertas	<i>Thermomonospora fusca</i> BD25	Tuncer <i>et al</i> , 1999
α -amilase	Pembuatan glukosa-maltosa	Industri makanan	Streptomyces spp	
Lipase	Penghilang lemak	Industri makanan dan laundry	<i>S. cinnamomeus</i> <i>S. griseus</i>	Vishnu-priya <i>et al</i> , 2010
Protease	Degradasi protein	Industri tekstil	<i>S. lividan</i> TK 24	
Xilanase	Hidrolisis polisakarida non selulosa pada bubur kertas	Industri kertas dan pakan hewan	<i>S. galbus</i>	Kansoh <i>et al</i> , 2004

Enzim	Aktivitas biologik	Jenis industri yang memanfaatkan	Mikrobia penghasil	Pustaka
Xilosa isomerase	Konversi glukosa menjadi fruktosa	Industri makanan	<i>S. murinus</i>	Jorgensen <i>et al</i> , 1988
			<i>S. thermovulgaris</i>	

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

- **Inhibitor enzim**

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

● Bioremediasi

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

Pencemaran tanah dan air limbah akibat senyawa kimia seperti minyak bumi dan turunannya, pelarut, senyawa terklorinasi atau herbisida merupakan problema lingkungan di negara industri. Tanah dan air yang terkontaminasi oleh logam berat mempengaruhi struktur komunitas mikroba baik secara kualitatif maupun kuantitatif mengakibatkan aktivitas metabolisme dan biomassa serta keragaman menurun. Masalah yang timbul akibat polusi misalnya penyakit baik secara langsung atau melalui kontaminasi makanan.

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

- **Actinobacteria sebagai PGPR**

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

Meski sejarah *Streptomyces* telah terdokumentasi secara baik sebagai biokontrol, bukti awal menunjukkan bahwa kelompok mikroba tersebut mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman. Meski demikian kajian terhadap spesies *Streptomyces* masih diperlukan untuk mengetahui secara detail potensinya sebagai PGPR. Hal ini cukup menjanjikan karena *Streptomyces* memiliki prosentase yang melimpah dari mikroflora tanah, lebih efektif sebagai kolonisasi akar pada sistem perakaran tanaman. Selain itu kemampuannya untuk bertahan dalam kondisi lingkungan ekstrim melalui mekanisme pembentukan spora.

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

● Patogen Manusia

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

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

Kelompok non-streptomycetes juga menyebabkan penyakit ini, terutama *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri*, *Nocardia otitidiscaviarum* dan *Nocardia transvalensis*. Bahkan penyakit kulit yang biasa menginfeksi kulit terutama wajah (jerawat) disebabkan oleh *Propionibacterium acne*.

● Patogen tanaman

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

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

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

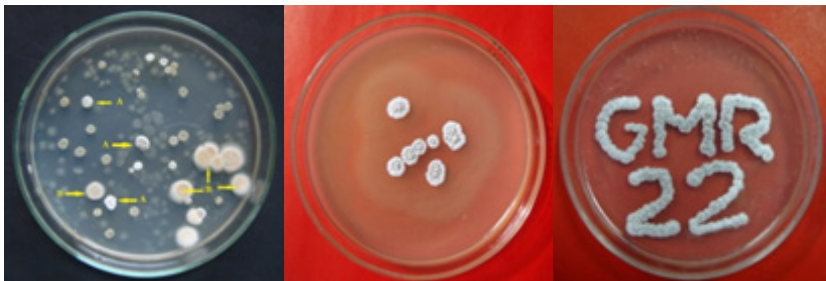
Penyakit penting kedua yang berdampak ekonomi terjadi pada daerah beriklim hangat yang disebabkan oleh *S. ipomoea*. Mikroba ini menyebabkan busuk tanah (juga disebut sebagai cacar) ubi jalar (*Ipomoea batatas*) dan menunjukkan dua gejala (i) tanaman kerdil dan pertumbuhan pohon anggur layu atau mati;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

BAB 2

MORFOLOGI DAN ANATOMI ACTINOBACTERIA

A. KARAKTER UMUM ACTINOBACTERIA

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



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

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

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

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

Keterkaitan antara Actinobacteria dengan bakteri didasarkan pada karakter sebagai berikut:

1. Actinobacteria mirip dengan bakteri karena dalam struktur selnya memiliki peptidoglikan pada dinding selnya dan ada yang memiliki flagela yang mirip dengan flagela bakteri.
2. Selain itu Actinobacteria sensitif terhadap antibiotik antibakteri namun tidak terhadap antibiotik antifungi. Oleh karena sifatnya yang Gram positif, maka Actinobacteria juga sensitif terhadap lisozim (memecah ikatan β 1,4-glikosida pada NAM dan NAG peptidoglikan).

3. Actinobacteria berbeda dengan fungi dalam hal komposisi selulernya seperti tidak memiliki kitin dan selulosa yang ditemukan pada dinding sel fungi.
4. Diameter filamen dan spora Actinobacteria lebih mirip dengan bakteri daripada jamur.
5. Banyak Actinobacteria bereproduksi dengan fragmen atau oidia yang memiliki bentuk dan ukuran yang sama dengan bakteri bentuk batang dan bulat.
6. Banyak Actinobacteria terutama yang bersifat patogen, tidak membentuk miselium udara, sehingga mirip dengan sifat pertumbuhan bakteri yang mengalami pleomorfisme terutama anggota genus *Corynebacterium*
7. Banyak Actinobacteria bersifat acid-fast (tahan-asam) yang secara morfologi dan fisiologi mirip dengan bakteri misalnya genus *Mycobacterium*. Kelompok tertentu dari Actinobacteria khususnya genus *Actinomyces* dan *Nocardia* sangat mirip dengan *Mycobacteria*.

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

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

B. STRUKTUR UMUM ACTINOBACTERIA

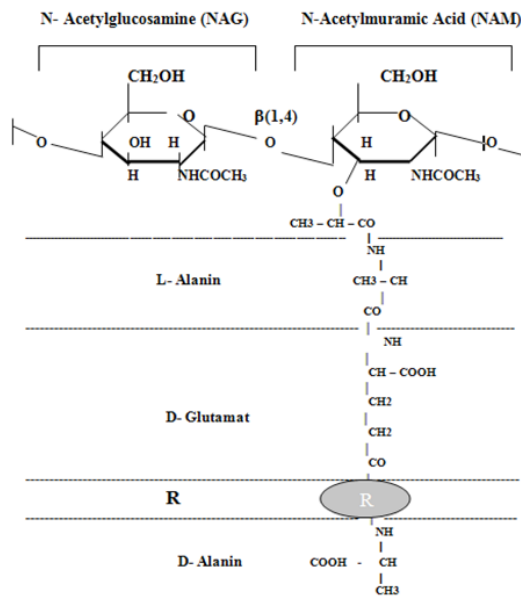
Sebelum tahun 1940an, Actinobacteria telah menarik perhatian pada ilmuwan karena mikroba ini menunjukkan adanya keragaman warna jika ditumbuhkan pada media. Selain itu mikroba ini merupakan agen penyebab berbagai penyakit baik pada hewan, manusia maupun pada tumbuhan.

Mikroba ini umumnya tumbuh membentuk filamen dibanding sebagai sel-sel tunggal. Actinobacteria yang tumbuh mampu menghasilkan filamen bercabang-cabang yang rumit dan disebut juga dengan *miselium*. Miselium tersebut dapat juga dinyatakan sebagai *miselium aerial/ udara* karena tumbuh pada permukaan media. Sebaliknya yang tertancap masuk ke dalam media disebut sebagai *miselium substrat*. Ukuran miselium umumnya memiliki diameter 0,5-1,0 μm , dengan panjang yang tidak tentu, dan tidak memiliki sekat pada fase vegetatif (Madigan *et al.* 1997).

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

1. Dinding sel

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

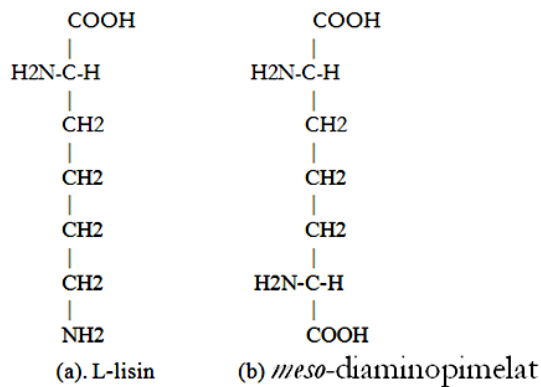


Gambar 2.2. Struktur umum peptidoglikan (R = variasi asam amino)

Peptidoglikan merupakan polimer yang tersusun menyerupai jaring dengan subunit yang identik. Polimer tersebut mengandung dua derivat gula yaitu asam *N-asetilglukosamin* (NAG) dan asam *N-asetilmuramat* (NAM) serta beberapa asam amino yang berbeda. Kedua macam ikatan peptidoglikan, yaitu ikatan glikosida pada NAG-NAM dan ikatan peptida pada rantai tetrapeptida menyebabkan suatu

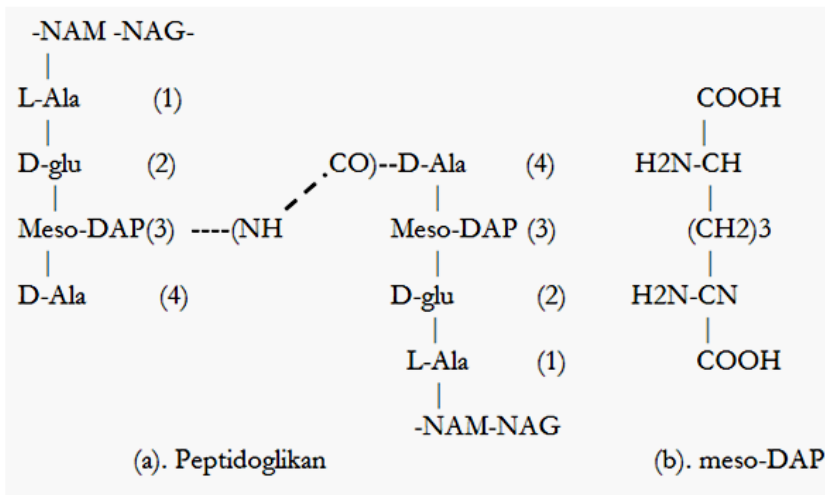
bentuk anyaman jala (mata jala molekuler) yang kuat dari dinding sel, sehingga dapat menahan tekanan dari luar. Secara umum, komposisi subunit peptidoglikan dapat dilihat pada Gambar 2.2.

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



Gambar 2.3. Asam diamino pada peptidoglikan

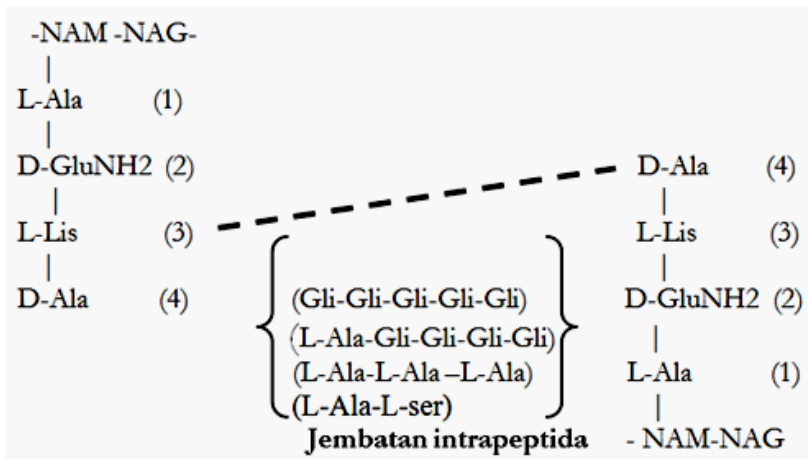
Sangatlah menarik bahwa ketiga asam amino yang terlibat dalam jalinan–silang peptidoglikan memiliki konfigurasi D-isomer. Padahal pada umumnya protein hanya terdiri atas asam amino L, maka penyimpangan dari keadaan normal inilah merupakan sifat sel prokariotik yang tidak lazim. Keberadaan asam amino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



Gambar 2.4. Tipe peptidoglikan pada beberapa bakteri.

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

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



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

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

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

2. Dinding sel bakteri dan Actinobacteria

Kemiripan Actinobacteria dengan bakteri karena dalam struktur selnya memiliki peptidoglikan pada dinding selnya dan ada yang memiliki flagela yang mirip dengan flagela bakteri. Selain itu Actinobacteria

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

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

Tabel 2.1.
Pola-pola gula sel utuh Actinobacteria

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

^aPola-pola gula tersebut hanya ada pada dinding sel tipe II-IV.

^bMadurosa adalah 3-O-metil-D-galaktosa

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

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

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

Tabel 2.2.
Tipe-tipe dinding sel Actinobacteria

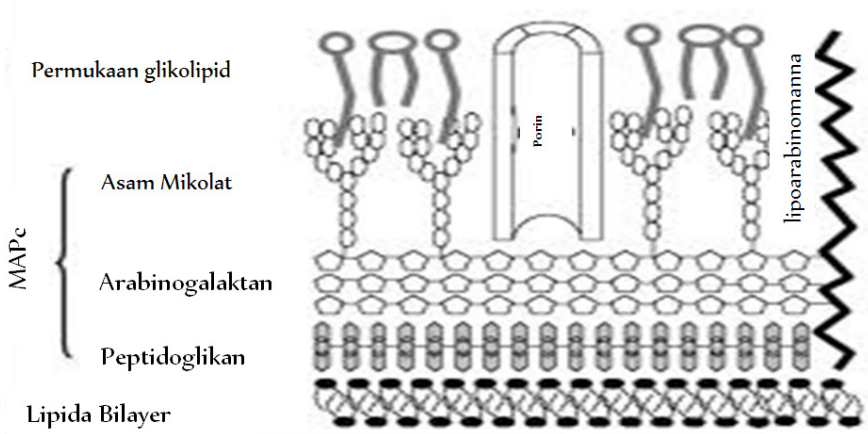
Tipe dinding sel	Isomer asam Diaminopimelat	Glisin pada jembatan interpeptida	Gula-gula	Contoh Genus
I	L,L	+	NA ^a	<i>Streptomyces</i>
II	Meso	+	NA	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i>
III	Meso	-	NA	<i>Actinomadura</i> , <i>Frankia</i>
IV	meso	-	Arabinosa, galaktosa	<i>Nocardia</i> , <i>Saccharomonospora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

^aNA, tidak terdeteksi

Genus *Streptomyces* diketahui secara umum memiliki dinding sel tipe I. *Micromonospora* dan *Actinoplanes* tipe II, *Thermoactinobacteria*, *Microtetraspora*, *Actinomadura* dan *Frankia* merupakan genera tipe III. Dinding sel tipe IV terdiri atas dua familia yang memiliki asam mikolat (*Mycobacteriaceae*) dan tanpa asam mikolat (*Pseudonocardiaceae*). Genera dari Familia *Pseudonocardiaceae* antara lain *Amycolatopsis*, *Amycolata*, *Pseudocardia*, *Saccharomonospora*, dan *Saccharopolyspora* (Euverink, 1999).

3. Asam mikolat

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



Gambar 2.6. Diagram komponen penyusun dinding sel mikolata

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

Meskipun namanya asam mikolat, namun hal ini tidak berkaitan dengan fungi atau jamur. Unsur lain yang terdapat pada dinding sel bakteri kelompok mikolata tersebut adalah polisakarida seperti arabinogalaktan dan arabinomanan. Struktur dinding sel yang kompleks

tersebut menyebabkan bakteri seperti *M. tuberculosis* bersifat tahan asam, yaitu apabila sekali diwarnai akan tetap tahan terhadap upaya penghilangan zat warna tersebut dengan larutan asam-alkohol.

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

4. Asam lemak

Analisis lemak telah digunakan secara luas dalam sistematika bakteri dan memberi informasi yang sangat banyak dan berguna untuk klasifikasi dan identifikasi Actinobacteria. Fokus paling utama adalah analisis asam lemak rantai panjang, kuinon isoprenoid dan posfolipida. Analisis yang dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa Actinobacteria tipe dinding sel IV mengandung terutama iso dan anteiso-metil asam lemak bercabang. Menakuinon tetrahidrogenasi, dengan 8 atau 9 unit isoprena dan berbagai posfolipida.

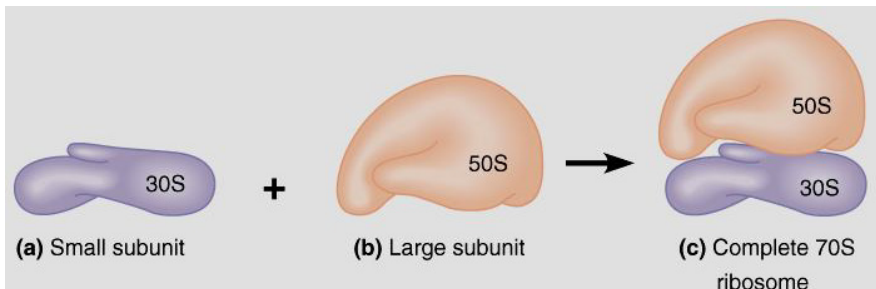
Komposisi asam lemak membran bakteri dapat dipengaruhi oleh suhu, sehingga perubahan yang sangat sedikit, menyebabkan sulit untuk memprediksi dan tidak tampak secara jelas pada semua strain. Kajian saat ini menunjukkan bahwa komposisi asam lemak *Saccharopolyspora hirsuta* tidak dipengaruhi secara nyata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

Anggota genus *Streptomyces* memiliki asam lemak rantai lurus dan rantai bercabang dengan panjang rantai karbon dari 14 - 18 atom.

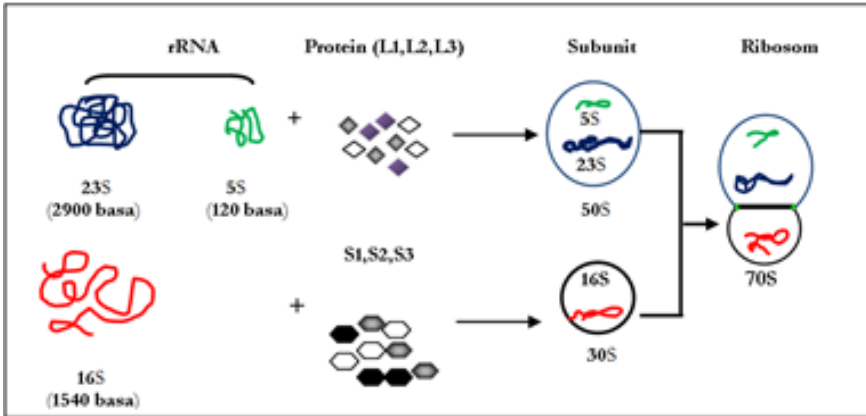
Beberapa spesies juga memiliki ester metil terhidroksilasi. Analisis asam lemak telah digunakan untuk membedakan diantara genera bakteri. Hal ini juga telah digunakan dalam memisahkan kelompok spesies pada *Bacterioides* dan penentuan strain *Corynebacterium*.

5. Ribosom

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

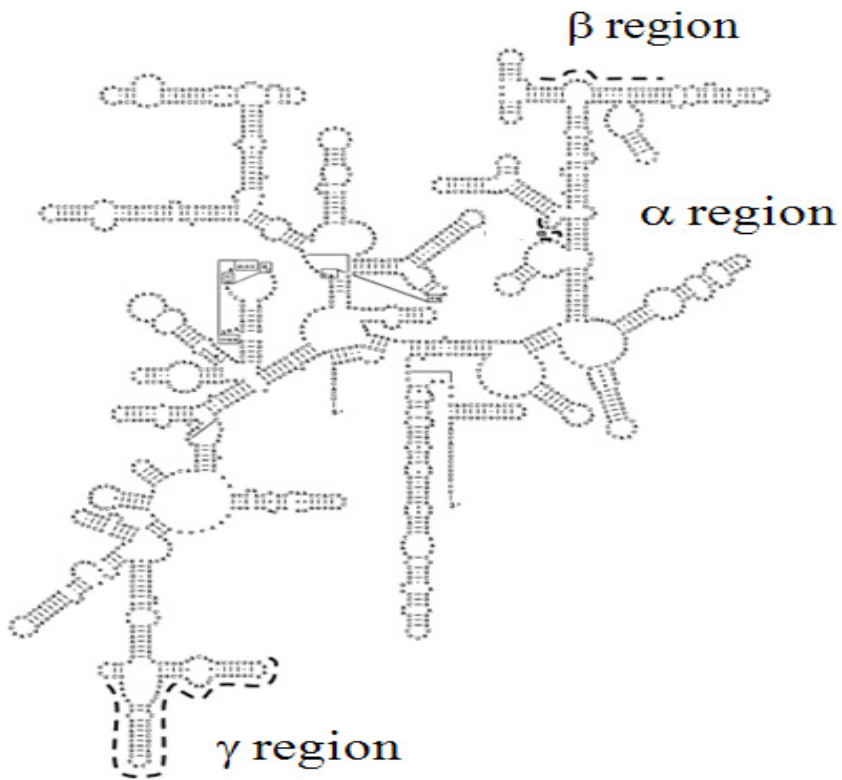


Gambar 2.7. Struktur ribosom dan sub-sub unitnya



Gambar 2.8. Subunit ribosom prokariotik (Lehninger, 1993)

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



Gambar 2.9. Struktur sekunder gen 16S rDNA *Streptomyces coelicolor*. Lokasi yang digunakan untuk menentukan kelompok *Streptomyces* ditandai dengan (α , β dan γ)

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

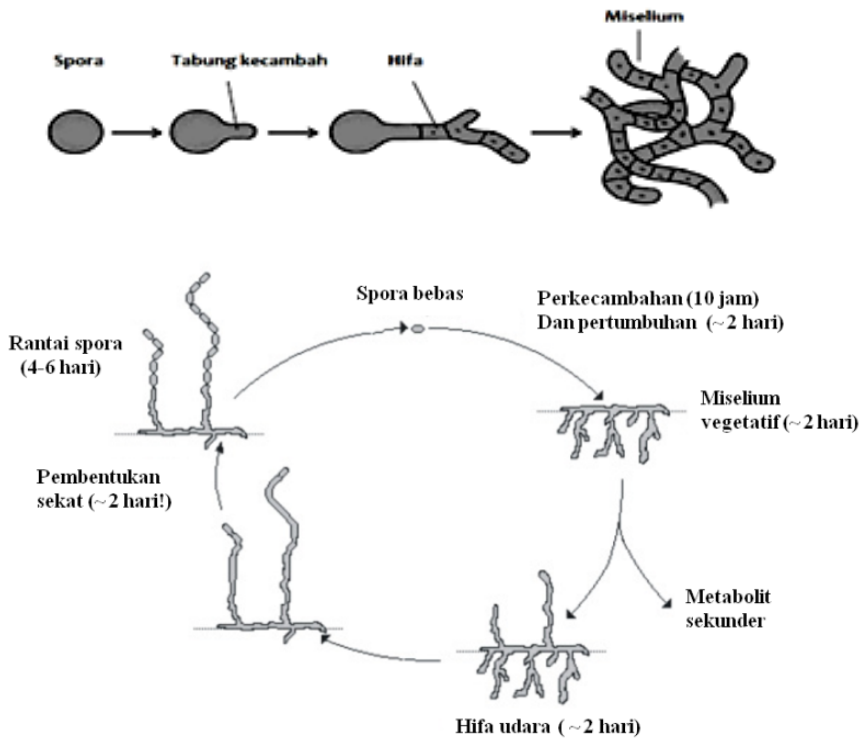
C. PERTUMBUHAN ACTINOBACTERIA

1. Mekanisme pembentukan hifa

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

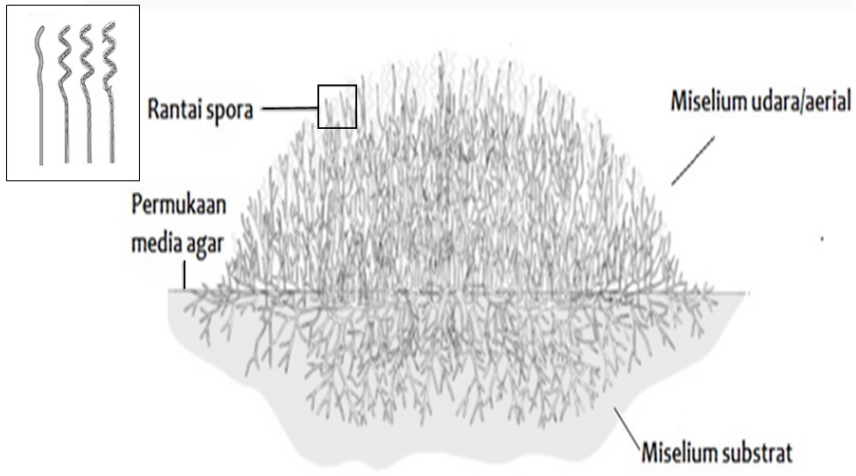
Siklus hidup Actinobacteria menunjukkan dua fase yang berbeda (i) fase pembentukan miselium vegetatif (ii) fase sporulasi. Proses sporulasi dimulai ketika kondisi lingkungan kurang menguntungkan atau kekurangan nutrisi. Siklus hidup Actinobacteria dimulai dengan proses germinasi atau perkecambahan suatu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

Pertumbuhan hifa ini mengikuti kinetika pertumbuhan secara eksponensial.



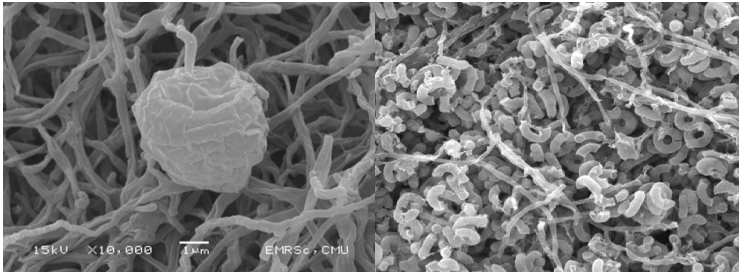
Gambar 2.10. Daur hidup *Streptomyces* sp. Spora tunggal yang berasal dari miselium vegetatif mengalami proses perkecambahan lalu diikuti dengan pertumbuhan hifa aerial. Hifa ini selanjutnya mengalami proses penyekatan lalu akhirnya membentuk rantai spora untuk akhirnya mengalami siklus baru kembali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

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



Gambar 2.11. Penampang melintang pertumbuhan Actinobacteria pada media agar

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



(a)

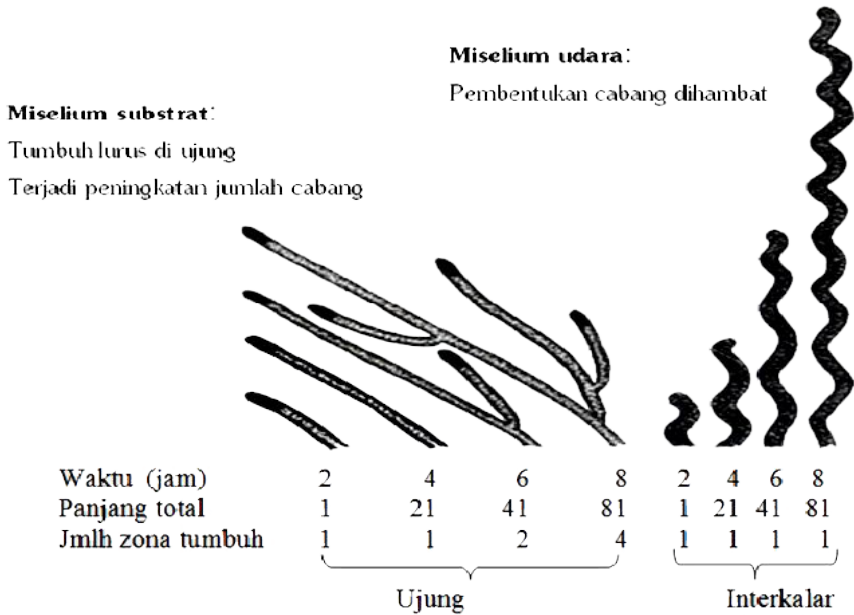
(b)

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

Proses pertumbuhan hifa pada Actinobacteria menunjukkan adanya perbedaan antara hifa yang tumbuh pada substrat (*miselium substrat*) dengan hifa udara (*miselium udara*) seperti terlihat pada Gambar 2.13. Perbedaan ini dapat dibagi atas dua model pertumbuhan hifa yaitu: pertumbuhan hifa utama yang diikuti pembentukan cabang hifa seiring dengan bertambah panjangnya hifa utama. Cabang hifa utama akan membentuk hifa cabang lagi sehingga menghasilkan percabangan yang banyak. Model pertumbuhan hifa ini akan menghasilkan pertumbuhan eksponensial hifa karena adanya peningkatan panjang hifa menjadi dua kali lipat. Model pertumbuhan hifa ini menguntungkan karena fungsi dari miselium vegetatif atau substrat yang harus mencari sumber nutrisi untuk menunjang pertumbuhan mikroba yang bersangkutan. Model ini akan meningkatkan zona pertumbuhan miselium secara cepat layaknya pertumbuhan akar tanaman pada tumbuhan untuk mencari sumber nutrisi.

Model pertumbuhan lainnya yaitu hifa utama tumbuh memanjang tanpa disertai dengan pertumbuhan cabang hifa. Model ini biasanya ditemukan pada miselium udara. Pertumbuhan hifa terus memanjang seiring dengan bertambahnya waktu. Akibatnya, hifa yang mengalami

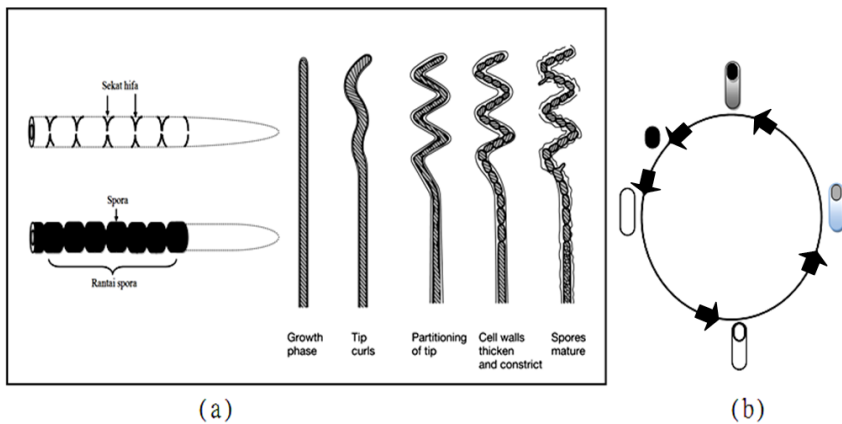
penuaan dan akhirnya membentuk sekat-sekat pada ujung hifa yang selanjutnya akan menjadi rantai spora sebagai alat perkembangbiakan secara aseksual (konidia).



Gambar 2.13. Model pertumbuhan hifa pada Actinobacteria

Seperti pada bakteri lainnya, maka Actinobacteria membentuk spora sebagai respon terhadap kondisi lingkungan yang mulai kekurangan nutrisi. Akan tetapi sebagian besar spora Actinobacteria bukan untuk perlindungan terhadap suhu tinggi, namun lebih difungsikan sebagai tanggapan terhadap kekeringan untuk proses adaptif. Berbeda dengan endospora bakteri, maka struktur spora pada Actinobacteria merupakan bagian dari proses reproduksi. Proses perkembangan filamen untuk pembentukan spora Actinobacteria tidak serumit dibandingkan dengan pembentukan endospora bakteri. Proses ini sangat sederhana yaitu pembagian filamen menjadi sekat-sekat yang masing-masing berisi kromosom (Gambar 2.14). Selanjutnya terjadi

diferensiasi menjadi spora yang matang. Selama proses ini, maka dinding sel mengalami pengkerutan dan menyebabkan sitoplasma ke keadaan yang tidak aktif sehingga spora menjadi lebih tahan terhadap suhu tinggi dan bahan kimia meski tidak lebih resisten dibanding dengan endospora.

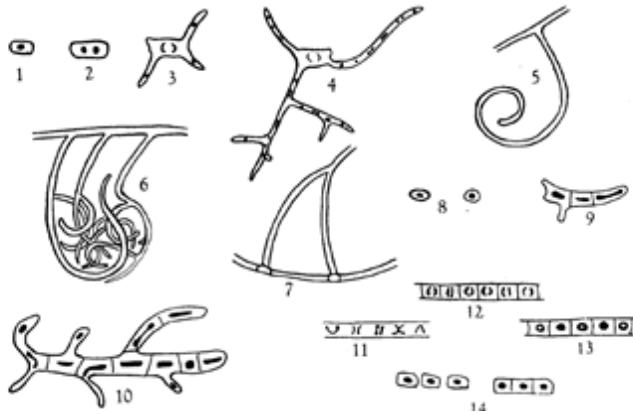


Gambar 2.14. Skema tahapan pembentukan spora (konidia) dari *Streptomyces*, yaitu terjadinya perubahan pada hifa melalui pembentukan sekat-sekat yang akan menjadi rantai spora (a), dan *Bacillus* sp (b)

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

2. Mekanisme Pembentukan Rantai Spora Actinobacteria

Jika miselium primer telah mencapai tahap atau stadium tertentu dalam proses pertumbuhan, maka hifa akan membentuk gelendong, anyaman dan gulungan (Gambar 2.15).



Gambar 2.15. Mekanisme pembentukan rantai spora pada Actinobacteria.

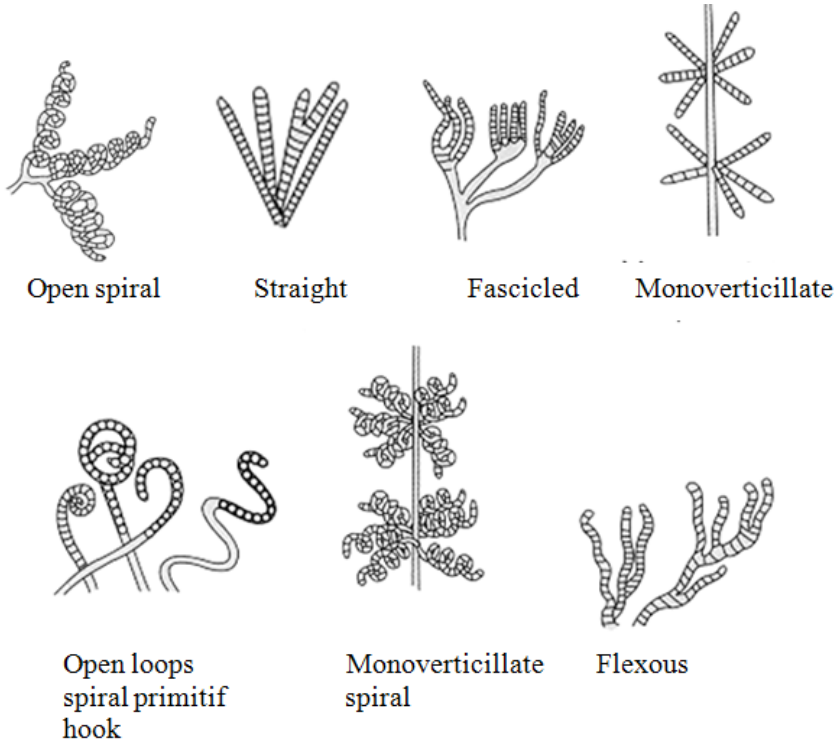
Keterangan: 1. Spora, 2. Perkecambahan spora (jenis *A. gardneri*), 3. Pembentukan tiga tabung perkecambahan, 4. Miselium primer, spora masih tampak (Septa tidak dicantumkan), 5, 6. Pembentukan filamen sarang (Septa dan struktur inti tidak dicantumkan), 7. Munculnya sel-sel pemula (Septa dan struktur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

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

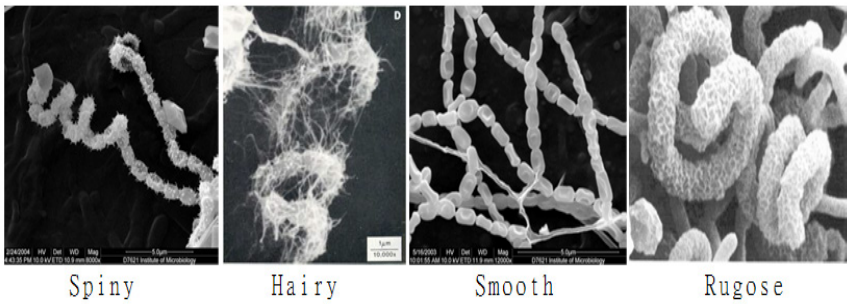
Beberapa ciri yang dapat dijadikan sebagai karakter dalam taksonomi adalah morfologi dan warna miselium serta sporangia, yaitu konfigurasi dan susunan rantai, ornamen permukaan spora, persen kandungan G+C pada DNA, komposisi pospolipid membran sel serta resistensi spora terhadap panas. Konfigurasi rantai spora dan ornamen spora ditentukan dengan pengamatan menggunakan mikroskop elektron (SEM) antara lain: *straight*, *flexuous*, *spirales* dan *verticilliate*, seperti terlihat pada Gambar 2.16).

Ornamen spora dibedakan atas: *smooth* (permukaan spora tampak halus), *spiny* (permukaan spora tampak berduri), *rugose* (permukaan spora tampak seperti bopeng-bopeng atau berkeruk) dan *hairy* (permukaan spora tampak seperti berambut) seperti terlihat pada Gambar 2.17.

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



Gambar 2.16. Konfigurasi konidiospora atau rantai spora



Gambar 2.17. Ornamen permukaan rantai spora pada *Streptomyces*

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

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

Genera Kelompok *Actinobacteria*

Paling tidak ada 7 kelompok taksonomi dari Actinobacteria yang dapat dibedakan berdasarkan karakter fenotipnya.

1) *Actinobacteria Nocardioform*

Nocardioform merupakan kelompok heterogen yang membentuk filamen atau fragmen sebagai elemen-elemen pendek. Pertumbuhan miselium udara dijumpai pada beberapa genera dan menghasilkan rantai spora. Secara umum, kelompok ini dapat dibedakan berdasarkan tipe kimiawi yaitu ada atau tidaknya asam mikolat dan karakter kimiawi lainnya. Beberapa subgroup dari kelompok ini antara lain:

Subgroup 1: Mengandung Asam mikolat (contoh genus:

Gordona, Nocardia, Rhodococcus dan *Tsukamurella*)

Subgroup 2: *Pseudonocardia* dan genera terkait lainnya (contoh genus:

Actinobispora, Actinokineospora, Actinopolyspora, Amycolata, Pseudoamycolata, kibdelosporangium, Saccharomonospora dan *Saccharopolyspora*).

Subgroup 3: *Nocardioides* dan *Terrabacter*

Subgroup 4: *Puomicromonospora* dan genera yang terkait (Genus *Jonesia*, *Oerskovia*)

Rhodococcus

Spesies *Rhodococcus* berbentuk coccus yang kemudian berkecambah menjadi batang pendek, membentuk filamen dengan proyeksi samping, bercabang atau membentuk hifa bercabang-cabang. Generasi sel berikutnya dari coccus atau batang pendek dibentuk melalui proses fragmentasi bentuk batang, filamen atau hifa. Umumnya tidak menghasilkan hifa udara mikroskopik dan spora. Bersifat aerobik dan Gram positif.

Salah satu contoh spesies dari genus *Rhodococcus* adalah *Rhodococcus equi*. Ada 3 bentuk utama koloni dari *R.equi*. Tipe koloni klasik berwarna merah muda dan bertekstur lumpur (*slimy*). Koloni kedua tidak berstruktur lumpur dan yang ketiga berwarna kuning muda, non-slimy dan opak. Koloni kelompok *Rhodococcus* lainnya bersifat kasar, halus atau mukoid dan pigmen yang dihasilkan biasanya berwarna krem, kuning dan merah.

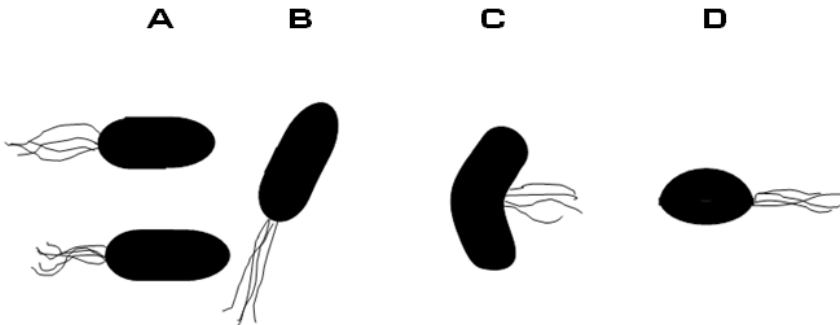
Hampir semua *Rhodococcus* yang berasal dari spesimen klinis bersifat tahan asam. Koloni dan morfologi selnya tidak dapat dibedakan dengan *Gordonia* dan *Tsukamurella*. Sistem identifikasi komersil belum memberikan hasil yang handal.

2) Genera dengan sporangia multilokus:

Genera ini membentuk filamen-filamen yang membagi septa secara longitudinal (membujur) dan transversal (melintang). Pembagian tersebut menghasilkan sejumlah besar elemen seperti coccus yang bersifat motil, misalnya genus *Dermatophilus*, *Geodermatophilus* atau non-motil seperti *Frankia*.

3) *Actinoplanetes*

Membentuk filamen dengan sedikit atau tanpa pertumbuhan miselium udara. Terbentuk spora motil di dalam sporangia, misalnya *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Dactylosporangium*, *Pilimelia* atau spora non motil yang terbentuk satu-satu seperti *Micromonospora* atau dalam bentuk seperti rantai, contohnya *Catellatospora* (Gambar 2.18). Dinding sel mengandung meso-DAP atau glisin, arabinosa dan xilosa yang ditemukan pada hidrolisat sel.



Gambar 2.18. Morfologi spora genera *Actinoplanetes*. A. *Actinoplanes*, B. *Ampullariella*, C. *Pilimelia*, D. *Dactylosporangium*

Siklus hidup *Actinoplanetes* biasanya berganti diantara habitat darat dan akuatik. Pertumbuhan miselium vegetatif terjadi pada tumbuhan atau sisa bangkai yang mencapai puncaknya pada diferensiasi di dalam sporangia. Sporangia ini umumnya dibentuk pada permukaan substrat yang secara langsung bersentuhan dengan udara. Sporangia sangat mudah terlepas dari miselium dan tersebar oleh angin atau oleh fauna tanah seperti kutu atau arthropoda. Sporangia ini sangat tahan terhadap kekeringan dan mampu bertahan selama bertahun-tahun. Selubung sporangia biasanya tahan air namun bila sporangia dalam kondisi lembab, maka spora di dalam sporangia mulai membengkak

yang menyebabkan selubung sporangia terbuka dan spora-spora flagellata keluar.

4) *Streptomyces*

Pada tahun 1943, Waksman & Henrici mengusulkan nama genus *Streptomyces* [Strep.to.my'ces], *Strepto* yang berarti **liat** dan *myces* berarti **fungi**, sehingga diartikan sebagai fungi liat. Hal ini disebabkan oleh karakter koloninya menyerupai fungi/jamur namun bertekstur liat sehingga berbeda dengan koloni fungi pada umumnya.

Genera *Streptomyces* membentuk hifa vegetatif dengan diameter sekitar 0,5-2,0 μm . Miselium bercabang-cabang dan jarang mengalami fragmentasi. Miselium matang membentuk rantai 3 sampai banyak dan dengan spora non motil. Hanya sedikit spesies yang menghasilkan spora pada miselium substrat. Selya bersifat Gram positif, dan tumbuh secara aerobik obligat dengan suhu optimum pertumbuhan antara 25-35°C. Koloni yang tumbuh pada awal pertumbuhan permukaannya tampak halus. Setelah berkembang miselium udara, maka permukaan koloni tampak floccose, granular, lalu seperti tepung atau karpet.

Miselium substrat dan udara berpigmen dan biasanya membentuk pigmen terlarut (*diffusible pigment*) yang menyebar pada permukaan media tumbuh. Metabolisme bersifat oksidatif, katalase positif, dan mampu mereduksi nitrat menjadi nitrit serta mampu mendegradasi aesculin.

Streptomyces, *Kitasatospora* dan *Streptacidiphilus* merupakan bakteri Gram-positif dan termasuk ke dalam familia *Streptomyceteceae*. Genus *Streptomyces* merupakan kelompok besar dari mikroba dengan beberapa karakter yang berbeda dengan kebanyakan bakteri seperti siklus hidupnya yang menyerupai fungi dan bau khas tanah. Memiliki habitat yang tersebar luas di alam dan menunjukkan keragaman tinggi dalam hal warna koloni, pigmen dan sebagainya dibandingkan dengan kelompok bakteri lainnya (Kim *et al.*, 2000).

Analisis kimiawi dinding sel menunjukkan bahwa *Streptomyces* yang mencakup genera *Chainia*, *Elytrosporangium*, *Microellobosporia*, *Streptoverticillium*, *Actinopycnidium* dan *Actinosportangium* memiliki dinding sel tipe I. Hal ini berarti bahwa dinding sel mengandung bentuk isomer LL asam diaminopimelat (A2pm) dan glisin tetapi tidak memiliki gula khas pada lapisan peptidoglikannya (Hasegawa *et al.*, 1983). Akan tetapi pada *Streptomyces* meso-A2pm tersusun atas 16 persen lebih dari semua A2pm yang terdeteksi dan glisin di dalam jembatan interpeptida juga ditemukan pada genera Gram positif lainnya. N-asetilmuramat dari peptidoglikan dinding selnya merupakan asetil (Uchida & Aida, 1997).

Kelompok heterogen semua dinding selnya mengandung L-DAP dan glisin. Terbentuk filamen stabil yang menghasilkan pertumbuhan udara yang ekstensif dengan rantai spora panjang, misalnya *Streptomyces*, *Streptoverticillium*. Genera lainnya yang membentuk sedikit atau tanpa pertumbuhan udara dengan berbagai bentuk spora, misalnya *Intrasporangium*, *Kineospora*, *Sporichthya*. Isoprenolog dominan memiliki 9 unit isoprene dari menakuinon heksa dan okta terhidrogenasi (MK-9[H6, H8]) (Collins, 1985). Lipida polar tipikal berupa dipospotidilgliserol, posfatidiletanolamin, posfatidilinositol dan posfatidilinositol manosida (posfolipid tipe II). Tidak ditemukan asam mikolat, sedangkan profil asam lemak berupa rantai lurus jenuh dan asam lemak iso dan anteisorantai cabang (=asam lemak tipe 2c) (Kroppenstedt, 1985).

Genom spesies *Streptomyces* cukup besar, yaitu mencapai lebih dari 10 megabase pair. Informasi genetik ini sangat penting untuk menyandi diferensiasi *Streptomyces* dan pembentukan metabolit sekunder. Sebagai contoh adalah ekspresi gen sporulasi dibutuhkan untuk pembentukan spora.

Genera lainnya yang termasuk dalam kelompok Streptomycetes adalah *Streptoverticillium*. Spesies ini membentuk miselium udara dengan formasi filamen yang panjang dan membentuk 3 sampai 6 cabang gelungan (verticil). Jika diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran rendah (100X), maka akan tampak seperti kawat duri.

Siklus hidup *Streptomyces* dimulai dengan proses perkecambahan spora yang berada pada lingkungan yang menguntungkan untuk tumbuh seperti suhu, nutrisi, kondisi aerobik dan tidak adanya pengaruh hambatan dari organisme lainnya.

5) *Maduromycetes*

Terbentuk filamen stabil dan menghasilkan miselium udara yang membentuk spora. Rantai pendek berupa arthospora non motil dihasilkan oleh *Microbispora* (dua spora), *Microtetraspora* (empat spora), dan *Actinomadura* (Jumlah banyak). Genera lainnya menghasilkan spora dalam sporangia yang bersifat motil, misalnya *Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora* atau non motil, seperti *Streptosporangium*. Dinding sel mengandung meso-DAP dan hidrolisat sel mengandung madurosa.

Spesies *Actinomadura* sp. ditemukan dalam tanah yang mengandung banyak humus. Spesies *Actinomadura* menghasilkan pigmen merah cerah yang secara kimiawi mirip dengan **prodigiosin** yang dihasilkan oleh *Serratia marcesens*.

Subgroup 1: *Streptosporangium* dan kelompok genus terkait (misalnya genus: *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*).

Subgroup 2: *Actinomadura*

6) *Thermomonospora*

Thermomonospora merupakan Actinobacteria termofilik yang mampu tumbuh pada kisaran suhu 40°C sampai 48°C. Spesies dari tipe ini biasanya diisolasi dari pupuk kandang atau pada kompos. Biasanya punya kemampuan mendegradasi xylan dan selulosa.

Filamen udara yang terbentuk dan menghasilkan miselium udara yang membentuk spora tunggal, misalnya *Thermomonospora*, berbentuk rantai, seperti *Actinosynnema*, *Nocardiopsis* atau dalam struktur yang menyerupai sporangia, contohnya *Streptoalloteichus*. Dinding sel mengandung meso-DAP, tetapi asam amino dan gula yang tidak khas pada hidrolisat sel

7) *Thermoactinobacteria*:

Hanya ada satu genus yaitu *Thermoactinobacteria*. Filamen stabil membentuk pertumbuhan udara. Spora tunggal yang merupakan endospora yang mengandung asam dipikolinat terbentuk baik pada miselium udara maupun miselium vegetatif. Semua spesies bersifat termofilik. Dinding sel mengandung meso-DAP namun tidak memiliki asam amino dan gula yang khas. Spesies ini bersifat termofilik dan suhu optimum pertumbuhannya antara 50°C sampai 60°C.

Kelompok *Rare Actinobacteria*

Istilah *rare Actinobacteria* dinyatakan sebagai kelompok Actinobacteria selain genus *Streptomyces* (non *Streptomyces* group). Beberapa genera yang tergolong *rare Actinobacteria* misalnya *Micromonospora*, *Actinomycetospora* dan *Microbispora*. Kelompok ini tumbuh lebih lambat dibandingkan dengan *Streptomyces*. Selain itu kelompok ini membutuhkan prosedur rumit untuk isolasi, pemeliharaan dan pertumbuhannya dibandingkan dengan genus lainnya (Lazzarini *et al.*, 2000). Oleh karena kelompok ini amat sulit untuk di kultivasi, maka diperlukan teknik tertentu untuk menumbuhkannya.

Saat ini *rare Actinobacteria* dianggap jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok lainnya. Meski demikian, *Micromonospora* sudah dikeluarkan sebagai *rare Actinobacteria* oleh beberapa peneliti dengan alasan genus tersebut sering ditemukan dalam proses isolasi yang umum dilakukan.

Tidak rumitnya proses isolasi pada kelompok *Streptomyces* menyebabkan eksplorasi mikroba ini cukup masif. Akibatnya kelompok *Streptomyces* memiliki peluang kecil untuk menemukan spesies baru. Berdasarkan anggapan tersebut banyak peneliti mulai mengalihkan penelitian ke kelompok *rare Actinobacteria*. Hasil penelitian menunjukkan adanya keragaman akan struktur senyawa yang ditemukan pada *rare Actinobacteria* yang berbeda dengan *Streptomyces*.



BAB 3

METABOLISME DAN METABOLIT ACTINOBACTERIA

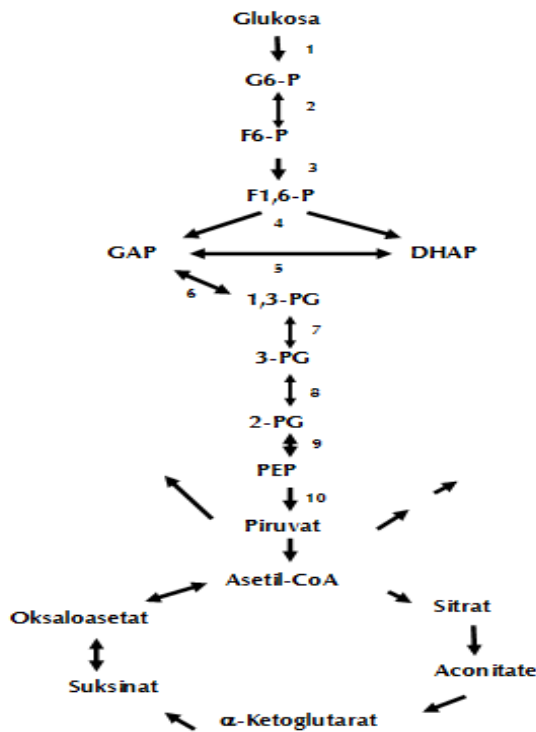
A. PENGERTIAN METABOLISME

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

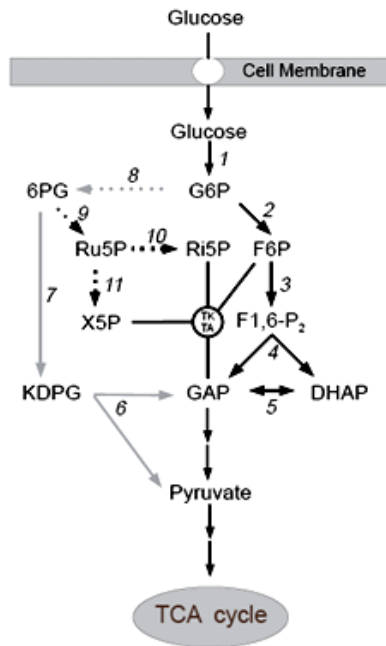
Keseluruhan rangkaian proses yang terlibat dalam sintesis serta menggunakan senyawa-senyawa karbohidrat, protein, lemak, vitamin disebut **metabolisme primer**. Senyawa yang dihasilkan pada proses tersebut termasuk dalam golongan *metabolit primer*. Selain metabolisme

primer juga terdapat suatu metabolisme lain yang terjadi hanya pada spesies tertentu. Metabolisme ini menghasilkan produk-produk yang tidak biasa (berlainan) tergantung spesiesnya. Oleh karena metabolisme ini bersifat tidak esensial bagi kehidupan organisme, sehingga dinamakan **metabolisme sekunder**. Produk metabolit sekunder menghasilkan senyawa yang disebut *metabolit sekunder*.

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



Gambar 3.1. Jalur Embden Meyerhoff-Parnas (EMP)



Gambar 3.2. Jalur metabolisme glukosa.

Keterangan: Tanda panah abu-abu menunjukkan enzim dari jalur Entner-Doudoroff. Tanda panah putus-putus menunjukkan enzim dari jalur pentosa posfat, sedangkan panah hitam menunjukkan enzim dari jalur glikolisis. 1, hexokinase; 2, glucose-6-phosphate (G6P) isomerase; 3, phosphofruktokinase; 4, fructose-1,6-bisphosphate (F1,6P₂) aldolase; 5, triosephosphate isomerase; 6, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) aldolase; 7, 6 phosphogluconate (6PG) dehidrase; 8, glucose-6-phosphate dehidrogenase; 9, 6-phosphogluconate dehidrogenase; 10, ribose-5-phosphate (Ri5P) isomerase; 11, ribulose-5-phosphate (Ru5P) epimerase; TK, transketolase; TA, transaldolase; F6P, fructose-6-phosphate; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; X5P, xylulose-5-phosphate.

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

B. METABOLIT PRIMER ACTINOBACTERIA

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

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

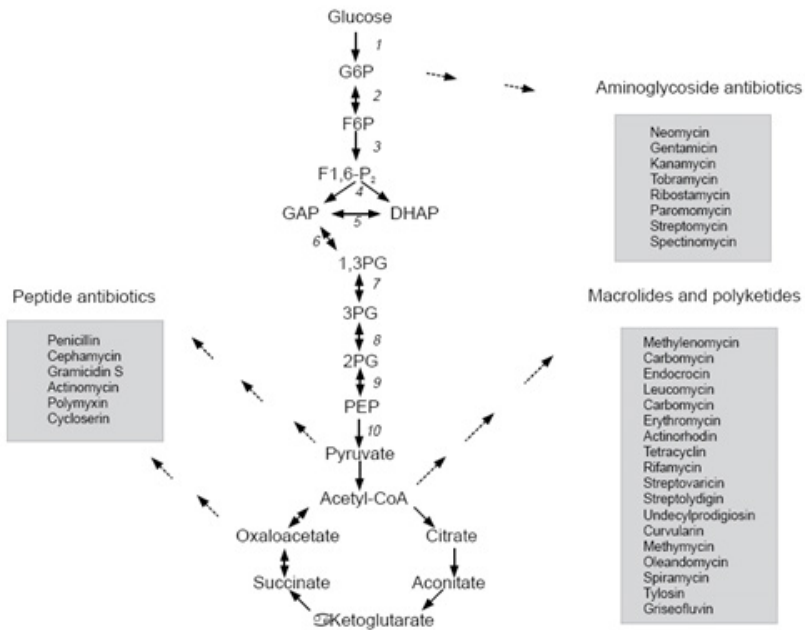
Beberapa jalur metabolit primer telah diketahui sebagai sumber prekursor sintesis metabolit sekunder. Metabolisme asam lemak (asetat dan propionat untuk biosintesis poliketida), metabolisme asam amino

(misalnya serin, sistein, valin, tirosin), metabolisme karbohidrat (heksosa posfat, pospogliserat, pospoenulpiruvat, piruvat), metabolisme purin dan pirimidin (AMP).

Metabolit primer menghasilkan senyawa sederhana yang terdistribusi dengan luas dan memiliki berat molekul rendah seperti asam karboksilat pada jalur Krebs, asam amino, karbohidrat, lemak dan protein. Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa induk atau dikenal sebagai *prekursor* untuk metabolit sekunder tertentu berkaitan erat dengan enzim-enzim dalam metabolit primer. Termasuk enzim antibiotik sintetase dalam biosintesis antibiotika, misalnya *phenoxazine syntase* yaitu suatu enzim pada jalur pembentukan *actinomycin* dari *Streptomyces antibioticus* (Betina, 1983). Meski demikian metabolisme sekunder dapat berkompetisi dengan metabolisme primer. Penambahan inhibitor yang menghambat biosintesis protein selama fase idiofase memacu pembentukan actinomycin

Proses keseimbangan regulasi dalam pertumbuhan biasanya dikontrol oleh sejumlah enzim-enzim kunci baik pada aras aktivitas maupun sintesisnya. Sebagai contoh, laju penggunaan glukosa dikontrol oleh aras transportasi gula (misalnya: sistem glukosa-PTS), posporilasi glukosa (glukosa kinase) dan pada tahap glikolisis, misalnya konversi fruktosa 6-posfat (F-6-P) menjadi fruktosa-1,6-biposfat (F-1,6-P2) oleh enzim posfofruktokinase atau konversi posfoenolpiruvat (PEP) plus ADP ke dalam ATP oleh enzim piruvat kinase.

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



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

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

C. METABOLIT SEKUNDER ACTINOBACTERIA

Metabolit sekunder adalah senyawa yang dihasilkan oleh proses metabolisme sekunder makhluk hidup. Senyawa ini hanya disintesis oleh spesies tertentu dalam jumlah terbatas dan merupakan ciri khas

bagi spesies tertentu. Fungsi senyawa ini diduga bermacam-macam, seperti pertahanan diri terhadap kompetitor (parasit atau predator), komunikasi, meningkatkan kemampuan pertumbuhan, dan ada juga yang belum jelas fungsinya. Metabolit sekunder banyak memberi manfaat bagi manusia atau makhluk hidup lain karena beberapa diantaranya berfungsi sebagai obat, vitamin, hormon, dan lain-lain (Dewick, 2002).

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

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

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

Biosintesis metabolit sekunder mencakup beberapa tahapan berikut:

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

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

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

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

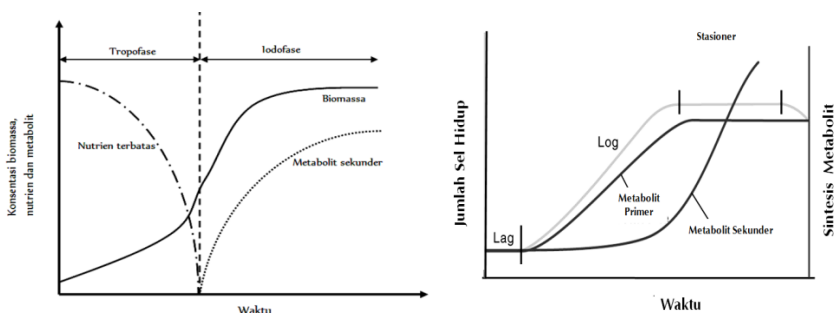
Antibiotika lainnya yang berasal dari prekursor karbohidrat yaitu asam amino glikosida dan makrolida. Asam kojat juga merupakan salah satu metabolit sekunder fungi yang berasal dari glukosa. Glukosa polisakarida (misalnya pati), oligosakarida (misalnya laktosa) dan minyak (misalnya metiloleat) merupakan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

Fase Pertumbuhan dan Sintesis Metabolit Actinobacteria

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

Selanjutnya mikroba memasuki fase pertumbuhan terhambat atau konstan yang disebut fase stasioner. Selama fase ini berbagai produk metabolit sekunder yang penting artinya bagi industri dihasilkan. Fase ini disebut juga sebagai fase idiofase, yang berarti fase dihasilkannya produk atau senyawa yang tidak biasa; *idios* (bahasa Latin), artinya: tidak biasa.

Proses awal biosintesis antibiotik ditentukan dan dipengaruhi oleh berbagai faktor fisiologis dan lingkungan, seperti laju pertumbuhan, difusi sinyal molekul γ -butyrolactone, ketidakseimbangan metabolisme dan berbagai tekanan fisiologis. Sintesis antibiotik juga berkaitan dengan represi metabolit dan atau gangguan oleh sumber nitrogen (umumnya NH_4^+), posfat dan atau glukosa. *Streptomyces* memproduksi metabolit sekunder bila dalam media atau lingkungannya nutrisi mulai terbatas untuk mendukung proses pertumbuhannya yaitu pada fase idiofase (Gambar 3.4).



Gambar 3.4. Pembentukan metabolit sekunder pada siklus hidup mikroba.

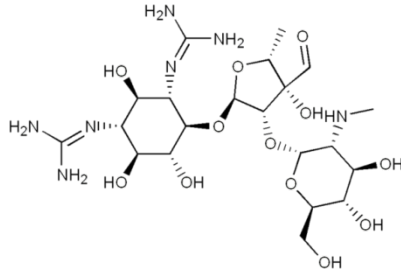
Jalur metabolit sekunder juga dipengaruhi oleh sumber N yang sangat penting untuk pertumbuhan, misalnya garam ammonium. Sumber N organik seperti protein (misalnya tepung kedelai) dilaporkan berperan penting sebagai sumber nitrogen untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder (Demain, 1989).

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

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

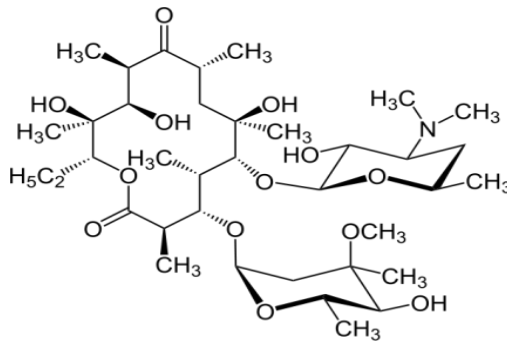
Umumnya metabolit sekunder dihasilkan oleh kelompok familia yang memiliki kedekatan senyawa terkait. Struktur kimia dan aktivitas yang dihasilkan mencakup berbagai kemungkinan, termasuk antibiotik, alkaloid ergot, naphthalenes, nukleosida, peptida, phenazines, quinolines, terpenoid dan beberapa faktor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

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

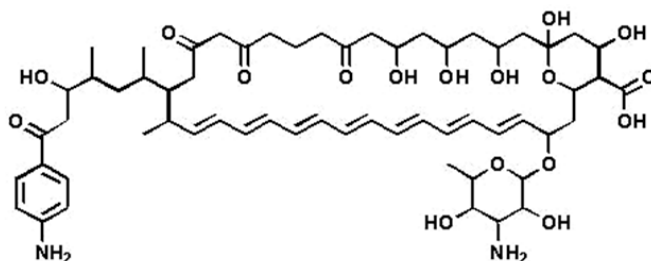


Gambar 3.5. Struktur kimia Streptomycin

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



Gambar 3.6. Struktur kimia Eritromisin



Gambar 3.7. Struktur kimia Candicidin

D. BIOSINTESIS SENYAWA POLIKETIDA

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

Biosintesis senyawa metabolit sekunder poliketida memiliki kemiripan dengan biosintesis asam lemak (kondensasi Claisen). Keduanya melalui proses kondensasi asil-CoA dengan malonil-CoA. Pada biosintesis asam lemak kondensasi diikuti oleh proses lain seperti reduksi, dehidrasi yang menghasilkan pemanjangan karbon dalam bentuk alkil. Sementara itu pada kondensasi poliketida asetil-CoA seringkali disebut sebagai prekursor *starter*, sedangkan malonil-CoA dikenal sebagai prekursor *extender* (Nedal, 2007). Meski demikian,

berbeda dengan biosintesis asam lemak, maka pada biosintesis poliketida tahapan reduksi dan seterusnya tidak selalu terjadi tetapi proses kondensasi hanya menghasilkan ester poli- β -keto. Bentuk poli- β -keto ini selanjutnya mengalami proses siklisasi mengikuti mekanisme kondensasi aldol dan Claisen yang diikuti berbagai modifikasi yang menjadikan struktur poliketida menjadi beragam. Demikian pula pada poliketida, maka terdapat struktur ester koenzim A yang sangat bervariasi yang berasal dari berbagai jalur biosintesis lain termasuk jalur shikimat. Proses ini yang menghasilkan berbagai struktur yang menjadikannya variabilitas pada struktur poliketida. Enzim utama yang terlibat dalam biosintesis poliketida adalah poliketida sintase atau yang dikenal sebagai PKS (Polyketide Synthase).

Tiga jenis PKS bakteri yang telah diketahui sampai saat ini yaitu (i) PKS Tipe I adalah enzim multifungsi yang tersusun dalam modul, yang masing-masing terkelompok sebagai satu perangkat yang berbeda, non-iteratif yang bertanggung jawab atas katalisis satu siklus pemanjangan rantai poliketida. (ii) PKS Tipe II adalah kompleks multienzim yang membawa satu set aktivitas iterasi dan minimal terdiri dari β -sintase ketoasil (KS) α dan subunit β dan protein pembawa asil (ACP). [Subunit KS β juga dikenal sebagai faktor rantai panjang atau faktor rantai-inisiasi]. Tipe Iteratif synthases poliketida II terbentuk dari protein multifungsi sangat besar. Sisi aktif dari synthases ini tersebar diantara beberapa polipeptida kecil yang biasanya monofungsional. Poliketida synthases Tipe II mengkatalisis pembentukan molekul yang membutuhkan aromatisasi dan siklisasi tanpa reduksi ekstensif atau siklus reduksi/dehidrasi. Synthase ini analog dengan synthase asam lemak pada bakteri. Poliketida synthases Tipe II iteratif bertanggung jawab terhadap biosintesis actinorhodin pada *S. coelicolor* dan juga pada biosintesis tetracenomycin dan doxorubicin. Semua enzim tipe II dan beberapa tipe I merupakan iteratif, yang berarti bahwa suatu enzim tunggal melakukan rentetan kondensasi ganda untuk menghasilkan produk poliketida. Akan tetapi, beberapa produk poliketida memerlukan

fungsi terkoordinasi dari beberapa enzim tipe I di dalam suatu proses pembentukan secara berurutan (Mayer *et al.*, 2007). (iii) PKS Tipe III, juga dikenal sebagai PKS sintase-mirip-kalkon, banyak ditemukan pada tanaman meski telah ditemukan pula pada mikroba (Cheng, 2003).

1. Senyawa makrolida pada Actinobacteria

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

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

Genetika dan biokimia biosintesis poliketida pada bakteri *Streptomyces* sp telah diketahui. Senyawa poliketida makrolida dibentuk dalam proses yang mirip dengan biosintesis asam lemak yaitu melalui proses kondensasi berulang dari asam karboksilat sederhana oleh PKS tipe I. PKS tipe I tersusun ke dalam unit-unit berulang (modul), yaitu masing-masing unit bertanggung jawab terhadap satu siklus kondensasi sintesis rantai poliketida. Manipulasi terhadap gen PKS tipe I mengakibatkan terjadinya perubahan yang dapat diprediksi pada struktur kimia makrolida. Hal ini menunjukkan bahwa modus operasi proses ini telah dikenali.

2. Modifikasi pasca-PKS

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

- Oksigenase

Oksigenase mengkatalisis reaksi yang menyebabkan keragaman struktur yang sangat besar dari banyak produk PKS, membuat enzim ini menarik untuk biosintesis kombinasi. Jenis oxygenase paling umum diketahui adalah sitokrom monooxygenase P450 (CYP450), flavin dependen mono-dan dioksigenase, dan antron oksigenase, dan yang luar biasa adalah karena keduanya tidak membutuhkan NADPH/NADH atau kofaktor lainnya. Kebanyakan antibiotik makrolida yang dihasilkan oleh bakteri mengandung satu atau lebih sitokrom P450 monooxygenases terlarut dalam kelompok gen antibiotik, dimana sitokrom individu menunjukkan spesifisitas substrat yang relatif luas. Reaksi klasik sitokrom P450 monooxygenases adalah memindahkan atom oksigen dari O_2 untuk berbagai substrat dengan menggunakan elektron yang dipasok dari NAD(P)H melalui ferredoxin (FDX) dan ferredoxin oxidoreductase (FDR).

- Kelompok transferase

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

glycosyltransferases merupakan enzim modifikasi pasca PKS yang paling penting.

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

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

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

Tahap-tahap sulaman pasca PKS diperlukan guna menambahkan gugus fungsional penting untuk bioaktivitas senyawa sehingga hal ini sangat penting dalam proses biosintesis tersebut. Inaktivasi gen target dari enzim-enzim pasca PKS tidak hanya menjadi instrumen penting terhadap elucidasi jalur biosintesis, tetapi dapat pula digunakan dalam konteks biosintesis kombinasi untuk menghasilkan produk “tidak alami” dengan sifat biologis yang berubah.

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

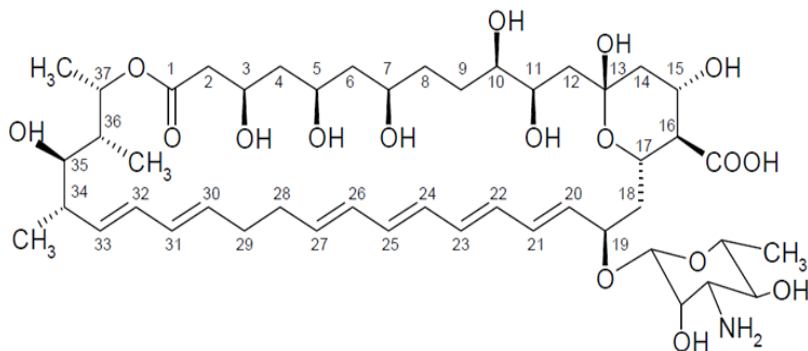
GT merupakan hal yang sangat penting sebagai instrumen untuk pendekatan biosintesis kombinasi. GT dapat digunakan sendiri atau gugus glikosidik dapat dimodifikasi melalui perubahan biosintesis gugus gula-deoxy.

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

E. MEKANISME BIOSINTESIS NYSTATIN

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

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



Gambar 3.8. Struktur kimia Nystatin

1. Kluster gen biosintesis nystatin

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

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

2. Modul PKS

Berdasarkan *alignment* (pensejajaran) urutan asam amino, perbandingan dengan gen PKS yang telah diketahui serta hasil penelitian

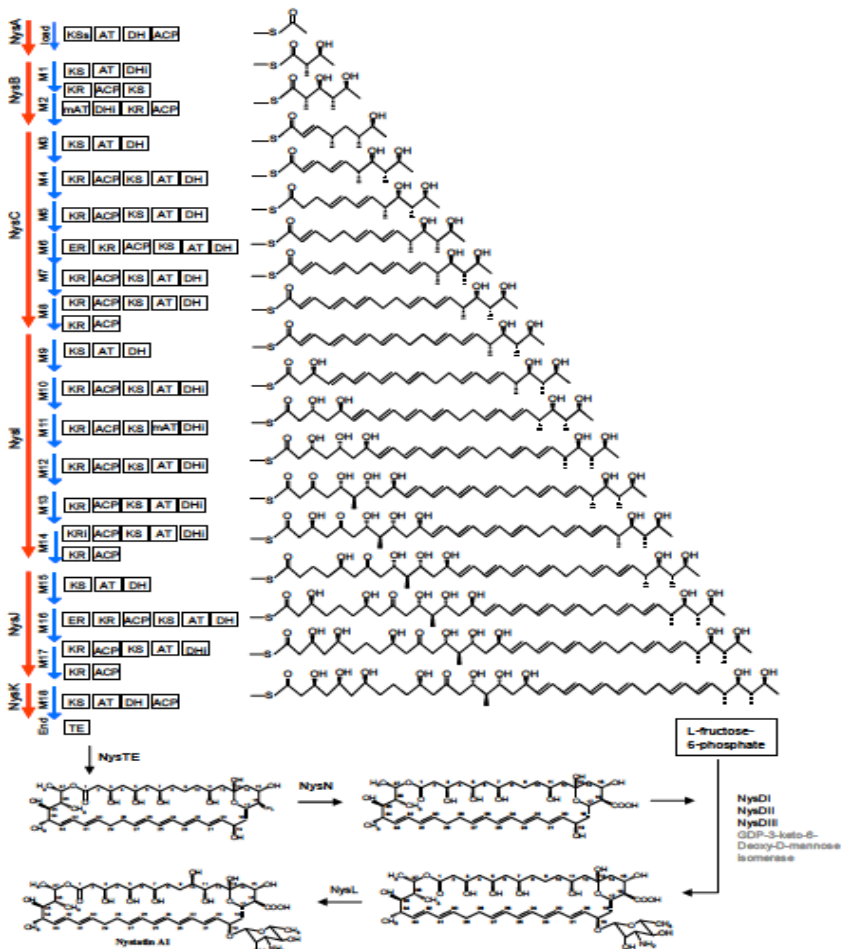
perusakan gen tersebut, diketahui bahwa gen *nysA*, *nysB*, *nysC*, *nysI*, *nysJ* dan *nysK* mengkode modul-modul PKS yang diperlukan untuk perakitan dan siklisasi cincin makrolakton nystatin (Tabel 3.1, Gambar 3.9)

Tabel 3.1.

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

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

Gen	Produk	Fungsi
<i>nysRII</i>	Aktivator transkripsi	Regulator positif biosintesis nystatin
<i>nysRIII</i>	Aktivator transkripsi	Regulator positif biosintesis nystatin
<i>nysRIV</i>	Aktivator transkripsi	Regulator positif biosintesis nystatin
<i>nysG</i>	ABC transporter	Efflux nystatin
<i>nysH</i>	ABC transporter	Efflux nystatin

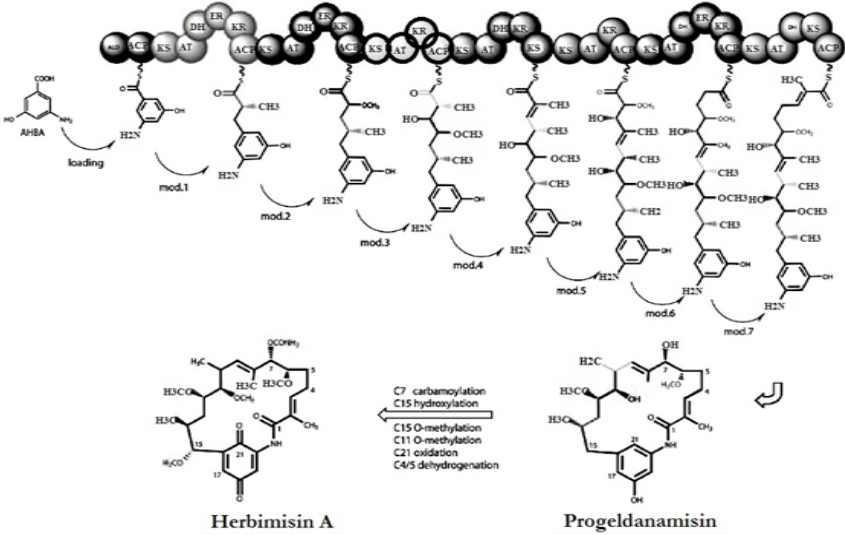


Gambar 3.9. Biosintesis makrolakton nystatin pada *S. noursei* ATCC 11455.

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

F. MEKANISME BIOSINTESIS HERBIMYCIN A

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



Gambar 3.10. Jalur biosintesis Herbimycin A

Keterangan: Pengawalan dari ADHNA sebagai *starter unit* Ansamycin kemudian diikuti oleh prosesi PKS melalui 7 unit rantai pemanjangan (modul 1-7) untuk membentuk progeldanamycin intermediat

hipotesis, yang selanjutnya diikuti pembentukan Herbymicin A melalui serangkaian proses enzimatik PKS (dikutip dari Rascher *et al.*, 2005)

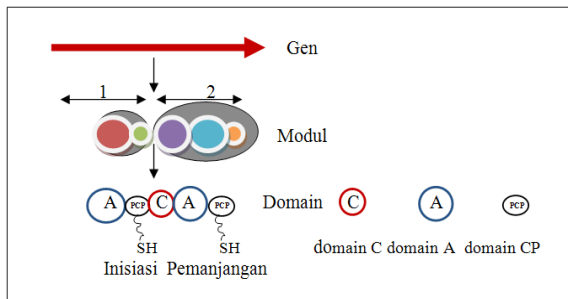
Ada tujuh domain yang menyusun sebuah poliketida sintase untuk pembentukan senyawa tersebut antara lain:

Asil-transferase (AT) bertanggung jawab untuk memuat starter, *extender* dan *intermediate* asil unit, biasanya asetil-CoA atau malonil-CoA. Protein pembawa Asil (ACP) memegang 51 rantai yang sedang tumbuh sebagai ester tiol. β -keto-asil synthases (KS) mengkatalis pemanjangan rantai. β -keto-reduktase (KR) bertanggung jawab untuk reduksi pertama menjadi alkohol yang fungsional. Dehidratase (DH) menghilangkan air untuk memberikan thiolester tak jenuh. Enoil reduktase (ER) mengkatalis reduksi akhir sampai jenuh. Thiolesterase (TE) bertanggung jawab melepaskan muatan dan siklisasinya makrolida (Rascher *et al.*, 2005)

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

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

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



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

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

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

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

G. METABOLIT ACTINOBACTERIA LAUT (Marine)

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

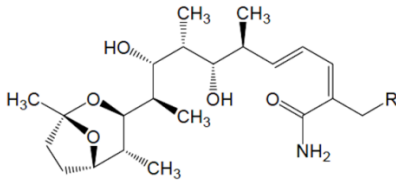
Selain itu, bakteri laut seperti Actinobacteria ditemukan hidup berasosiasi secara simbiosis dengan berbagai invertebrata laut khususnya spon. Kajian menunjukkan bahwa Actinobacteria laut mendapat perhatian besar karena menghasilkan metabolit dan fisiologis yang unik. Metabolit tersebut tidak hanya menjamin kelangsungan hidupnya

dalam kondisi ekstrem tapi juga potensi senyawa yang dihasilkan misalnya antitumor dan aktivitas farmakologik menarik lainnya yang tidak ditemukan pada mikroba teresterial (Piel, 2004).

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

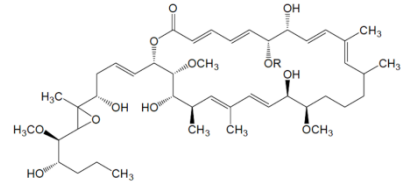
Berbagai senyawa telah dilaporkan diperoleh dari Actinobacteria laut antara lain: Senyawa antitumor dari Actinobacteria marine strain *Salinispora arenicola* CNR-005 menghasilkan senyawa kelompok poliketida yaitu *Arenicolide*. Strain ini diisolasi dari sampel sedimen yang diambil dari sedimen laut pada kedalaman 20 m di pulau Guam. *Arenicolide* A diketahui bersifat sitotoksik moderat terhadap *cell line adenocarcinoma* HCT-116 usus besar manusia dengan nilai IC_{50} 30 μ g/mL (Williams *et al.*, 2007).

Senyawa poliketida bisiklik *Saliniketal* A dan B juga dihasilkan oleh strain yang sama menghambat penginduksi tumor saluran kencing dengan IC_{50} 1,95 μ g/mL sehingga dapat digunakan sebagai kemopreventif karsinoma (Williams *et al.*, 2007). Struktur kimia senyawa tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.12.



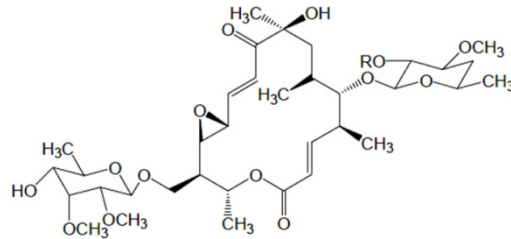
Saliniketal A, $R=H$

Saliniketal B, $R=OH$



Arenicolide A, $R=CH_3$

Arenicolide B, $R=H$



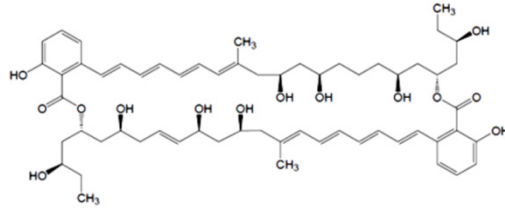
Chalcomycin $R=H$ Chalcomycin B, $R=COCH_2CH_3$

Gambar 3.12. Struktur kimia senyawa Saliniketal, Arenicolide dan Chalcomycin

Senyawa dilaporkan oleh (Wu *et al.*, 2007) sebagai senyawa yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp.M491 diisolasi dari pantai Qingdao (China). Kelompok senyawa yang sama yaitu *chalcomycin* B dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. B7064 hasil isolasi dari sedimen mangrov di Hawaii. Sebagaimana yang dilaporkan oleh (Kwon *et al.*, 2006) bahwa senyawa tersebut mampu menghambat sintesis protein *cell line carcinoma servic* HeLa.

Kelompok senyawa poliketida baru yang dinamakan *marinomycin* dihasilkan oleh *Marinospora* sp. CNQ-140 hasil isolasi dari sampel sedimen yang diambil di Lajolla California (Gambar 3.13). Senyawa ini

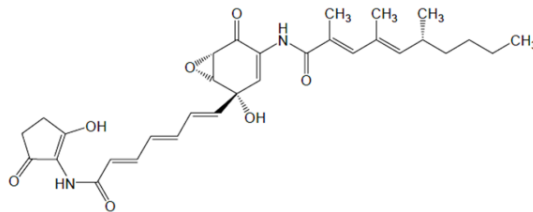
dapat menghambat proliferasi sel kanker [LC_{50} 0,2-2,7 μ M] terhadap *cell line* kanker. *Marinomycin* A diketahui aktif terhadap *cell line* melanoma manusia LOX IMVI, M14, SK-MEL-5, UACC-257 dan UACC-62. Selanjutnya *marinomycin* B dan C (Gambar 3.14) diketahui memiliki potensi aktivitas terhadap *cell line* yang sama dengan rata-rata aktivitas masing-masing LC_{50} 0,9 dan 0,2 μ M (Li *et al.*, 2005)



Marinomycin A

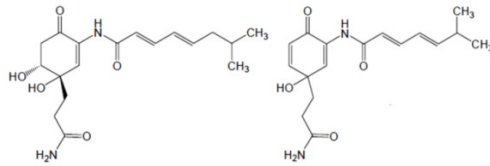
Gambar 3. 13. Struktur kimia senyawa Marinomycin A

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



Manumycin A

Gambar 3.14. Struktur kimia senyawa Manumycin A

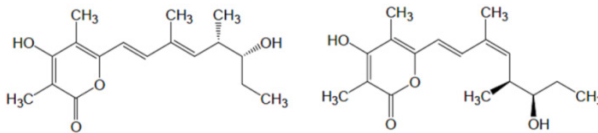


Daryamide A

Daryamide B

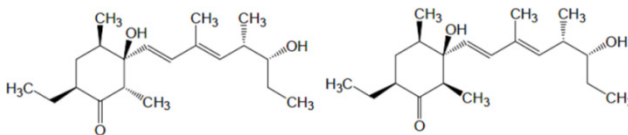
Gambar 3.15. Struktur kimia senyawa Daryamide

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



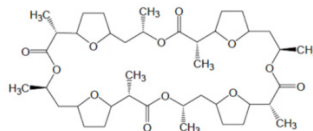
Salinipyron A

Salinipyron B



Pacificanone A

Pacificanone B

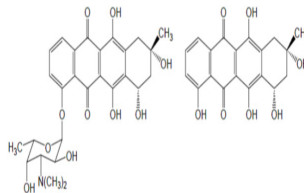


Nonactin

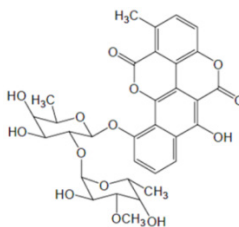
Gambar 3.16. Struktur kimia Salinipyron, Pacificanone, Nonactin

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

Poliketida aromatik yang disintesis oleh PKS tipe II dan selanjutnya dibagi menjadi kelompok struktural yang berbeda seperti *anthracycline*, *angucycline*, dan *tetracycline*. Salah satu kelompok anthracycline adalah *komodoquinone* A-B yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. KS3 (Itoh *et al.*, 2003). Senyawa lainnya adalah *chartreusin* yang diisolasi dari strain *Streptomyces* sp. QD518 yang ditemukan di Quinadao China. *Chartreusin* merupakan senyawa poliketida aromatik glikosilat (Wu *et al.*, 2006).



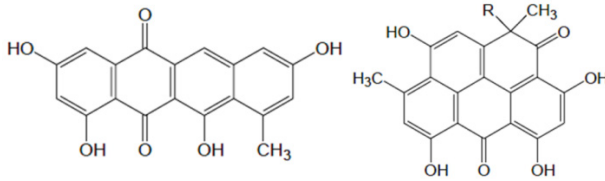
Komodoquinone A



Chartreusin

Gambar 3.17. Struktur kimia Komodoquinone dan Chartreusin

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

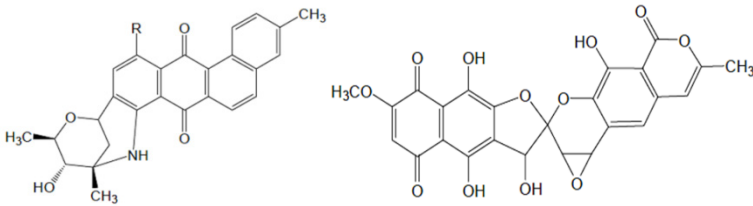


Tetracenomycin D

Resistomycin

Gambar 3.18. Struktur kimia Tetracenomycin dan Resistomycin

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



Marmycin A, **R= H**

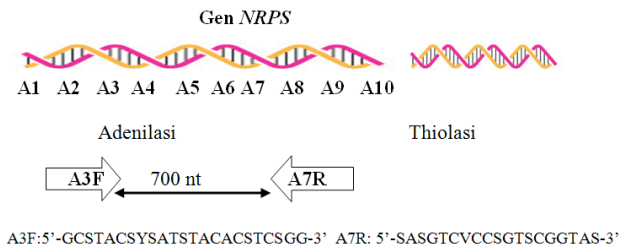
Griseorhodin A

Marmycin B, **R= Cl**

Gambar 3.19. Struktur kimia senyawa Marmycin dan Griseorhodin

Kelompok Senyawa Peptida Non Ribosom (NRPS)

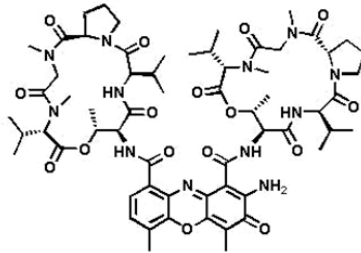
Sintesis peptida nonribosomal juga membutuhkan paling tidak 3 protein. Domain A menyeleksi asam amino lalu mengkatifkan asam amino tersebut menjadi asil adenilat, seperti halnya aa-tRNA sintetase, tetapi secara struktural tidak terkait dari kelompok enzim ini. Asam amino yang teraktivasi tersebut kemudian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



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

Sintesis peptida melalui ribosom memiliki tingkat keakuratan dalam metabolisme primer karena adanya mekanisme baca ulang, sedangkan pada sistem nonribosomal tidak ditemukan. Demikian pula jumlah asam amino hanya 20 sebagai kerangka pembentuk protein, namun pada sistem NRPS diketahui sampai saat ini ada ratusan. Oleh karena itu ditemukan adanya keragaman struktural peptida yang dihasilkan oleh sistem NRPS tersebut (Finking & Marahiel, 2004)

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

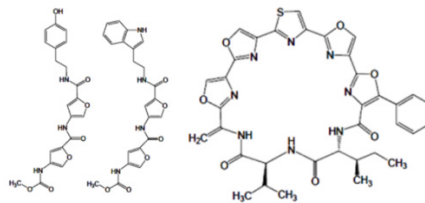


Actinomycin

Gambar 3.21. Struktur kimia senyawa Actinomycin

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

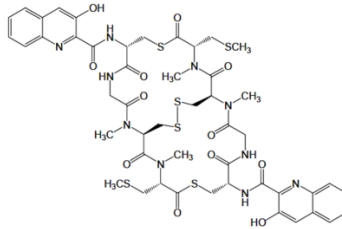
Selanjutnya sebagaimana yang dilaporkan oleh (Kanoh *et al.*, 2005) bahwa strain *Thermoactinomyces* sp menghasilkan senyawa *Mechercharmycin* yang merupakan senyawa kelompok NRPS.



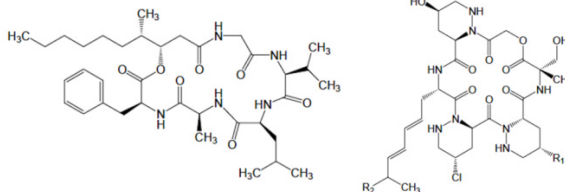
Proximicin Mechercharmycin

Gambar 3.22. Struktur kimia Proximicin dan Mechercharmycin

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



Thiocoraline



Arenamide A

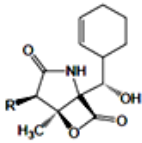
Piperazimycin A

Gambar 3.23. Struktur kimia Thiocoraline, Arenamide, Piperazimycin

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

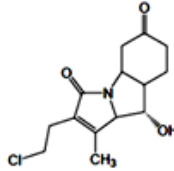
Senyawa lainnya yang dihasilkan oleh Actinobacteria merupakan gabungan antara PKS dengan NRPS. Salah satu senyawa yang merupakan kelompok gabungan ini adalah *salinosporamide*. Senyawa ini dihasilkan oleh *Streptomyces tropica* strain CNB-392 dan beberapa strain

lainnya diketahui juga menghasilkan senyawa yang sama (Feling *et al.*, 2003). *Lajollamycin* yang juga merupakan gabungan poliketida dan non-ribosomal peptida dihasilkan oleh *Streptomyces nodosus* strain NPS007994 (Manam *et al.*, 2005).

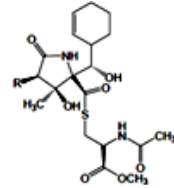


Salinosporamide A

(R=CH₂-CH₂-Cl)

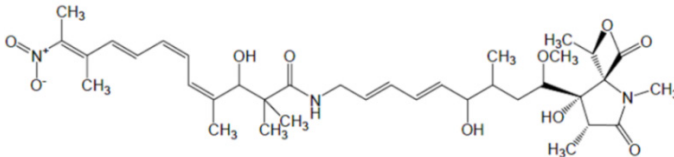


Salinosporamide C



Salinosporamide A T1

(R=CH₂-CH₂-Cl)



Lajollamycin

Gambar 3.24. Struktur kimia Salinosporamide dan Lajollamycin



BAB 4

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ACTINOBACTERIA

A. ISOLASI ACTINOBACTERIA

Di lingkungan alami, Actinobacteria merupakan kelompok yang paling dominan terutama di habitat tanah. Bukan hanya itu, diantara Actinobacteria juga ditemukan berbagai jenis Actinobacteria misalnya genus non *Streptomyces* seperti *Nocardia*, *Micromonospora* dsb. Oleh karena itu, diperlukan teknik isolasi tertentu untuk mendapatkan jenis Actinobacteria yang diinginkan. Kemampuan menumbuhkan isolat tertentu dan menghambat pertumbuhan isolat lainnya merupakan langkah penting untuk mengisolasi Actinobacteria. Kemampuan Actinobacteria tumbuh pada medium tergolong lambat jika dibandingkan dengan kelompok mikroba lainnya.

Lambatnya pertumbuhan Actinobacteria menyebabkan kesulitan untuk menumbuhkan dalam media karena mikroba lainnya seperti bakteri dan jamur dengan cepat mendominasi area cawan media. Akibatnya Actinobacteria akan terhambat pertumbuhannya karena tidak tersedianya nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan dan reproduksinya.

Beberapa metode isolasi telah dikembangkan termasuk jenis media yang diformulasi untuk tujuan tersebut.

1. Prinsip Umum

Terdapat beberapa ulasan yang terkait dengan problema proses isolasi dan perhitungan Actinobacteria. Isolasi dan perhitungan Actinobacteria umumnya dilakukan dengan mengacu pada metode pengenceran cawan standar. Akan tetapi kedua metode tersebut tidak selamanya berjalan memuaskan. Tujuan peneliti mungkin untuk menemukan sebanyak mungkin ragam mikroba. Ahli ekologi mikroba lebih tertarik dengan aspek kualitatif dan kuantitatif populasi mikroba di alam, sedangkan ahli taksonomi justru tertarik untuk menemukan isolat baru. Demikian halnya dengan ahli mikrobiologi industri lebih menekankan pada aspek isolasi ribuan mikroba yang berpotensi menghasilkan senyawa potensial untuk aktivitas biologik tertentu yang dapat digunakan dalam industri.

2. Praperlakuan sampel

Ketika sampel yang telah diambil untuk dilakukan analisis, maka berbagai prosedur awal yang perlu dilakukan sebelum dilakukan plating. Hal ini dilakukan dengan tujuan agar jumlah Actinobacteria tertentu dapat ditumbuhkan dalam jumlah banyak dan mengurangi jumlah mikroba lainnya yang tidak diinginkan. Fungi menjadi mikroba paling sering mengganggu proses isolasi, oleh sebab itu maka dilakukan penambahan senyawa antifungi pada media isolasi. Perlakuan ini bertujuan untuk mengurangi porsi fungi dibanding bakteri yang tumbuh dalam cawan plating.

Perlakuan panas atau pengeringan sampel pada suhu tertentu bertujuan agar propagul Actinobacteria yang umumnya toleran suhu tinggi tetap hidup namun mengurangi bakteri yang tidak membentuk spora. Contoh perlakuan panas kering pada sampel tanah adalah pemanasan kering pada suhu 120°C selama 1 jam untuk mengisolasi *Streptosporangium* dan *Microbispora* atau perlakuan sampel pada suhu

100°C selama 15 menit untuk mengisolasi *Actinomadura* dan genera lainnya.

3. Media selektif

Penggunaan media selektif bertujuan untuk menumbuhkan Actinobacteria yang diinginkan dan menghalangi mikroba yang bukan target. Banyak formulasi media yang telah diusulkan penggunaannya untuk isolasi Actinobacteria dalam kisaran luas atau taksa tertentu saja. Meski demikian, kajian masih kurang yang mengungkap kebutuhan nutrisi tertentu secara metabolisme pada kelompok kemo-organotrof. Oleh karena itu, agak sulit untuk menggeneralisir penggunaan media isolasi selektif terhadap Actinobacteria. Meski demikian, beberapa medium yang umum digunakan untuk isolasi antara lain starch-casein, colloidal-chitin dan medium M3. Penggunaan antibiotik justru berpotensi besar digunakan untuk proses seleksi isolasi Actinobacteria. Penggunaan sikloheksamid atau nistatin untuk menghambat fungi dapat dilakukan karena antibiotik ini tidak mempengaruhi pertumbuhan Actinobacteria.

Bagian ini menguraikan mengenai media yang digunakan untuk isolasi, penghitungan dan karakterisasi Actinobacteria yang diperoleh dari berbagai sumber isolat. Metode ini sudah lazim digunakan dalam bidang mikrobiologi, namun ada beberapa modifikasi yang dilakukan. Umumnya media yang digunakan memiliki spesifikasi dalam hal formula baik untuk isolasi maupun untuk karakterisasi isolat Actinobacteria.

Sebagaimana yang dipaparkan diatas bahwa rare Actinobacteria umumnya tumbuh lambat sehingga pertumbuhannya akan ditutupi oleh mikroba lain yang tumbuh cepat seperti bakteri, fungi dan Streptomyces. Oleh sebab itu perlu dilakukan proses isolasi untuk menyeleksi rare Actinobacteria pada sampel. Metode ini menekan pertumbuhan mikroba non target (prakperlakukan) dan memicu pertumbuhan mikroba target (enrichment, pengayaan media).

Hayakama dan Nonomura pada tahun 1987 mengembangkan suatu formula media yang disebut HV agar (Humic acid Vitamin agar). Media HV mengandung asam humat sebagai satu-satunya sumber karbon dan nitrogen. Medium ini digunakan untuk mengisolasi kelompok *Streptomyces* dan *rare Actinobacteria*. Asam humat merupakan polimer berikatan heterogen ekstrem yang menyebabkannya sangat sulit di dekomposisi secara biologi (diurai) oleh organisme bahkan mikroba sekalipun. Akan tetapi *Actinobacteria* merupakan mikroba yang memiliki kemampuan untuk mengurai polimer tersebut dan menggunakannya sebagai sumber karbon dan nitrogen. Selain itu medium ini mendukung proses sporulasi pada *Actinobacteria*, sehingga memudahkan untuk tujuan identifikasi morfologis.

Pengalaman menunjukkan bahwa beberapa bakteri tetap mampu tumbuh pada media HV agar, sehingga untuk menghambatnya perlu ditambahkan senyawa antibakteri seperti nalidixic dan trimethoprin (Hayakawa *et al.*, 1996). Hal yang sama ditemukan juga beberapa fungi mampu tumbuh pada medium tersebut sehingga ditambahkan sikloheksamid untuk menekan pertumbuhan fungi (William dan Davis, 1965). Selain itu dapat pula digunakan antifungi lainnya seperti nistatin atau ketokenasol.

Berdasarkan uraian diatas, maka secara umum proses isolasi *Actinobacteria* dapat dilakukan dengan menggunakan media khusus dan praperlakuan seperti perlakuan fisik, kimiawi dan pengayaan. Teknik dan media yang digunakan untuk tujuan tersebut secara umum dapat ditunjukkan pada Tabel 4.1 berikut:

Tabel 4.1.

Jenis Perlakuan dan Praperlakuan proses isolasi Actinobacteria

Jenis Perlakuan	Praperlakuan	Media Kultur	Genus Target
Fisik	Panas kering >70°C selama 1 jam	SNA dengan sikloheksamid dan nystatin	<i>Streptomyces</i>
	Tanpa pemanasan	HV agar dengan atau tanpa asam nalidixic dan trimethoprim	<i>Streptomyces</i> dan <i>genus lainnya</i>
	Panas kering suhu 120°C selama 1 jam	HV agar dengan asam nalidixic	<i>Spirilloplanes</i> dan <i>genus lainnya</i>
Kimiawi	SDS 0,05% dan yeast extract 5%	HV agar dengan asam nalidixic	<i>Streptomyces</i> dan <i>genus lainnya</i>
	Fenol 1,5%	HV agar dengan asam nalidixic dan tunicamycin	<i>Micromonospora</i>
	Chloramylene-T	HV agar dengan asam nalidixic	<i>Microbispora</i> , <i>Herbidospora</i> , <i>Nonomuraea</i>
Fisik dan Kimiawi	Panas kering suhu 110°C selama 1 jam dan fenol 1%	HV agar dengan kanamycin, asam nalidixic, lysozyme	<i>Actinomadura</i>
Pengayaan	Kemotaksis	HV agar dengan asam nalidixic	<i>Actinoplanes</i> , <i>Catenuloplanes</i> , <i>Dactylosporangium</i>
Pengayaan dan fisik	Sentrifugasi gradien sukrosa (240x g, 30 menit)	HV agar dengan asam nalidixic dan chlortetracyclin	<i>Nocardia</i>

Actinobacteria merupakan kelompok mikroba yang dominan khususnya pada lingkungan tanah. Untuk itu, isolasi dan identifikasi Actinobacteria memerlukan metode serta persiapan khusus. Berikut ini

dipaparkan secara umum metode isolasi dan identifikasi Actinobacteria. Metode ini mengacu pada metode yang dipertelakan oleh Shirling dan Gottlieb, 1966 serta pada beberapa pustaka terkait.

B. PENGOLAHAN SAMPEL DI LABORATORIUM

Pengisolasian Actinobacteria dilakukan dengan beberapa metode pendekatan pengolahan sampel antara lain adalah metode *rehydration centrifugation* (RC) dan *sodium dedocyl sulfonate* (SDS).

- **Metode rehidration centrifugation (RC).**

Sampel tanah dan serasah dikeringanginkan selama 7 hari pada suhu ruangan. Sampel yang sudah kering digerus dengan mortar porselin lalu diayak dengan saringan Ø 1000 µm. Sampel diambil untuk kemudian dilakukan analisis. Metode analisis menggunakan teknik RC. Sebanyak 0,5 g sampel tanah atau serasah disuspensikan dalam 50 mL 10 mM bufer fosfat yang mengandung 10% ekstrak tanah, diaduk dan didiamkan 90 menit pada suhu kamar. Suspensi diambil sebanyak 8 mL dan disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Sampel hasil sentrifugasi (supernatan) didiamkan tegak selama 30 menit. Supernatan diambil sebanyak 1 mL dan dilakukan pengenceran dengan seri dari 10^{-1} - 10^{-4} . Masing-masing hasil pengenceran diambil sebanyak 0,2 mL dan ditanam pada media *humic acid vitamin agar* (HVA), lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 1-2 minggu. Koloni Actinobacteria yang tumbuh dipindahkan ke media *yeast starch agar* (YSA) untuk mendapat isolat murni. Media HVA yang digunakan dibuat dengan komposisi per liter: 40 g *humic acid*, 0,02 g CaCO_3 , 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,71 g KCl, 0,05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g NaHPO_4 , agar 18 g, dan *vitamin solution* 5 mL. Komposisi vitamin terdiri dari thiamin HCl 0,5 mg, riboflavin 0,5 mg, *nicotinic acid* 0,5 mg, *piridoxin* HCl 0,5 mg, myo inositol 0,5 mg, *Ca-panthotenat* 0,5 mg, *P-aminobenzoic acid* 0,5 mg,

biotin 0,25 mg, dan akuades 100 mL. Kecuali akuades, bahan-bahan di atas adalah *pure analysis* (pa)

- **Metode *sodium dodecyl sulfonate* (SDS).**

Sampel tanah sebanyak 1 g disuspensikan dalam 10 mL akuades steril, lalu dihomogenkan dengan vortex selama 15 menit. Sampel dibiarkan dalam tabung selama 1 menit, lalu diambil sebanyak 1 mL menggunakan mikropipet pada bagian tengah suspensi (di atas endapan tanah di dasar tabung). Suspensi yang telah diambil sebanyak 1 mL diinokulasikan dalam 9 mL media SDS-YE (larutan buffer fosfat pH 7 dengan penambahan 6% ekstrak yeast dan 0,05% *sodium dodecyl sulfida* yang sudah disterilkan) lalu diinkubasi dalam *water bath* selama 20 menit pada suhu 40°C. Tahap berikutnya sampel diencerkan kembali menggunakan akuades steril. Penanaman dilakukan dalam media HVA agar pada tingkat pengenceran 10^{-3} sampai 10^{-5} dengan menginokulasikan 0,2 mL sampel ke media dan ditebarkan (*spread*), lalu diinkubasi selama 14-21 hari pada suhu ruangan (28°C). Koloni yang tumbuh dari masing-masing cawan petri dihitung. Koloni yang dihitung dari setiap cawan petri harus lebih dari 10 koloni (Lee dan Hwan, 2002), sehingga diperoleh total jumlah koloni per gram sampel tanah.

C. PERALATAN LABORATORIUM

Untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi Actinobacteria, maka beberapa peralatan yang digunakan merupakan peralatan yang umum dijumpai di laboratorium Mikrobiologi standar. Peralatan ini umumnya digunakan untuk sterilisasi alat ataupun bahan seperti oven, autoklaf dan peralatan yang terbuat dari kaca seperti tabung reaksi, cawan petri serta ruang aseptis untuk inokulasi (*Laminar air flow*). Peralatan yang digunakan harus benar-benar bersih dari kontaminan bahan atau mikroba. Peralatan seperti cawan petri dan tabung reaksi untuk pengujian biokimiawi mutlak harus bebas dari kontaminan bahan sebab

akan mengganggu dan mengacaukan interpretasi data pengamatan jika ada bahan kimia selain yang digunakan dalam pengujian tersebut.

Proses identifikasi suatu isolat Actinobacteria tidak hanya berdasarkan karakter morfologi dan fisiologi (biokimiwi), akan tetapi data molekuler khususnya gen 16Sr RNA merupakan data yang mutlak diperlukan. Untuk itu, peralatan yang harus tersedia adalah peralatan yang berkaitan dengan kegiatan tersebut antara lain: Termocycle (untuk amplifikasi gen target), elektroforesis (untuk mengecek hasil amplifikasi) serta sekuenser (untuk mengetahui urutan nukleotida gen target). Selain itu diperlukan pula adanya perlatan lainnya seperti spektrofotometer UV dan sentrifugasi kecepatan tinggi.

D. TEKNIK ISOLASI DAN PEMURNIAN ACTINOMCETES

Istilah 'Isolasi' digunakan untuk menyatakan pengucilan atau pemisahan isolat target dengan lainnya dari sumber isolat atau dari berbagai macam mikroba kontaminan. Berbagai teknik isolasi telah dikembangkan untuk mendapatkan isolat Actinobacteria target.

1. Teknik isolasi Actinobacteria dari sampel umum

Isolasi Actinobacteria dari sumber bahan seperti tanah, kompos, air dan udara digunakan metode yang umum dilakukan untuk isolasi mikroba lainnya seperti menimbang lalu mengencerkan bahan/sampel dengan larutan pengencer steril kemudian diinokulasikan ke dalam media. Inkubasi dilakukan pada suhu berkisar 25-35°C dengan pH >7 sampai 8. Hal ini disebabkan oleh sifat Actinobacteria yang cenderung menyukai kondisi alkalin (basa). Perlu diketahui bahwa beberapa Actinobacteria bersifat termofilik seperti *Thermomonospora* yang hanya akan tumbuh jika diinkubasi pada suhu diatas 40°C. Demikian pula kelompok Actinobacteria yang bersifat anaerobik seperti *Actinomyces* sp. yang hanya tumbuh jika diinkubasi pada kondisi tanpa oksigen

(anaerobik) sehingga memerlukan prosedur seperti kultivasi bakteri anaerobik pada umumnya.

Metode konvensional yang dilakukan untuk mengisolasi Actinobacteria dari sampel dapat juga dilakukan dengan mensuspensikan sampel ke dalam air atau ke dalam suatu larutan suspensi yang mengandung osmoprotektan seperti larutan Ringer atau inositol. Selanjutnya dibuat seri pengenceran secara logaritma lalu sampel disebar pada permukaan agar dalam cawan (metode pengenceran cawan). Akan tetapi hal ini dapat membatasi jumlah Actinobacteria yang dapat diperoleh dalam sampel karena seringnya pertumbuhan kelompok *Bacillus* sp mengganggu sebab pertumbuhannya lebih cepat.

Beberapa penelitian menggunakan berbagai jenis antibiotika untuk melakukan isolasi. Media yang dapat digunakan untuk isolasi kelompok Actinobacteria termofil adalah Tryptone soya+casein hidrolisat yang diberi novobiocin (25-50 µg/ml agar medium) untuk mengisolasi *Thermoactinomyces* spp atau penambahan kanamycin (25 µg/ml) atau rifampicin (5 µg/ml) untuk isolasi *Thermomonospora* spp dan *T. chromogena*

Akan tetapi keberadaan Actinobacteria di dalam jaringan tumbuhan (endofit) atau organisme lainnya menyebabkan kesulitan untuk mengisolasinya sehingga diperlukan teknik dan metode khusus.

2. Teknik isolasi Actinobacteria endofit

Mikroba endofit dinyatakan sebagai mikroba yang menunjukkan hubungan endosimbiosis dengan tumbuhan inangnya. Tumbuhan tersebut memperoleh keuntungan ekologi dengan adanya simbiosis seperti meningkatkan kemampuan toleransi terhadap berbagai cekaman lingkungan, memacu pertumbuhan tanaman atau mencegah terjadinya gejala penyakit oleh patogen (Hasegawa *et al.*, 2006).

Kemampuan Actinobacteria melakukan kolonisasi pada jaringan tumbuhan menyebabkan mikroba tersebut mempengaruhi

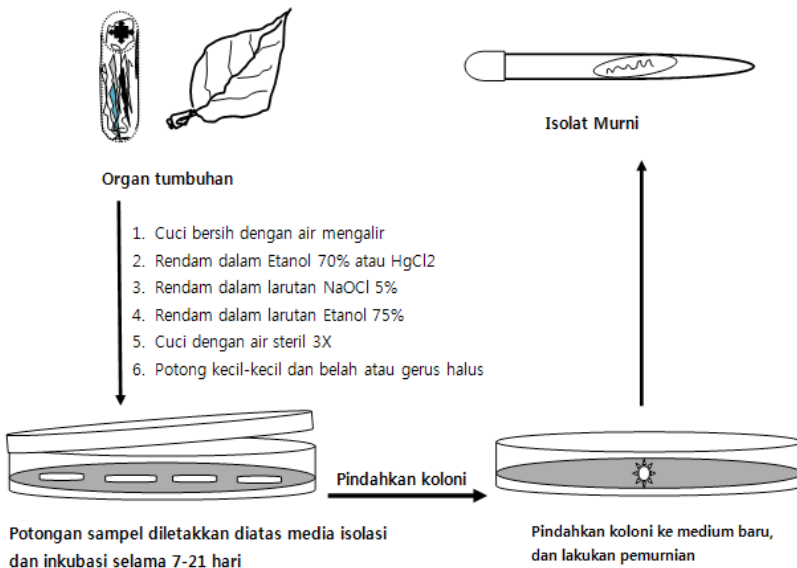
lingkungan disekitar tumbuhan inangnya seperti pH, kandungan senyawa anorganik, organik, dan suhu tanah. Karena Actinobacteria endofit jumlahnya sangat sedikit dan kadang-kadang terlokalisir di dalam tumbuhan sehingga hampir mustahil untuk mendapatkan afiliasi khususnya dengan tanaman inangnya.

Prosedur mengisolasi endofit Actinobacteria membutuhkan teknik tertentu untuk menghindari terjadinya kontaminasi Actinobacteria lainnya yang tidak dikehendaki seperti Actinobacteria epifit (yang menempel pada permukaan organ/bagian tanaman). Hal utama yang menjadi perhatian kita adalah keberhasilan sterilisasi permukaan sampel. Keberhasilan sterilisasi permukaan sampel menjadi faktor utama isolasi Actinobacteria endofit. Untuk tujuan sterilisasi, maka senyawa yang paling umum digunakan adalah Natrium hipoklorit (NaOCl). Senyawa tersebut umum digunakan sebagai bahan desinfektan. Untuk mengaktifkan sterilisasi, maka biasanya dilakukan serangkaian sterilisasi dengan senyawa lain seperti alkohol 70-99%. Untuk menghilangkan sisa-sisa (residu) bahan desinfektan tersebut, maka sampel dicuci berkali-kali dengan akuades steril. Penggunaan etanol untuk sterilisasi epifit dianggap kurang efektif sehingga digunakan senyawa alternatif. Beberapa peneliti menggunakan hidrogen peroksida dan merkuri klorida untuk sterilisasi epifit dan dinyatakan cukup efektif.

Sampel yang telah disterilisasi dipotong-potong kecil lalu diletakkan diatas permukaan media. Cara lain yang dilakukan adalah menumbuk sampel hingga halus. Hal ini bertujuan agar miselium Actinobacteria dapat maksimal diperoleh bahkan yang menerobos masuk ke dalam jaringan tumbuhan dapat tumbuh pada medium. Prosedur berikut dapat dilakukan untuk isolasi Actinobacteria, prosedur dapat dilakukan modifikasi sesuai dengan kebutuhan:

Bagian tanaman seperti akar, daun atau batang tanaman dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa tanah atau partikel yang

menempel pada permukaan sampel. Sampel tanaman direndam pada larutan etanol 75% selama 5 menit, lalu direndam kembali dengan larutan 5,2% NaOCl selama 3 menit (Nimnoi *et al.*, 2010; He *et al.*, 2009). Sampel kemudian dicuci dengan akuades steril sebanyak 3 kali lalu dikeringkan dengan menggunakan kertas saring steril. Cucian akhir dari proses sterilisasi dilakukan plating untuk menguji keberhasilan sterilisasi permukaan sampel. Jika tidak ditemukan koloni yang tumbuh pada media, maka proses sterilisasi permukaan sampel dinyatakan berhasil. Apabila tumbuh koloni, maka perlu dicermati kesamaan dengan koloni yang berasal dari dalam jaringan tumbuhan. Jika tidak sama, maka koloni tersebut dapat dinyatakan sebagai kontaminan saja. Selanjutnya sampel dipotong-potong kecil dengan skalpel, lalu ditumbuk dalam lumpang hingga halus. Sampel dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL. selanjutnya disuspensikan dengan larutan NaCl fisiologis.

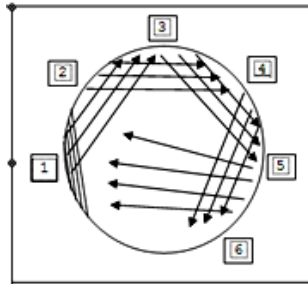


Gambar 4.1. Tahapan umum isolasi Actinobacteria sampel endofit tumbuhan

Suspensi diencerkan secara desimal sampai diperoleh pengenceran yang diinginkan, misalnya 10^{-5} . Sebanyak 0,1 mL dari tiga pengenceran terakhir diinokulasikan secara sebar pada permukaan media cawan TSA atau SCA yang diberi 100 μg nistatin/mL atau sikloheksamid 50mg per L media. Semua cawan media diinokulasikan pada suhu 35°C selama 7 hari sampai koloni menunjukkan pertumbuhan yang dapat dibedakan dengan koloni lainnya. Isolat mikroba yang menunjukkan koloni yang berbeda pada setiap cawan dilakukan re-isolasi pada media yang sama secara berulang-ulang sampai diperoleh koloni tunggal yang menunjukkan kemurnian isolat. Isolat yang telah murni digoreskan pada media agar miring untuk digunakan sebagai stok penelitian selanjutnya.

3. Teknik pemurnian isolat

Isolat yang tumbuh pada medium isolasi yang menunjukkan karakter koloni Actinobacteria dilakukan pemurnian. Beberapa media yang umum digunakan antara lain SCA, SNA atau TSA. Selanjutnya isolat diambil dengan menggunakan ose steril, lalu digores pada tepi cawan petri. Ose disteril kembali pada api bunsen, lalu dibiarkan sampai dingin dan disentuhkan pada bagian awal tempat pertama kali isolat digores. Jarum ose ditarik secara hati-hati agar tidak merusak permukaan media. Buat goresan secara zig-zag (membentuk huruf Z berulang-ulang) atau goresan menyilang ditepi cawan petri. Cara lain yang dapat digunakan adalah dengan menggunakan metode inokulasi titik. Cara ini dilakukan dengan mengambil spora pada koloni dengan menggunakan ose lurus. Selanjutnya inokulasi dengan cara menyentuhkan ujung ose pada permukaan media cawan baru pada beberapa titik dengan jarak terpisah satu sama lainnya. (Gambar 4.2)



Gambar 4.2. Teknik dan arah goresan untuk pemurnian isolat Actinobacteria. Nomor dalam kotak menunjukkan arah goresan (tanda panah), setiap akhir goresan jarum ose harus disterilkan. Bagian kanan merupakan cara pemurnian dengan metode inokulasi titik

Karena waktu inkubasi untuk pertumbuhan isolat lama, maka peluang terjadinya kontaminasi cukup tinggi, terutama kontaminasi kelompok fungi. Untuk mencegah agar hasil kultivasi isolat tidak mengalami kerusakan atau pengerjaan ulang, maka setiap isolat digunakan paling kurang 7 cawan petri. Semua cawan diinkubasi pada suhu 25-35°C dalam kondisi gelap. Pengamatan dilakukan pada 7 hari pertama sebanyak 2 cawan, selanjutnya pada 7 hari kedua (14 hari) dan 7 hari ketiga (21 hari). Biarkan 1 cawan sebagai cadangan jika sewaktu-waktu terjadi kasus kecelakaan seperti pecah karena terjatuh.

4. Teknik penghitungan

Penghitungan Actinobacteria khususnya yang membentuk spora atau miselia cukup sulit dibanding dengan bakteri atau khamir. Hal ini disebabkan oleh banyaknya spora yang dihasilkan sehingga menimbulkan kesulitan dalam penghitungan. Penentuan pertumbuhan atau biomassa Actinobacteria tidak mudah karena tidak adanya metode baku seperti halnya jumlah sel yang digunakan untuk menghitung bakteri dan khamir. Namun demikian metode penghitungan ini tetap mengacu pada hitungan sel-sel hidup yang dapat membentuk koloni pada media (*viable count*).

Sejumlah sampel ditimbang dengan teliti lalu dibuat pengenceran secara desimal, misalnya sampel berupa tanah sebanyak 10 gram disuspensikan ke dalam 90 mL larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} , selanjutnya diencerkan sampai tingkat pengenceran tertinggi (tergantung derajat jumlah mikroba dalam sampel).

Sampel yang telah diencerkan ditumbuhkan ke dalam media (yang telah diberi perlakuan khusus untuk menghambat pertumbuhan mikroba lain). Selanjutnya diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu untuk memberi kesempatan pertumbuhan koloni Actinobacteria. Perhitungan dilakukan dengan memperhitungkan jumlah sampel yang ditumbuhkan serta pengencerannya.

E. MEDIA ACTINOBACTERIA

1. Media Isolasi

Media kultur merupakan komponen yang sangat vital pada tahap isolasi Actinobacteria. Media yang digunakan untuk isolasi harus memiliki komponen kimiawi yang dapat memicu pertumbuhan Actinobacteria. Beberapa media yang biasa digunakan masing-masing memiliki kelebihan, tergantung dari kelompok Actinobacteria yang dijadikan target isolasi. Secara umum, media yang digunakan antara lain Starch Nitrate agar. Komposisi: *soluble starch* 20 g, NaCl 0,5 g, KNO_3 1 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, agar 20 g, 1000 mL aquades. pH media diatur menjadi 7,2-7,4 sebelum sterilisasi. Dapat juga digunakan medium chitin-agar dengan komposisi: Colloidal chitin 4 g; K_2HPO_4 0,7 g; KH_2PO_4 0,3 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; ZnSO_4 0,001 g; MnCl_2 0,001 g; agar 20; pH 7,0. Kedua media tersebut dapat diperoleh secara komersial (pabrik) atau dibuat tersendiri berdasarkan komposisi media tersebut.

Proses penyiapan media untuk isolasi Actinobacteria khususnya media yang dibuat sendiri, perlu diperhatikan beberapa hal antara lain:

bahan kimia yang digunakan harus dalam kondisi baik. Bahan kimia padat atau bubuk yang sudah mencair atau sudah kadaluarsa sebaiknya dihindari untuk digunakan. Jumlah bahan kimia yang digunakan harus ditimbang secermat mungkin untuk menghindari adanya bahan yang berlebih yang dapat mengganggu pertumbuhan mikroba khususnya bahan kimia yang digunakan dalam jumlah yang sangat sedikit (trace element).

Media yang sudah disiapkan harus dilakukan pengecekan pH sebelum dilakukan sterilisasi. Umumnya media untuk isolasi Actinobacteria memerlukan media dengan pH netral ($7 \pm 0,4$). pH yang terlalu rendah atau terlalu tinggi dapat mengganggu pertumbuhan Actinobacteria.

Perlu diketahui bahwa umumnya sumber isolat (sampel) yang digunakan untuk isolasi Actinobacteria memiliki populasi mikroba lain yang cukup tinggi. Selain itu, Actinobacteria memiliki waktu untuk berproliferasi sel (tumbuh) lebih lama dibanding dengan mikroba lainnya. Untuk itu, digunakan cara untuk mengeliminir atau menghilangkan mikroba kontaminan yang tidak diinginkan tersebut. Cara yang dilakukan antara lain menambahkan senyawa tertentu seperti antibiotika untuk mematikan atau menghambat pertumbuhan mikroba yang tidak diinginkan. Antibiotika yang sering digunakan adalah sikloheksamid [50 ppm, dilarutkan dalam etanol], nystatin [25-50 ppm] untuk menghambat pertumbuhan fungi. Cara lain yang digunakan adalah mematikan mikroba kontaminan dengan memberi kejutan panas. Sumber isolat seperti tanah atau kompos yang telah dilakukan pengenceran dipanaskan pada waterbath pada suhu 60-100°C selama 1/2 sampai 1 jam. Selanjutnya dilakukan pengenceran secara desimal berdasarkan derajat kontaminan bahan isolat. Cara ini memiliki kelemahan karena beberapa Actinobacteria tidak tahan pada kisaran suhu ini, meskipun diketahui Actinobacteria umumnya tahan terhadap suhu tinggi.

2. Media Kultur

Media kultur digunakan untuk menumbuhkan isolat Actinobacteria sehingga tumbuh secara optimum untuk tujuan tertentu. Media yang digunakan untuk kultur tergantung dari kemampuan isolat tumbuh secara optimal jika ditumbuhkan dalam media tersebut. Parameter sederhana yang digunakan untuk mengetahui media yang optimal memicu pertumbuhan isolat yaitu terjadinya pertumbuhan dalam waktu singkat dibanding dengan media lain yang digunakan. Pertumbuhan isolat biasanya ditandai dengan terjadinya perubahan media beberapa hari setelah diinokulasi isolat yaitu tidak mengalami kekeruhan media dan khas bau tanah. Berbeda dengan media yang ditumbuhi bakteri selain Actinobacteria, media menjadi keruh dan berbau busuk.

Media isolasi dapat juga digunakan sebagai media kultur jika isolat mampu tumbuh secara optimal dalam media tersebut. Meski demikian, media isolasi yang dijadikan sebagai media kultur diberi suplemen tertentu yang dapat memicu pertumbuhan isolat secara optimal. Suplemen yang diberikan umumnya dalam bentuk vitamin atau sumber karbon organik seperti pepton, yeast extract atau malt extract.

Media kultur digunakan pula untuk produksi metabolit tertentu seperti antibiotik atau senyawa bioaktif lainnya. Media ini biasanya diramu khusus dengan menambahkan komponen kimia tertentu sehingga dapat memicu produksi senyawa target bioaktif.

3. Media Karakterisasi

Actinobacteria memiliki keragaman genus dan strain yang sangat tinggi, sehingga memerlukan karakterisasi untuk membedakan antara satu dengan yang lainnya. Media yang digunakan untuk karakterisasi isolat sangat beragam, dengan tujuan untuk mengamati adanya perbedaan karakter diantara isolat.

Dalam buku ini, media karakterisasi Actinobacteria mengacu pada metode yang dipertelakan oleh Shirling dan Gottlieb, 1966 khusus untuk genus Streptomyces. Meski demikian, media tersebut dapat juga digunakan untuk karakterisasi genus lainnya seperti rare Actinobacteria.

Medium 1 (ISP1) atau Tryptone-yeast extract broth, terdiri atas:

• Bacto-tryptone	0,3 g
• Bacto-yeast extract	3 g
• Air suling	1000 mL
pH sebelum sterilisasi	7,0 -7,2

Medium 2 (ISP2) atau Yeast extract-malt extract agar

• Bacto-yeast extract	4,0 g
• Bacto-malt extract	1,0 g
• Bacto-dextrose	4,0 g
• Air suling	1000 ml
• Bacto agar	20 g
pH media sebelum ditambahkan agar dan sterilisasi	7,3

Medium 3 (ISP3) atau Oatmeal agar

• Oatmeal agar	20 g
• Agar	15-20 g

Masak atau kukus 20 g oatmeal (Quaker White Oats) dalam 1000 mL air suling selama 20 menit, selanjutnya saring dengan menggunakan kain atau tapisan halus. Tambahkan sampai 1000 mL air suling volume yang hilang setelah penapisan. Tambahkan 1 mL larutan garam trace/ kelumit (sterilisasi terpisah) lalu atur pH menjadi 7,2 dan sterilisasi. Setelah steril, media dibagi-bagi ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan sampai memadat.

Medium 4 (ISP4) atau Organic salts-starch agar

Larutan I:

Soluble starch (Pati terlarut) sebanyak 10 g dalam 500 mL air suling dibuat pasta dengan cara mencampur pati tersebut ke dalam air suling dan diaduk sampai larut sempurna.

Larutan II

• K_2HPO_4	1,0 g
• $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0 g
• NaCl	1,0 g
• $(NH_4)_2SO_4$	2,0 g
• $CaCO_3$	2,0 g
• Air suling	500 mL
		1,0 mL
• Larutan garam trace A	(Disterilisasi terpisah)
• Agar	20 g
pH media diatur menjadi	7,0 - 7,4

Medium 5 (ISP5) atau Glycerol-asparagine agar

• L-Asparagine	1 g
• Glycerol	10 g
• K_2HP_4	1 g
• Air suling	1000 mL
		1,0 mL (disterilisasi terpisah)
• Larutan garam trace A	
• Agar	20
pH media diatur menjadi	7,0 - 7,4

Medium 6 (ISP6) atau Peptone-yeast extract iron agar

• Bacto-Peptone iron agar, dehydrate	36 g
• Bacto-peptone	15 g
• Proteosa-peptone	5
• Ferric ammonium citrate	0,5 g
• Dipotassium phosphate	1 g
• Sodium thiosulfate	0,08 g
• Bacto-yeast extract	1 g
• Air suling	1000 mL
• Agar	20 g
pH media diatur menjadi	7,0 - 7,2

Medium 7 (ISP7) atau Tyrosine agar

• Glycerol	15 g
• L-tyrosine	0,5 g
• L-asparagine	1 g
• KH_2PO_4	0,5 g
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
• NaCl	0,5 g
• $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
• Air suling	1000 mL
pH medium diatur menjadi sebelum sterilisasi	7,2 – 7,4

Medium 8 (ISP8) atau Nitrate broth, untuk uji reduksi nitrat

Medium 9 (ISP9) atau media uji sumber karbon

Media ini digunakan untuk menguji kemampuan isolat menggunakan sumber karbon satu-satunya dalam medium. Media garam mineral basal agar digunakan sebagai media basal dan sumber karbon lain seperti Sukrosa, L-arabinosa, D-manitol, selulosa, raffinosa, rhamnosa, D-fruktosa dan sebagainya. Sumber karbon disterilisasi terpisah dengan

media basal untuk menghindari terjadinya pencoklatan atau perubahan bentuk senyawa sumber karbon. Sterilisasi sumber karbon tidak boleh menggunakan autoklaf tapi dapat dilakukan dengan menggunakan filter bakteri. Meski demikian, cara ini mengalami kesulitan atau tidak efisien jika sterilisasi terhadap i-inositol atau selulosa. Untuk itu, digunakan cara lain yaitu sterilisasi eter. Ditimbang dengan tepat sumber karbon dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi khusus (menggunakan tutup karet) yang bersih dan steril. Selanjutnya dimasukkan beberapa tetes dietil-eter sampai menggenangi seluruh sumber karbon dalam tabung tersebut. Tutup rapat dan biarkan semalaman, lalu tutup karet dibuka dan dibiarkan eter menguap habis. Kegiatan ini dilakukan dalam ruang aseptis untuk menghindari kontaminasi. Masukkan media basal yang telah mencair ke dalam tabung dan kocok sampai sumber karbon larut sempurna. Biarkan tabung dalam posisi miring membentuk media agar miring.

Larutan Garam Trace A

(larutan ini digunakan untuk media ISP 3, 4,5 dan 9)

• $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
• $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
• $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
• Air suling	100 mL

Larutan Garam Trace B

• $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,64 g
• $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,11 g
• $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,79 g
• $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,15 g
• Air suling	1000 mL

Garam Mineral basal Agar

• $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,64 g
• KH_2PO_4	2,38 g
• $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	5,65 g
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 g
• Larutan Garam Trace B	1,0 mL
• Air suling	1000 mL
• Agar	20 g
• pH diatur menjadi	6,8 – 7,0

Cara membuat: sterilisasi media Garam Mineral Basal agar secara terpisah, dan biarkan sampai suhu media mencapai 60°C , lalu tambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi sumber karbon. Campur secara merata dengan menggunakan magnetic stirrer, lalu biarkan memadat dalam posisi miring, atau tuangkan media dalam cawan petri steril.

F. IDENTIFIKASI AWAL ACTINOBACTERIA

Actinobacteria yang diperoleh dari hasil isolasi perlu dilakukan identifikasi untuk menentukan genus terduga. Hal ini bertujuan agar isolat yang diperoleh dapat diperlakukan pada langkah berikutnya termasuk jenis media yang cocok untuk perlakuan selanjutnya. Secara garis besarnya, kunci identifikasi awal Actinobacteria dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2.

Kunci identifikasi awal identifikasi Actinobacteria

Langkah	Test	Genus terduga	Teruskan ke langkah nomor.
1	Fragmentasi miselium substrat ke dalam elemen yang menyerupai bakteri	-	Jika ya lanjut ke langkah 2
2	Bersifat aerobik	<i>Amycolata</i>	Ya
	Bersifat anaerobik	<i>Actinomyces</i>	Ya
3	Tidak ada miselium udara	<i>Micromonospora</i>	Ya
	Ada miselium udara	-	Jika ya lanjut ke langkah 4
4	Spora terbentuk pada miselium udara dan miselium substrat	-	Jika ya lanjut ke langkah 5
	Spora hanya terbentuk pada miselium udara		Jika ya lanjut ke langkah 6
5	Spora tampak seperti rantai pendek	<i>Micropolyspora</i>	Ya
	Spora tampak sebagai spora tunggal	<i>ThermoActinobacteria</i>	Ya
	Spora tampak seperti tandan (cluster)	<i>Thermomonospora</i>	Ya

Langkah	Test	Genus terduga	Teruskan ke langkah nomor.
6	Spora tampak seperti berpasangan	<i>Microbispora</i>	Ya
	Spora tampak dalam bentuk rantai panjang atau spiral	<i>Streptomyces</i>	Ya
	Spora tunggal tetapi tampak seperti paket tebal	<i>Saccharomonospora</i>	Ya
	Spora ditemukan dalam sporangia	<i>Streptosporangium</i>	Ya

Dikutip dari: Bacterial Cell Culture, Essential Data: A.S. Ball, 1997. John Wiley & Sons.

G. PENYIMPANAN KULTUR/ISOLAT ACTINOBACTERIA

1. Pemindahan Berulang (Serial Transfer)

Cara lain yang dapat dilakukan untuk preservasi atau pengawetan mikroba adalah melakukan pemindahan berulang (serial transfer). Teknik ini dilakukan dengan cara memindahkan isolat dalam suatu medium baru secara berkala jika medium sudah mulai berkurang. Biasanya isolat yang disimpan dalam beberapa bulan pada suhu -4°C mengalami penyusutan atau bahkan mengering. Meski demikian, metode ini memiliki kekurangan seperti kemungkinan terjadinya kontaminasi yang tidak tampak pada koloni isolat yang memiliki kemiripan warna dan bentuk koloni. Kekurangan lainnya adalah kehilangan karakter genetik dan fenotip yang berdampak pada kehilangan kemampuan atau produktifitasnya untuk tumbuh atau menghasilkan metabolit. Selain itu

metode ini memerlukan biaya tinggi karena penggunaan media yang berulang-ulang dalam jangka waktu yang pendek.

2. Penyimpanan Air Suling (*Preservation in Distilled Water*)

Teknik ini biasanya disebut metode Castellani dan sudah digunakan sejak 50an tahun lalu untuk pengawetan atau penyimpanan fungi. Sebanyak 62% strain yang disimpan dengan metode ini dapat tumbuh kembali dan menunjukkan karakter morfologi asli dari isolat. Dalam beberapa kajian dilaporkan bahwa 76% khamir, fungi filamen dan Actinobacteria mampu tumbuh kembali setelah disimpan selama 10 tahun.

Teknik penyimpanan mikroba ini sangat sederhana, tetapi dapat dilakukan terutama pada laboratorium yang belum memiliki fasilitas penyimpanan yang memadai. Teknik ini juga tergolong murah dan efisien. Caranya adalah strain ditumbuhkan pada medium agar yang cocok untuk pertumbuhan strain atau isolat tersebut dengan cara menginokulasi pada titik tengah dari media cawan. Setelah mencapai pertumbuhan koloni kira-kira diameter 1-2 cm, maka koloni diambil dengan cara mencungkil agar menggunakan bor steril (\square 9 mm). Blok agar dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5-10 mL akuades steril. Tutup tabung reaksi menggunakan karet untuk mencegah terjadinya penguapan air. Simpan pada suhu 25°C dengan posisi tabung reaksi tegak.

3. Penyimpanan dalam Minyak

Metode penyimpanan lainnya yang dapat dilakukan adalah penyimpanan kultur/isolat dalam minyak mineral. Minyak mineral bertujuan untuk mencegah evaporasi sehingga medium tidak mengalami kekeringan akibat hilangnya air. Teknik ini bertujuan pula untuk menurunkan laju metabolisme dari isolat akibat terbatasnya suplai oksigen ke media oleh adanya lapisan minyak. Teknik ini lebih baik digunakan dibandingkan dengan liofilisasi terutama untuk penyimpanan strain yang tidak bersporulasi.

4. Cryopreservation

Teknik ini dilakukan dengan cara menyimpan isolat pada suhu -5 sampai -20°C selama 1 atau 2 tahun dalam kultur cair yang dibekukan atau suspensi sel dalam botol vial. Pembekuan isolat memerlukan Cryoprotectan misalnya gliserol atau dimethyl sulfoxide (DMSO) jika disimpan pada suhu -70°C atau dalam nitrogen cair pada suhu -156 sampai -196°C.

Kultur cair mikroba dipanen pada pertumbuhan tengah atau akhir fase logaritmik lalu dicampur dengan perbandingan volume yang sama dengan gliserol 10% sampai 20% (v/v) atau dengan DMSO 5% sampai 10% (v/v). Alternatif lainnya adalah penambahan gliserol 10% steril pada isolat yang telah ditumbuhkan pada agar miring.

5. Liofilisasi (Lyophilization)

Salah satu metode paling baik dilakukan untuk penyimpanan isolat dalam jangka waktu lama adalah melalui proses pengeringan beku atau liofilisasi. Teknik ini umumnya menggunakan bahan cryoprotective yaitu susu skim 15%(b/v) untuk kultur yang ditumbuhkan pada agar miring dan 20% untuk kultur cair pelet. Selain itu dapat juga digunakan sukrosa dengan konsentrasi akhir 12%. Metode ini bahkan dilaporkan berhasil dilakukan untuk menyimpan bakteri yang mengandung plasmid.



BAB 5

KARAKTERISASI ACTINOBACTERIA SECARA MORFO-FISIOLOGIK

Karakterisasi dan identifikasi kelompok Actinobacteria dilakukan dengan menggunakan berbagai pendekatan karakter antara lain, pendekatan klasik, molekular dan polifasik:

A. PENDEKATAN KLASIK

Pendekatan klasik atau konvensional merupakan cara yang dilakukan untuk mengidentifikasi Actinobacteria berdasarkan informasi fenotipik. Identifikasi ini menggunakan karakter morfologi, fisiologi dan kemotaksonomi. Morfologi dan susunan spora dan komposisi kimiawi (dinding sel, komposisi seluruh sel, jenis lipida dan quinon isoprenoid) merupakan atribut yang sangat penting dalam taksonomi Actinobacteria.

Kemotaksonomi, yaitu kajian keragaman kimiawi pada organisme dan penggunaan karakter kimia untuk klasifikasi dan identifikasi genus Actinobacteria. Kajian yang dilakukan oleh Muramatsu (2008) menunjukkan bahwa Actinobacteria memiliki suatu komposisi dinding sel yang berbeda dengan bakteri Gram positif, dan juga menunjukkan

bahwa komposisi kimiawi sel memungkinkan dijadikan sebagai metode praktis dalam membedakan berbagai tipe Actinobacteria. Karakter tersebut digunakan untuk membagi bakteri ini ke dalam beberapa kelompok yang berbeda. Bergeys manual edisi pertama membagi Actinobacteria ke dalam 7 bagian, utamanya berdasarkan jenis dinding sel, susunan konidia, dan ada atau tidaknya sporangium (Holt *et al.*, 1994).

B. PENDEKATAN MOLEKULAR

Pendekatan ini paling banyak dilakukan untuk penyusunan taksonomi melalui kajian asam nukleat. Klasifikasi kelompok bakteri mengalami percepatan selama lebih dari dua dekade oleh penggunaan data filogenetik secara molekuler. Sekuensing DNA ditransformasi untuk pengelompokan prokariotik dari kelompok besar berdasarkan kemiripan morfologi, biokimiawi dan sifat fisiologis menjadi filogenetik. Secara rinci data diperoleh dari keunikan sekuen tersebut sehingga menempatkan spesies bakteri atau bahkan strain secara detail. Hal ini berkaitan langsung dengan produk gen dan perbandingan asam nukleat yang diperoleh sehingga memberikan informasi kekerabatan yang lebih bagus.

Sistematika molekuler yang meliputi klasifikasi maupun identifikasi awalnya dilakukan melalui kajian hibridisasi, namun saat ini kajian filogenetik berdasarkan sekuens 16S rRNA lebih banyak digunakan pada bakteri maupun Actinobacteria. Salah satu gen penting pada prokariotik adalah gen rRNA yang bersifat *conserved* karena memiliki fungsi vital dalam proses metabolisme mikroba. Secara evolusioner gen ini bersifat lestari dan dimiliki oleh semua mikroba dan tidak ditemukan adanya transfer gen secara lateral antar spesies dan perubahan yang terjadi pada gen ini sangat lambat (Atlas, 1997). Gen yang mengkode rRNA ini telah digunakan secara luas untuk menganalisis hubungan antar mikroba (filogeni) dan juga dapat

digunakan untuk mengidentifikasi mikroba pada tataran genus atau spesies (Sivakumar, 2002; Sacchi *et al.*, 2002).

C. PENDEKATAN POLIFASIK

Pendekatan ini merupakan perpaduan antara pendekatan konvensional dengan pendekatan molekular. Pendekatan polifasik digunakan untuk membedakan spesies bakteri berdasarkan morfologi dan data biokimiawi yang ditambahkan dengan informasi yang dihasilkan dari teknik molekular. Pendekatan polifasik untuk klasifikasi bakteri seperti sekuensing gen 16S rRNA dan teknik sidikjari molekular yang terintegrasi dengan marka molekular merupakan alat penting pada sistematik mikroba (Vandamme *et al.*, 1996).

Sejumlah kriteria yang mencakup genotipe, kemotipe dan fenotipe digunakan untuk karakterisasi polifasik bakteri Clarridge *et al.*, 2004. Sistematik dengan pendekatan polifasik yang diperkenalkan oleh Colwell (1970) merupakan sistematik yang saat ini banyak digunakan dalam upaya untuk mengungkap keanekaragaman mikroba.

Sistematika polifasik menggunakan tiga pendekatan, yaitu: (i) sistematik numerik-fenetik yang juga dikenal sebagai klasifikasi berbasis komputer adalah klasifikasi mikroba ke dalam unit taksonomi dengan metode numerik berdasarkan karakter yang dimiliki bersama, (ii) sistematik kimiawi merupakan pendekatan dengan menggunakan data kimiawi yang diperoleh berdasarkan hasil analisis komponen kimia sel dengan metode fisiko-kimiawi seperti kromatografi gas (GC), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) yang digunakan untuk klasifikasi mikroba, (iii) sistematik molekular merupakan pendekatan dengan karakterisasi yang menggunakan data molekular yaitu DNA atau RNA.

Pada Bab ini dibahas secara khusus mengenai karakterisasi dan identifikasi Actinobacteria berdasarkan pendekatan klasik (konvensional) yaitu karakterisasi secara morfologi dan fisiologi.

1. Karakterisasi Morfologi

Kecermatan dalam melakukan karakterisasi isolat Actinobacteria sangat dipengaruhi oleh kemampuan isolat membentuk sporulasi pada media yang digunakan. Jika media yang digunakan tidak menunjukkan proses sporulasi isolat yang bagus, maka harus diganti dengan media lain yang cocok. Selanjutnya dilakukan pengamatan untuk penentuan karakteristik dari isolat tersebut.

Untuk melakukan pengujian morfologi isolat, maka semua isolat harus dikultivasi pada media standar yaitu media ISP 2, 3, 4 dan 5. Media harus dibiarkan dingin pada suhu sekitar 50°C lalu dituangkan secara aseptis pada cawan petri. Media yang telah dituang tersebut, dibiarkan paling cepat 24 jam pada suhu kamar sebelum diinokulasi isolat. Hal ini bertujuan agar media cukup kering untuk dilakukan inokulasi serta mengecek tingkat sterilisasi media sebelum digunakan. Media yang menunjukkan kontaminasi, sebaiknya dibuang dan tidak digunakan karena akan mengganggu proses karakterisasi isolat.

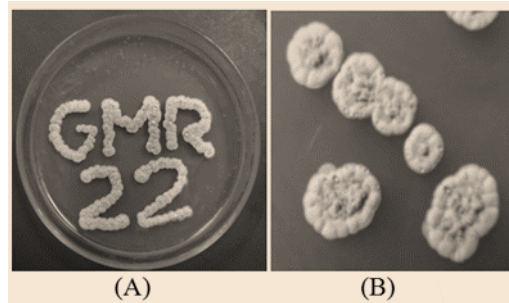
1.1. Karakter Koloni

Koloni merupakan salah satu karakter penting untuk identifikasi Actinobacteria. Beberapa Actinobacteria menunjukkan karakter koloni yang mirip dengan bakteri biasa dan juga mirip dengan koloni fungi. Karakter koloni dapat berupa warna koloni, permukaan, pinggir koloni, dll. Oleh karena itu dibutuhkan kecermatan untuk mengidentifikasi koloni tersebut. Selain itu konsistensi koloni, warna miselium pada setiap media penting untuk diamati. Sebagai gambaran umum karakterisasi morfologi dan pigmentasi dari suatu isolat dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1.Karakteristik morfologi isolat *Streptomyces* sp. GMR22 (Ali *et al*, 2012)

No	Morfologi dan Pigmentasi	Pengamatan Karakter Kultur
1.	Morfologi rantai spora	spiral (spirales)
2.	Ornamen rantai spora	berkutil (warty)
3.	Warna massa spora udara	abu-abu (grey)
4.	Pigmentasi substrat miselium	tidak (nil)
5.	Sensitivitas pigmen substrat terhadap pH	tidak (nil)
6.	Sensitivitas pigmen difusi terhadap pH	tidak (nil)
7.	Pembentukan melanin pada media pepton/yeast/iron agar	negatif (-ve)
8.	Pembentukan melanin pada tyrosine agar	negatif (-ve)
9.	Fragmentasi miselium	tidak (nil)
10.	Pembentukan sclerotia	tidak (nil)
11.	Sporulasi pada miselium substrat	tidak (nil)

Pengamatan warna koloni untuk isolat yang sama dapat berbeda warnanya jika ditumbuhkan pada media yang berbeda. Oleh karena itu perlu ditentukan jenis media yang digunakan untuk karakterisasi isolat tersebut. Berbagai media dapat digunakan untuk karakterisasi isolat Actinobacteria. Media ini dapat digunakan dengan ketentuan bahwa isolat tersebut dapat tumbuh dengan baik termasuk media yang biasa digunakan untuk pertumbuhan fungi seperti PDA.



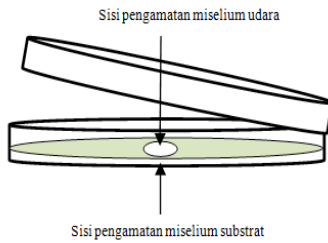
Gambar 5.1. Profil koloni isolat yang ditumbuhkan selama 2 minggu pada media SNA

Keterangan: (A). Isolat GMR22 (B). Gambar koloni yang diperbesar

1.2. Warna miselium udara dan miselium substrat

Selain warna koloni, warna miselium sangat penting ditentukan. Ada 2 miselium terutama pada kelompok Actinobacteria yang membentuk miselium yaitu miselium udara (aerial) dan miselium substrat (vegetatif). Untuk menentukan warna miselium udara, maka cara yang dilakukan adalah mengamati warna pada bagian tengah koloni, sedangkan miselium substrat dilihat dengan cara membalikkan cawan petri. Warna yang timbul pada bagian tengah koloni merupakan warna miselium substrat (Gambar 5.2).

Bagian tengah koloni dijadikan sebagai penanda warna karena pada bagian tersebut miselium sudah matang sehingga menimbulkan warna miselium sesungguhnya. Berbeda dengan warna pada pinggir koloni yang miseliumnya masih sangat muda, sehingga tidak direkomendasi untuk penentuan warna miselium. Warna koloni Actinobacteria biasanya berubah warna dengan bertambahnya waktu inkubasi, misalnya pada umur 7 hari berwarna putih, kemudian berubah menjadi abu-abu setelah 2 minggu bahkan menjadi hitam setelah 1 atau 2 bulan.



Gambar 5.2. Penentuan warna miselium udara dan miselium substrat

Mengingat beragamnya warna yang dibentuk oleh miselium dan sulitnya menginterpretasi jenis warna antara satu pengamat dengan lainnya misalnya warna kuning tua dengan agak tua atau oranye muda. Untuk memudahkan, maka dibuat suatu panduan Harmoni Warna yang disertai dengan kode warna tersebut seperti pada Gambar 5.3.

1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007
1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018
1019	1020	1021	1023	1024	1027	1028	1032
1033	1034	2000	2001	2002	2003	2004	2008
2009	2010	2011	2012	3000	3001	3002	3003
3004	3005	3007	3009	3011	3012	3013	3014
3015	3016	3017	3018	3020	3022	3027	3031
4001	4002	4003	4004	4005	4006	4007	4008
4009	5000	5001	5002	5003	5004	5005	5007
5008	5009	5010	5011	5012	5013	5014	5015
5017	5018	5019	5020	5021	5022	5023	5024
6000	6001	6002	6003	6004	6005	6006	6007
6008	6009	6010	6011	6012	6013	6014	6015
6016	6017	6018	6019	6020	6021	6022	6024
6025	6026	6027	6028	6029	6032	6033	6034
7000	7001	7002	7003	7004	7005	7006	7008
7009	7010	7011	7012	7013	7015	7016	7021
7022	7023	7024	7026	7030	7031	7032	7033
7034	7035	7036	7037	7038	7039	7040	7042
7043	7044	8000	8001	8002	8003	8004	8007
8008	8011	8012	8014	8015	8016	8017	8019
8022	8023	8024	8025	8028	9001	9002	9003
9004	9005	9010	9011	9016	9017	9018	

RAL 9000	RAL 9011	RAL 9013	RAL 9033	RAL 9035	RAL 9004	RAL 9015
RAL 9001	RAL 9012	RAL 9010	RAL 9034	RAL 9010	RAL 9005	RAL 9016
RAL 9002	RAL 9013	RAL 9011	RAL 9000	RAL 9011	RAL 9007	RAL 9017
RAL 9003	RAL 9014	RAL 9013	RAL 9001	RAL 9012	RAL 9009	RAL 9018
RAL 9014	RAL 9015	RAL 9014	RAL 9002	RAL 9011	RAL 9011	RAL 9020
RAL 9005	RAL 9016	RAL 9015	RAL 9003	RAL 9004	RAL 9013	RAL 9021
RAL 9006	RAL 9017	RAL 9008	RAL 9004	RAL 9003	RAL 9013	RAL 9027
RAL 9007	RAL 9018	RAL 9002	RAL 9008	RAL 9003	RAL 9014	RAL 9031
RAL 6001	RAL 6009	RAL 6008	RAL 6017	RAL 6000	RAL 6009	RAL 6016
RAL 6002	RAL 6002	RAL 6000	RAL 6016	RAL 6001	RAL 6009	RAL 6017
RAL 6004	RAL 6001	RAL 6010	RAL 6019	RAL 6009	RAL 6013	RAL 6019
RAL 6005	RAL 6003	RAL 6012	RAL 6021	RAL 6004	RAL 6012	RAL 6020
RAL 6006	RAL 6004	RAL 6013	RAL 6022	RAL 6005	RAL 6013	RAL 6021
RAL 6007	RAL 6006	RAL 6014	RAL 6023	RAL 6006	RAL 6014	RAL 6022
RAL 6008	RAL 6007	RAL 6015	RAL 6024	RAL 6007	RAL 6015	RAL 6023
RAL 6025	RAL 7000	RAL 7009	RAL 7022	RAL 7034	RAL 7043	RAL 8008
RAL 6026	RAL 7001	RAL 7010	RAL 7023	RAL 7035	RAL 7044	RAL 8011
RAL 6027	RAL 7002	RAL 7011	RAL 7024	RAL 7036	RAL 8000	RAL 8012
RAL 6028	RAL 7003	RAL 7012	RAL 7025	RAL 7037	RAL 8001	RAL 8013
RAL 6029	RAL 7004	RAL 7013	RAL 7026	RAL 7038	RAL 8002	RAL 8014
RAL 6030	RAL 7005	RAL 7014	RAL 7027	RAL 7039	RAL 8003	RAL 8015
RAL 6031	RAL 7006	RAL 7015	RAL 7028	RAL 7040	RAL 8004	RAL 8016
RAL 6032	RAL 7007	RAL 7016	RAL 7029	RAL 7041	RAL 8005	RAL 8017
RAL 6033	RAL 7008	RAL 7017	RAL 7030	RAL 7042	RAL 8006	RAL 8018
RAL 6034	RAL 7009	RAL 7018	RAL 7031	RAL 7043	RAL 8007	RAL 8019
RAL 9002	RAL 9003	RAL 9000	RAL 9011			
RAL 9003	RAL 9000	RAL 9004	RAL 9016			
RAL 9004	RAL 9001	RAL 9005	RAL 9017			
RAL 9005	RAL 9002	RAL 9010	RAL 9018			

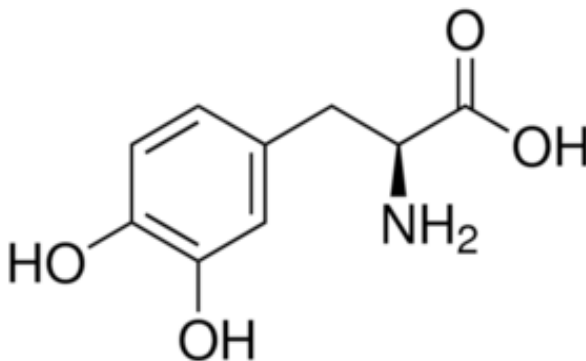
Die Farbkombi sind unverändert (Unverändert) und dienen lediglich der Orientierung.

Gambar 5.3. Harmoni warna yang dapat digunakan untuk menentukan warna pada isolat Actinobacteria. Setiap warna diberi kode angka yang berbeda sesuai dengan warna yang ditunjuk.

1.3. Pigmen Melanoid

Beberapa Actinobacteria mampu mensintesis dan mensekresikan zat warna gelap (melanin atau melanoid) yang dapat dijadikan sebagai kriteria untuk kajian taksonomi (Arai dan Mikami, 1972). Senyawa melanin merupakan polimer coklat tua yang bersifat irregular yang diproduksi oleh berbagai mikroba melalui proses oksidasi fermentatif. Senyawa ini bersifat sebagai radioprotective dan antioksidan yang sangat efektif untuk melindungi mikroba dari pengaruh buruk radiasi ultraviolet. Melanin sering digunakan dalam bidang kesehatan, farmasi dan kosmetika.

Biosintesis melanin dilakukan oleh enzim tirosinase yang mengubah tirosin menjadi L-DOPA (3, 4-dihydroxy phenyl-L- alanine), yang selanjutnya diubah menjadi dopachrome. Melalui proses auto-oksidasi, maka L-DOPA berubah menjadi indol-5, 6-quinone. Senyawa terakhir tersebut mengalami polimerisasi spontan membentuk DOPA-melanin yang berwarna coklat tua seperti pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4. Struktur L-DOPA (3, 4-dihydroxy phenyl-L- alanine)

1.4. Pigmen Terlarut

Strain Actinobacteria dibagi menjadi dua kelompok berdasarkan kemampuannya membentuk pigmen terlarut selain pigmen melanin.

Pigmen terlarut (soluble pigment), dapat dilihat jika pada medium tumbuh terdapat pigmen yang dibentuk oleh isolat. Biasanya pigmen terlarut menyebar disekitar koloni dan menyebabkan media berwarna sesuai dengan pigmen yang dihasilkan (bukan warna yang terbentuk dibawah koloni). Pigmen yang umum dihasilkan oleh Actinobacteria antara lain: kuning, oranye, coklat dan hitam.

1.5. Karakter Spora

Penentuan karakteristik rantai spora hifa dilakukan dengan menggunakan pengamatan secara mikroskopik. Pengamatan morfologi dapat dilakukan secara mikroskopis (perbesaran 400x) yang dilakukan pada kultur berumur 2 minggu pada medium ISP2. Hasil pengamatan mikroskop dengan perbesaran ini biasanya belum jelas struktur rantai dari isolat tersebut. Oleh karena itu perlu dilakukan pengamatan mikroskopik dengan pembesaran yang lebih tinggi.

Untuk pengamatan secara detail, maka pengamatan morfologi dengan menggunakan mikroskop elektron (SEM) penting dilakukan. Hal ini disebabkan oleh terbatasnya kemampuan mikroskop cahaya untuk pengamatan struktur rantai spora. Penggunaan SEM memungkinkan struktur luar Actinobacteria dapat diamati secara detail. Salah satu bagian yang tidak dapat diamati dengan mikroskop cahaya adalah struktur permukaan rantai spora.

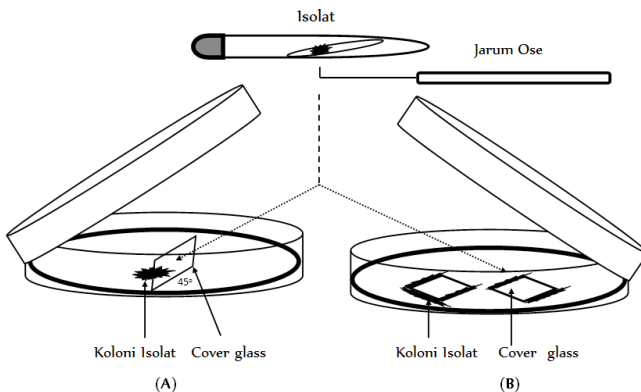
Teknik penyediaan sampel/spesimen untuk pengamatan rantai spora dapat dilakukan melalui beberapa metode. Salah satunya dengan teknik pembedahan cover glass pada media yang ditumbuhi koloni Actinobacteria. Prinsip metode ini adalah miselium Actinobacteria yang tumbuh akan merayap ke permukaan cover-glass sehingga dapat secara langsung digunakan sebagai spesimen untuk pengamatan mikroskopis. Hasil pengamatan mikroskopik dengan menggunakan metode ini biasanya lebih baik dibandingkan dengan mencungkil koloni lalu meletakkan di atas permukaan cover glass. Struktur miselium atau hifa biasanya rusak akibat pencungkilan, sedangkan metode pembedahan

yang tidak dilakukan pencungkilan menyebabkan struktur miselium/hifa tidak mengalami kerusakan.

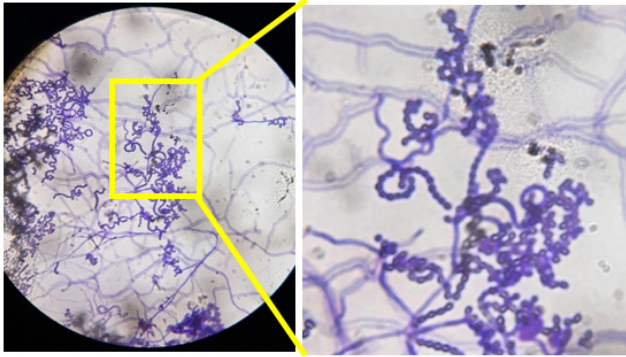
Secara sederhana metode tersebut dapat dijelaskan sebagaimana terlihat pada Gambar 5.5 (A), cover glass steril dibenamkan pada salah satu bagian pinggirnya ke dalam medium yang ditumbuhi koloni. Pembenanaman cover glass dilakukan dengan cara menancapkan pada pinggiran koloni dengan kemiringan 45° (untuk menghindari agar tidak terkena tutup cawan).

Dapat juga dilakukan dengan cara seperti metode Gambar 5.5 (B), yaitu cover glass steril diletakkan di atas permukaan medium agar, lalu diinokulasikan isolat pada bagian pinggir cover glass. Koloni yang tumbuh akan merayap pada permukaan cover glass, sehingga dapat diambil nantinya untuk pengamatan mikroskopik secara langsung seperti pada (Gambar 5.6) atau untuk preparasi mikroskopik SEM (Gambar 5.8).

Meski demikian beberapa teknik penyediaan kultur slide dapat dilakukan modifikasi sesuai dengan keperluan dan pengalaman peneliti. Cara lainnya adalah menumbuhkan isolat pada media yang ditaruh pada bagian permukaan objek gelas lalu ditutup dengan cover glass. Setelah inkubasi, preparat dapat langsung diamati dibawah mikroskop.

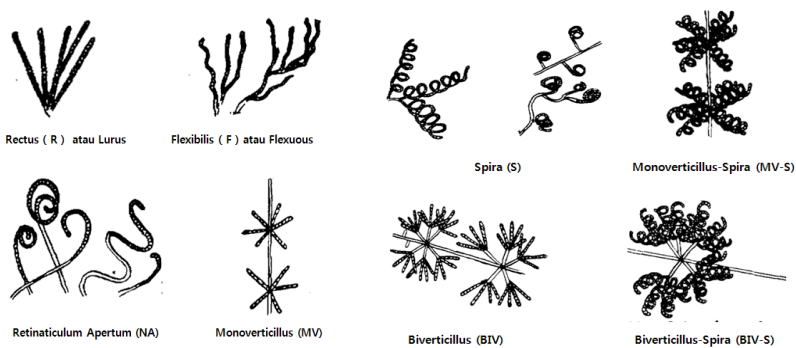


Gambar 5.5. Teknik penyediaan sampel untuk pengamatan mikroskopik miselium Actinobacteria

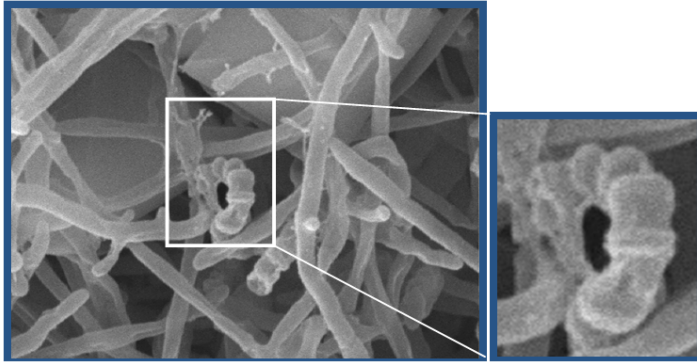


Gambar 5.6. Pengamatan mikroskopik (400x) karakteristik morfologi isolat GMR22 yang menunjukkan morfologi dan ornamen spora *Streptomyces* spp. (Dok.Penulis)

Berdasarkan karakter rantai spora hifa, maka isolat dapat dikelompokkan ke dalam 2 kategori utama yaitu: SIMPEL dan VERTICILLATA. Spesies yang termasuk ke dalam genus *Streptomyces* dibagi ke dalam 3 bentuk yaitu **rectiflexibiles** (RF), **retinaculiaperti** (RA) dan **Spirales** (S). Bila suatu strain membentuk kedua tipe rantai spora tersebut, keduanya dicatat sebagai (SRA). Bentuk Verticillata terdiri atas: Monoverticillus (MV), Monoverticillus-spira (MV-S), Biverticillus (BIV) dan Biverticillus-spira (BIV-S). Kedua bentuk tersebut dapat dilihat pada Gambar 5.7.



Gambar 5.7. Bentuk-bentuk morfologi Actinobacteria



Gambar 5.8. *Scanning Electrone Micrograph* (SEM) yang menunjukkan morfologi dan ornamen spora *Streptomyces* sp. (Dok. Penulis)

Karakterisasi Actinobacteria terutama penghasil metabolit baru (novel) merupakan tahapan penting dalam program skrining mikroba. Hal ini bertujuan untuk memastikan isolat yang ditemukan nantinya dapat di deskripsi jika nantinya akan diajukan untuk paten. Umumnya Actinobacteria dapat dilakukan identifikasi pada aras genus berkisar antara 2-3 minggu masa inkubasi. Secara umum identifikasi Actinobacteria pada aras genus dapat dilakukan dengan mengamati ciri-ciri seperti tertera pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2.

Karakter umum genus Actinobacteria berdasarkan tipe dinding sel dan deskripsi mikromorfologi

Dinding sel	Genus	Karakter umum
Tipe I	<i>Streptomyces</i>	Rantai konidia pada miselium udara
	<i>Streptoverticillium</i>	Rantai atau umbel konidia pada verticil yang terbentuk pada miselium udara
	<i>Nocardioiodes</i>	Membentuk fragmen miselium udara dan substrat ke dalam bentuk-bentuk cocoid
	<i>Actinopycnidium</i>	Sama dengan <i>Streptomyces</i> , tetapi terbentuk struktur menyerupai piknidia
	<i>Actinosporangium</i>	Sama dengan <i>Streptomyces</i> tetapi spora-spora membentuk kumpulan tetesan
	<i>Chainia</i>	Sama dengan <i>Streptomyces</i> tetapi terbentuk sklerotia
	<i>Sporichthya</i>	Tak ada miselium substrat, rantai udara konidia bersifat motil dan berlekatan pada permukaan substrat oleh holdfast
	<i>Kitasatoa</i>	Spora tunggal pada sporangia pada miselium udara dan substrat, spora motil

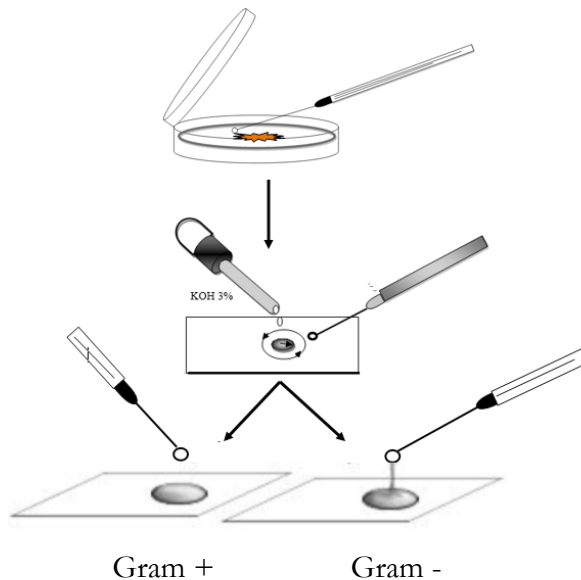
Dinding sel	Genus	Karakter umum
Tipe II	<i>Micromonospora</i>	Tidak ada miselium udara, terbentuk konidia tunggal
	<i>Actinoplanes</i>	Sporangia globosa sampai lageniform; sporangia motil
	<i>Amorphosporangium</i>	Sama dengan <i>Actinoplanes</i> tetapi sporangia irregular; spora umumnya non motil
	<i>Ampullariella</i>	Sporangia lageniform sampai globosa; spora batang motil
	<i>Dactylosporangium</i>	Sporangia claviform mengandung satu rantai spora motil
	<i>Glycomyces</i>	Miselium udara dengan rantai konidia non motil
Tipe III	<i>Actinosynnema</i>	Synnemata dengan rantai konidia motil
	<i>Nocardiopsis</i>	Rantai konidia panjang pada miselium udara
	<i>Thermomonospora</i>	Konidia tunggal terbentuk pada miselium udara dan substrat
	<i>Thermoactinomyces</i>	Endospora tunggal resisten panas terbentuk pada miselium udara dan substrat
	<i>Actinomadura</i>	Konidia rantai pendek pada miselium udara
	<i>Microbispora</i>	Konidia longitudinal berpasangan pada miselium udara
	<i>Microtetraspora</i>	Rantai 4 sampai 6 konidia pada miselium udara
	<i>Planobispora</i>	Sporangia silindris, setiap sporangia mengandung 2 spora motil
	<i>Streptosporangia</i>	Sporangia globose dengan spora non motil

Dinding sel	Genus	Karakter umum
Tipe IV	<i>Nocardia</i>	Berfilamen banyak, seringkali membentuk fragmentasi batang coccoid, kadang-kadang terbentuk miselium udara dan miselium substrat
	<i>Actinopolyspora</i>	Konidia rantai panjang pada miselium udara dan miselium substrat kadang terfragmentasi
	<i>Amycolata</i>	Filamentasi banyak, terbetuk rantai kondia pada miselium udara, miselium substrat kadang terfragmentasi
	<i>Amycolatopsis</i>	Sama dengan <i>Amycolata</i>
	<i>Micropolyspora</i>	Rantai kondia pendek terbentuk pada miselium udara dan miselium substrat
	<i>Pseudonocardia</i>	Konidia panjang, silindris, yang terbentuk pada miselium udara yang terbagi ke dalam coccoid pendek
	<i>Saccharomonospora</i>	Rantai tunggal primer pada miselium udara
	<i>Saccharopolyspora</i>	Mirip dengan <i>Nocardiopsis</i>
Tipe X	<i>Kitasatospora</i>	Konidia rantai panjang yang terbentuk pada miselium udara. Genus ini sudah dimasukkan ke dalam kelompok Streptomyces

1.6. Pewarnaan Gram

Actinobacteria merupakan bakteri Gram positif, namun demikian cara penentuan reaksinya terhadap pewarnaan umumnya tidak dilakukan dengan metode yang umum digunakan pada kebanyakan bakteri. Hal ini berkaitan dengan pembentukan filamen yang umumnya ditemukan pada actinobacteria yang mirip dengan jamur, meski demikian beberapa diantaranya tidak membentuk filamen dan bahkan menyerupai bakteri secara umum (Firmicutes).

Perlu diketahui bahwa penentuan sifat Gram pada bakteri dapat dilakukan melalui teknik pengecatan (pewarnaan) atau dapat ditentukan melalui analisis genetik (misalnya analisis sekuen gen). Secara sederhana penentuan sifat Gram untuk actinobacteria dapat dilakukan dengan metode uji menggunakan KOH 3% atau biasa disebut *uji string*. Prinsip metode ini adalah basa kuat KOH bereaksi dengan dinding sel bakteri menyebabkan terjadinya lisis sel (pecah) sehingga DNA seluler keluar mengakibatkan campuran menjadi kental dan jika ditarik dengan ujung ose akan terbentuk benang (string). Pada bakteri Gram negatif dinding peptidoglikannya tipis menyebabkan dinding sel mudah pecah, sehingga terbentuk campuran kental oleh DNA sedangkan bakteri Gram positif tidak terbentuk kekentalan cairan (tidak terbentuk benang, string). Metode penentuan sifat Gram actinobacteria dengan menggunakan uji string dapat dilihat pada Gambar 5.9 berikut:



Gambar 5.9. Metode penentuan sifat Gram actinobacteria menggunakan uji string

2. Karakterisasi Fisiologik

Pengujian fisiologi isolat merupakan salah satu langkah penting untuk karakterisasi isolat Actinobacteria. Pengujian ini untuk mengetahui respon isolat terhadap media tumbuh yang digunakan. Setiap isolat memiliki respon yang berbeda terhadap proses metabolismenya, sehingga dapat digunakan sebagai bagian dalam proses karakterisasi. Beberapa jenis pengujian karakter fisiologis dapat diuraikan sebagai berikut:

2.1. Uji produksi melanin

Pengujian ini digunakan untuk menentukan apakah suatu isolat menghasilkan pigmen melanin atau tidak. Pengujian dilakukan dengan menggunakan media ISP 6 dan ISP7 agar miring atau agar cawan. Langkah yang dilakukan adalah: inokulasi isolat pada tabung reaksi atau cawan yang berisi media tersebut diatas dengan cara goresan (digunakan kultur yang berumur kurang dari 3 minggu, kecuali isolat yang lambat membentuk spora). Pengamatan produksi melanin dilakukan setelah inkubasi 2 atau 4 hari, bandingkan dengan media yang tidak diinokulasi isolat (gunakan sebagai kontrol). Amati adanya pembentukan pigmen coklat kehijauan atau coklat tua dan catat pula adanya difusi pigmen yang terbentuk pada media. Nyatakan sebagai positif (+) jika terbentuk warna tersebut dan negatif (-) jika tidak terbentuk.

2.2. Penggunaan Karbon

Actinobacteria memiliki kemampuan yang berbeda terhadap penggunaan sumber karbon satu-satunya dalam pertumbuhannya. Untuk melakukan pengujian ini, maka langkah yang dilakukan adalah: isolat diinokulasi secara goresan pada agar miring atau cawan petri yang berisi media ISP9.

Gunakan lebih dari 3 tabung atau cawan untuk setiap isolat untuk menghindari terjadinya pengulangan akibat kontaminasi atau untuk menjaga kevalidan data pengamatan. Gunakan 1 perlakuan

tabung/cawan yang tidak diberi sumber karbon sebagai kontrol negatif, 1 perlakuan yang diberi D-glukosa sebagai kontrol positif. Hal ini dilakukan untuk menguji apakah media yang digunakan tidak mengandung sumber karbon lain selain yang digunakan (kontrol negatif) serta untuk menguji isolat tumbuh atau tidak dengan sumber karbon sederhana (kontrol positif). Sumber karbon yang biasa digunakan antara lain: D-glukosa, manitol, rafinosa, inositol, xylosa, laktosa, galaktosa, selulosa, xylan, sukrosa, fruktosa dsb.

Inkubasi semua tabung atau cawan pada suhu 26-28°C selama 14 hari, lalu amati terjadinya pertumbuhan. Tabung/cawan yang menunjukkan adanya pertumbuhan isolat dinyatakan positif (+) dan sebaliknya negatif (-).

Nyatakan: penggunaan sangat positif dengan tanda (++), yaitu jika pertumbuhan pada media sumber karbon satu-satunya sama dengan kontrol positif (D-glukosa)

Penggunaan karbon positif/moderat dengan tanda (+), jika pertumbuhan isolat kurang baik dibanding dengan kontrol positif, tapi lebih baik dibandingkan dengan medium basal tanpa sumber karbon.

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

Penggunaan negatif (-), jika pertumbuhan isolat mirip atau tidak tumbuh pada media basal tanpa sumber karbon.

2.3. Uji Hidrolisis

Uji karakter fisiologi lainnya yang digunakan adalah uji hidrolisis terhadap beberapa senyawa antara lain:

2.3.1. Gelatin

Formula Medium nutrient-gelatine tegak

• Ekstrak daging (beef extract)	3 g
• Peptone	5 g
• Gelatine	120 g

Penyiapan dan Pengamatan

Agar boleh ditambahkan 0,5%. Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C. Inokulasi secara tusukan (stab) isolat pada media tegak. Inkubasi selama 4-5 hari pada suhu optimum. Setelah inkubasi, amati terjadinya pencairan gelatine setelah dimasukkan ke dalam refrigotor selama 2 jam.

2.3.2. Casein

• Beef extract	10 g
• Peptone	10 g
• NaCl	5 g
• Agar	15 g
• Akuades	1000 mL

Sterilisasi selama 15 menit pada suhu 121°C. Lalu tambahkan skim milk yang telah dipanasi pada suhu 115°C selama 10 menit. Tuang ke dalam cawan petri dan biarkan memadat, lalu inokulasi isolat secara gores. Amati terbentuknya zona bening disekitar koloni isolat yang menunjukkan terjadinya hidrolisis casein.

2.3.3. Pati

Strain/isolat diinokulasikan pada media ISP4 lalu di inkubasi selama 7 hari. Media digenangi dengan iodium (JK-J), jika terbentuk zona bening disekitar koloni, menunjukkan bahwa isolat mampu menghidrolisis pati.

2.3.4. Hidrolisis Tween 80

(a)		
• Peptone		10 g
• NaCl	5 g
• $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
• BCP	25 mg
• Agar	20 g
• Akuades	1000 mL
(b)		
• Tween-80	100 mL

Semua bahan pada item (a) dilarutkan dan diatur pH 5,4 lalu disterilkan. Larutan tween-80 pada item (b) disterilkan terpisah. Untuk 100 mL media, sebanyak 10 mL larutan tween-80 dicampurkan dengan media item (a) 90 mL, lalu dituang ke cawan petri. Media kuning berubah menjadi pink (ungu) menunjukkan hidrolisis tween positif.

2.3.5. Hidrolisis Aesculine

Aesculine broth media

• Aesculine	1 g
• Ferric citrate	0,5 g
• Peptone water	1000 mL

Untuk media agar tambahkan agar pada media aesculine diatas dengan 2% agar. Larutkan aesculine dan garam besi ke dalam peptone water, sterilisasi pada suhu 115°C selama 10 menit.

Inokulasi aesculine broth dengan isolat dan amati tiap hari sampai hari ke 7 terbentuknya warna hitam menunjukkan terjadinya hidrolisis aesculine.

Cara lainnya adalah inokulasi isolat pada media aesculine agar dan amati terbentuknya warna hitam di dalam atau sekitar pertumbuhan koloni.

2.3.6. Hidrolisis Arginine

Formula Arginine broth media

• Peptone	5 g
• Yeast extract	5 g
• K_2HPO_4	2 g
• Glucose	0,5 g
• Arginine monohydrochloride	3 g
• Akuades	

Penyiapan

Larutkan semua komponen dengan pemanasan, atur pH menjadi 7,0 lalu rebus dan saring. Sterilisasi pada suhu 115°C selama 20 menit.

Pengamatan

Inokulasi isolat pada 5 ml arginine broth media dan inkubasi selama 24 jam lalu tambahkan 0,25 mL reagen Nessler (Larutkan 5 gram kalium iodida dalam 5 mL akuades. Tambahkan larutan jenuh merkuri klorida jenuh sampai terbentuk endapan permanen setelah dikocok. Tambahkan 40 mL NaOH 9N, encerkan dengan akuades sampai 100 mL dan biarkan selama 24 jam sebelum digunakan. Alternatif lainnya adalah larutkan 8 g kalium iodida dan 11,5 g merkuri iodida dalam 20 mL akuades dan jadikan sampai 50 mL, tambahkan 50 mL NaOH 6N, campur dan biarkan 24 jam sebelum digunakan. Catatan, air yang digunakan tidak boleh mengandung ammonia, hindari cahaya). Hidrolisis arginine positif jika terbentuk warna coklat pada media.

2.3.7. Medium Basal untuk uji Hypoxanthine, Tyrosine dan Xanthine Agar

Formula:

• Beef extract	3,0 g
• Peptone	5,0 g
• Agar	20 g
• Akuades	1000 mL

Penyiapan : Campur semua bahan diatas satu persatu dalam labu Erlenmeyer, panaskan semua bahan larut sempurna. Pindahkan 100mL ke dalam labu 250, lalu sterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C, 15 atm. Biarkan medium tetap pada suhu 50°C dalam waterbath, lalu campurkan dengan larutan Hypoxanthine, Tyrosine dan Xanthine. Medium Basal dapat juga disimpan pada suhu 4°C, dapat dicairkan sebelum digunakan.

2.3.8. Tyrosine Agar

Formula:

• Medium Basal	100 mL
• Tyrosine	0,5 g
• Akuades	10 mL

Penyiapan: Siapkan larutan tyrosine steril dengan cara tyrosine dilarutkan ke dalam akuades lalu disterilisasi dengan menggunakan filter ukuran 0,22 μ . Tambahkan 10 mL larutan tyrosine steril ke dalam labu atau botol yang berisi Medium Basal, lalu campur sampai homogen. Secara aseptis, pindahkan 25 mL medium tadi ke dalam cawan petri steril. Beri label dan masukkan ke dalam wadah plastik untuk mencegah kontaminasi dan dehidrasi.

Pengamatan: Hidrolisis tyrosine positif jika terbentuk zona bening disekitar koloni isolat (*Streptomyces griseus* dan *Actinomadura madurae*, positif), sedangkan non hidrolisis (*Nocardia asteroides*)

2.3.9. Xanthine Agar

Formula:

- Medium Basal 100 mL
- Xanthine 0,4 g
- Akuades 10 mL

Penyiapan: Siapkan larutan Xanthine steril dengan cara Xanthine dilarutkan ke dalam akuades lalu disterilisasi dengan menggunakan filter ukuran 0,22 μ . Tambahkan 10 mL larutan Xanthine steril ke dalam labu atau botol yang berisi Medium Basal, lalu campur sampai homogen. Secara aseptis, pindahkan 25 mL medium tadi ke dalam cawan petri steril. Beri label dan masukkan ke dalam wadah plastik untuk mencegah kontaminasi dan dehidrasi.

Pengamatan: Hidrolisis Xanthine positif jika terbentuk zona bening disekitar koloni isolat (*Streptomyces griseus*, positif), sedangkan non hidrolisis Xanthine (*Nocardia asteroides* dan *Actinomadura madurae*)

2.3.9. Hypoxanthine Agar

Formula:

- Medium Basal 100 mL
- Hypoxanthine 0,5 g
- Akuades 10 mL

Penyiapan: Siapkan larutan Hypoxanthine, sterilisasi dengan cara Hypoxanthine dilarutkan ke dalam akuades lalu disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit. Tambahkan 10 mL larutan Hypoxanthine steril ke dalam labu atau botol yang berisi Medium Basal, lalu campur sampai homogen. Secara aseptis, pindahkan 25 mL medium tadi ke dalam cawan petri steril. Beri label dan masukkan ke dalam wadah plastik untuk mencegah kontaminasi dan dehidrasi.

Pengamatan: Hidrolisis Hypoxanthine positif jika terbentuk zona bening disekitar koloni isolat (*Streptomyces griseus*, positif), sedangkan non hidrolisis Hypoxanthine (*Nocardia asteroides* dan *Actinomadura madurae*)

3. Uji Kemampuan Tumbuh pada Senyawa

Beberapa senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan isolat dapat digunakan untuk menguji kemampuan tumbuh isolat Actinobacteria. Senyawa-senyawa tersebut antara lain: Kristal violet, NaCl, lizozim, fenol, kalium telurit, natrium azida dan antibiotik

Isolat diinokulasi pada medium ISP2 cair yang mengandung senyawa yang tertera diatas dengan menyesuaikan sampai didapatkan konsentrasi akhir dalam media. Selanjutnya isolat diinkubasi selama 7-10 hari pada suhu 30-35°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan pada masing-masing konsentrasi senyawa penghambat. Isolat yang mampu tumbuh pada konsentrasi tertinggi dari senyawa tersebut dinyatakan sebagai isolat tahan terhadap senyawa pada konsentrasi tersebut.

3.1. Ketahanan terhadap senyawa kristal violet

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

3.2. Ketahanan terhadap senyawa NaCl

Isolat diinokulasi pada medium ISP2 cair yang mengandung 0 sampai 15g/L NaCl. Selanjutnya isolat diinkubasi selama 10 hari pada suhu 30°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan pada masing-masing konsentrasi NaCl. Isolat yang mampu tumbuh

pada konsentrasi tertinggi dinyatakan sebagai isolat tahan terhadap NaCl pada konsentrasi tersebut.

3.3. Ketahanan terhadap senyawa lisozim.

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

3.4. Ketahanan terhadap senyawa fenol

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

3.5. Ketahanan terhadap senyawa natrium telurit.

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

3.6. Ketahanan terhadap senyawa natrium azide

Isolat diinokulasi pada medium ISP2 cair yang mengandung 0 sampai 0,2g/L natrium azide. Selanjutnya isolat diinkubasi selama 10 hari pada suhu 30°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan pada masing-masing konsentrasi natrium azide. Isolat

yang mampu tumbuh pada konsentrasi tertinggi dinyatakan sebagai isolat tahan terhadap natrium azide pada konsentrasi tersebut.

3.7. Ketahanan terhadap antibiotik (mg/L)

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

4. Optimasi pH pertumbuhan

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

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

5. Aktivitas katalase

Isolat ditumbuhkan dalam media ISP2 agar miring, diinkubasi pada suhu kamar selama 4 hari pada keadaan gelap. Tabung digenangi dengan larutan H₂O₂ 3% dan dibiarkan beberapa menit. Katalase positif jika terbentuk gelembung atau gas pada kultur.

3. Karakterisasi Kemotaksonomi

Kemotaksonomi adalah kajian mengenai keragaman senyawa kimia dalam organisme yang digunakan sebagai penciri kimiawi untuk digunakan dalam identifikasi dan klasifikasi. Kemotaksonomi merupakan salah satu metode penting untuk mengidentifikasi genus Actinobacteria.

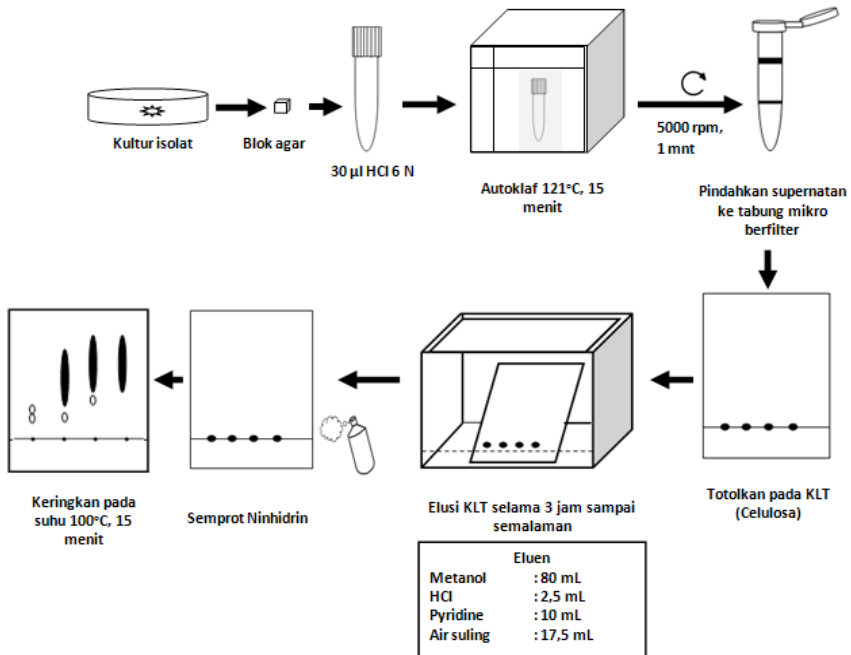
Kemajuan teknologi analisa seperti elektroforesis, kromatografi dan spektroskopi berdampak pada pengembangan dan penerapan teknologi untuk tujuan kemotaksonomi dalam membedakan Actinobacteria pada level genera atau spesies. Penggunaan metode analisis dengan kondisi standar yang tinggi merupakan syarat utama untuk analisis fenotifik. Data yang diperoleh dari peralatan tersebut dapat digunakan untuk tujuan analisis fenotifik, hibridisasi DNA-DNA atau sekuen 16S rDNA.

3.1 Analisis struktur dinding sel

Penelitian yang dilakukan oleh Cummins dan Harris (1956) menemukan bahwa Actinobacteria memiliki komposisi dinding sel mirip bakteri Gram-positif. Olehnya itu komposisi kimia dinding sel dapat memberikan petunjuk praktis untuk membedakan berbagai jenis Actinobacteria. Fakta ini menunjukkan bahwa komponen kimia organisme memenuhi syarat memuaskan, sehingga sangat berarti diterapkan dalam sistematika.

Actinobacteria aerobik umumnya mudah dibedakan ke dalam genera yang berbeda berdasarkan sifat morfologis, fisika maupun kimiawi. Kebanyakan Actinobacteria memiliki dinding sel tipe I sampai IV dengan peptidoglikan yang mengandung asam L-diaminopemilat (DAP) dan glisin (tipe I), *meso*-DAP dan glisin (tipe II), *meso*-DAP (tipe III), atau *meso*-DAP, arabinosa, dan galaktosa (tipe IV)(Gambar 5.10). Genus *Streptomyces* diketahui secara umum memiliki dinding sel tipe I. *Micromonospora* dan *Actinoplanes* tipe II, *Thermo-Actinobacteria*, *Microtetraspora* dan *Frankia* merupakan genera tipe III. Dinding sel tipe IV terdiri atas

dua familia yang memiliki asam mikolat (*Mycobacteriaceae*) dan tanpa asam mikolat (*Pseudonocardia*). Genera dari Familia *Pseudonocardia* antara lain *Amycolatopsis*, *Amycolata*, *Pseudocardia*, *Saccharomonospora*, dan *Saccharopolyspora* (Stanek & Robert, 1974; Euverink, 1999 ; Li *et al.*, 2004).



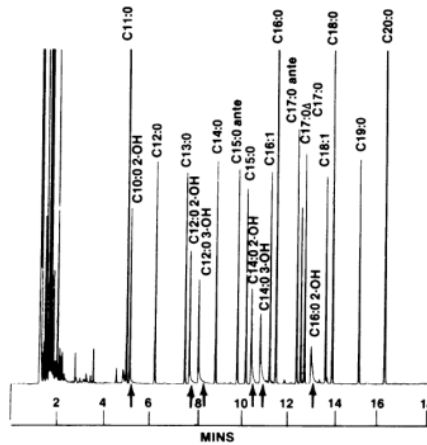
Gambar 5.10. Alur analisis Asam Diaminopimelat (DAP)

3.2. Analisis Asam Lemak (FAME) Sel Total

Ditemukan beragam jenis lemak pada sel bakteri yaitu dalam bentuk lemak polar sebagai penyusun utama lapisan bilayer membran bakteri.

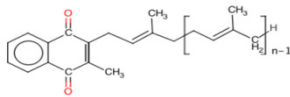
Keragaman jenis lemak ini menjadi bahan yang sering digunakan untuk tujuan klasifikasi dan identifikasi (Gambar 5.11). Lebih dari 300 jenis asam lemak telah ditentukan struktur kimiawinya. Keragaman

panjang rantai, posisi ikatan ganda dan gugus substitusi menjadi kajian untuk tujuan karakterisasi taksa bakteri.

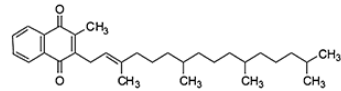


Gambar 5.11. Analisis FAME menggunakan kromatografi gas (di adaptasi dari Miller, 1985)

Isoprenoid quinone. Keragaman dan kekhasan senyawa yang menyusun tubuh mikroba dapat digunakan sebagai penciri antara mikroba satu dengan mikroba lainnya. Salah satu senyawa yang telah digunakan sebagai pembeda yaitu *isoprenoid quinone*. Isoprenoid quinone (2-methyl-1,3-butadiene) dengan rumus $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}_2$ terdapat di dalam membran sitoplasma sebagian besar prokariotik dan memegang peranan dalam transpor elektron, posporilasi oksidatif, dan transpor aktif. Saat ini senyawa tersebut telah digunakan sebagai karakter dalam identifikasi mikroba. Ada dua kelompok utama Isoprenoid quinones tersebut yaitu **naptoquinon** dan **benzoquinon**. Naptoquinon terdapat dua tipe utama yaitu *phylloquinone* dan *menaquinon* (Gambar 5.12).



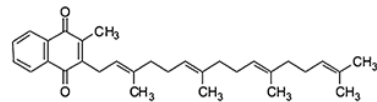
Vitamin K1 (Phylloquinone)



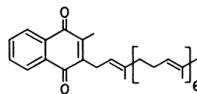
Vitamin K2 (Menaquinone K2)



Vitamin K3 (Menadion)



Vitamin K4 (Menaquinone K4)



Vitamin K7 (Menaquinone K7)

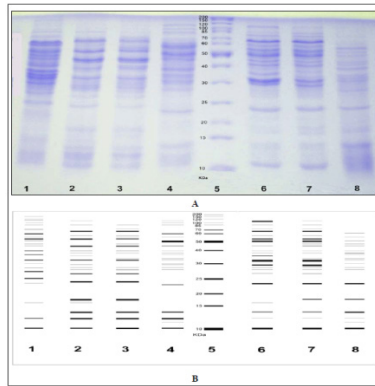
Gambar 5.12. Struktur Isoprenoid quinones

Homolog vitamin K2 disebut menaquinon yang dicirikan oleh jumlah residu isoprenoid pada rantai sampingnya. Menaquinon disingkat dengan MK-n, dimana M singkatan dari menaquinon, K singkatan dari vitamin K, dan n menunjukkan jumlah residu rantai samping isoprenoid. Menaquinon-4 (disingkat MK-4) memiliki empat residu isoprenoid pada rantai sampingnya sehingga disebut juga *Menatetrenone*.

3.3. Analisis Protein Sel Total (*Whole-cell protein*)

Perbandingan pola protein sel total yang diperoleh dengan menggunakan analisis *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) menunjukkan keterandalan untuk membedakan kedekatan strain mikroba. Profil protein selular dengan metode SDS-PAGE merupakan salah satu karakter kimiawi yang banyak digunakan untuk memperkuat hasil identifikasi berdasarkan

karakter fenotipik pada beberapa genera bakteri (Gambar 5.13). Metode SDS-PAGE dapat menghasilkan pola pita-pita protein yang kompleks, spesifik, stabil dan *reproducible* sehingga dapat digunakan untuk menginterpretasikan dan membandingkan dengan strain acuan.



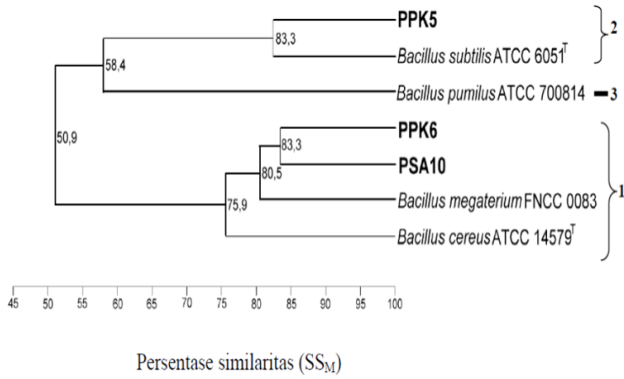
Gambar 5.13. Profil protein terlarut isolat bakteri amilolitik penghasil PHB terpilih dan strain acuan (Dikutip dari Yanti, 2011)

Keterangan: (A) dan diagram representatif profil protein (B) hasil elektroforesis *SDS-PAGE*. Lajur 1 (*B. pumilus* ATCC 700814), Lajur 2 (*B. megaterium* FNCC 0083), Lajur 3 (*B. cereus* ATCC 14579T), Lajur 4 (*B. subtilis* ATCC 6051T), Lajur 5 (Marker berat molekul protein), Lajur 6 (isolat PSA10), Lajur 7 (isolat PPK6), dan Lajur 8 (isolat PPK5)

Sejumlah penelitian menunjukkan adanya korelasi kuat antara kemiripan tinggi kandungan protein sel dengan hibridisasi DNA-DNA. Teknik ini secara umum ditujukan untuk identifikasi pada aras spesies. Pita-pita protein antara strain yang dibandingkan memiliki profil yang berbeda. Prinsipnya pembentukan pita (protein) yang dimiliki oleh strain tapi tidak dimiliki oleh strain lain menunjukkan perbedaan secara kimiawi strain tersebut

Profil pita antara satu dengan yang lainnya sulit diinterpretasi jika hanya didasarkan atas pengamatan secara langsung. Oleh karena

itu perlu dilakukan analisis dengan menggunakan program (*software*) sehingga dapat dibuat dendrogram seperti pada Gambar 5.14.



Gambar 5.14. Dendrogram yang menunjukkan hubungan kemiripan antara strain bakteri amilolitik penghasil PHB dan 4 strain acuan anggota genus *Bacillus* didasarkan atas analisis SS_M dan algoritma *UPGMA* terhadap profil protein selular.



BAB 6

KARAKTERISASI ACTINOBACTERIA SECARA MOLEKULAR

A. KARAKTERISASI TEKNIK MOLEKULAR

Pada awalnya, taksonomi mengandalkan karakteristik berdasarkan sifat fenotipik suatu organisme. Untuk organisme tingkat tinggi, karakter morfologi cukup berarti. Akan tetapi untuk mikroba karakteristik biokimiawi digunakan bersama-sama dengan karakter morfologi. Upaya untuk mengidentifikasi mikroba terutama pada tingkat/aras spesies sangatlah sulit dilakukan dengan metode konvensional seperti karakterisasi morfologi dan fisiologi.

Saat ini perkembangan pemahaman taksonomi mulai berubah sejak ditemukannya perkembangan spektakular dalam bidang sekuensing rRNA dan gen-gen yang menyandi rRNA (rDNA). Gen ini memiliki kontribusi pada teknik sidik jari molekular pada filogeni bakteri. Melalui analisis gen tersebut tampak pengelompokan organisme menjadi 3 (tiga) domain, suatu strata yang lebih tinggi dari Kingdom yaitu Bacteria, Archaea dan Eucarya.

Secara biologis, spesies didefinisikan sebagai “sekelompok organisme yang dapat melakukan proses perkawinan silang dengan yang lainnya dan melahirkan keturunan yang fertil “. Namun, bagi

banyak mikroba terutama kelompok bakteri dan khamir, tidak ada tahap seksual bisa ditemukan dalam siklus hidupnya, sehingga definisi biologi spesies tidak bisa digunakan. Ketersediaan metode untuk mengurut/sekuen protein dan gen menyebabkan perkembangan yang sangat cepat terhadap filogenetik berbasis molekuler dan penggunaan urutan pembandingan untuk mendefinisikan maupun mengidentifikasi spesies. Parameter morfologi jarang digunakan untuk mengkarakterisasi prokaryota, karena kesederhanaan struktur selnya. Selain itu karakter fenotipik bersifat tidak stabil dan dapat berubah dengan berubahnya lingkungan.

Karakterisasi molekuler merupakan karakterisasi yang menggunakan karakter molekuler seperti sidik jari DNA, hibridisasi DNA dan *sequence* asam nukleat. Salah satu karakter molekuler yang dapat digunakan untuk identifikasi adalah *sequence* asam nukleat (DNA dan RNA). Teknik *Sequencing* asam nukleat telah berkembang secara pesat sehingga perbandingan *sequence* gen homolog merupakan prosedur standar dalam sistematik mikroba modern.

Sebelum membahas metode skrining genotipik untuk karakterisasi Actinobacteria, maka perlu dipahami metode isolasi DNA dan teknik amplifikasi menggunakan PCR serta sekuensing DNA. Meskipun banyak cara dan teknik mengisolasi DNA, namun secara umum metode isolasi DNA Actinobacteria dapat dilakukan sbb:

1. Isolasi DNA

Isolasi DNA merupakan salah satu tahap yang sangat penting untuk pengerjaan molekuler. Tahap ini akan mempengaruhi kualitas DNA yang diperoleh sehingga berdampak pada keberhasilan melakukan amplifikasi. Beberapa hal yang mempengaruhi kualitas DNA antara lain adanya kontaminan oleh polisakarida, asam humat atau senyawa-senyawa golongan polifenol yang menyebabkan kualitas DNA hasil isolasi rendah sehingga menyebabkan gangguan dalam proses PCR.

Oleh karena itu berbagai protokol isolasi DNA dapat digunakan atau melakukan modifikasi sesuai kebutuhan. Berdasarkan pengalaman penulis, berikut yang dapat digunakan sebagai protokol isolasi DNA adalah sebagai berikut:

Isolat Actinobacteria ditumbuhkan selama 5 hari pada suhu 30°C dalam 100 mL media ISP2 pada labu erlenmeyer 500 mL dan diberi agitasi (100 rpm). Cairan media dimasukkan ke dalam tabung mikro, lalu biomassa diunduh dengan menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 20 menit. Pellet yang diperoleh dicuci dua kali dengan aquabides, lalu disimpan pada suhu -20°C selama semalam. Selanjutnya pellet tersebut digunakan untuk ekstraksi DNA dengan mengikuti langkah sebagai berikut: sampel dicampur dalam 800 µL larutan lisis cair (100 mmol/L Tris-HCl, pH7; 20 mmol/L EDTA; 250 mmol/L NaCl; 2% m/v SDS; 1 mg/mL Lisozim), 5 µL larutan 50 mg/mL RNase ditambahkan, selanjutnya suspensi diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit.

Setelah itu ditambahkan 10 µL larutan proteinase K (50 mg/mL) dan larutan lisis, lalu diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit. Lisat diekstraksi dengan fenol dengan volume yang sama dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Lapisan cairan (supernatan) diekstraksi kembali dengan fenol (50%-50%v/v), kemudian dengan kloroform (50%-50%v/v). DNA diperoleh dari fase cair melalui penambahan NaCl (150 mmol/L konsentrasi akhir) dan 2 kali volume etanol 95% v/v dingin sebelum disentrifugasi. Presipitat DNA dibersihkan dengan 50 µL etanol 70% v/v, lalu disentrifugasi (13.000 rpm 10 menit), diresuspensi dengan 50 µL buffer TE (10 mmol/L Tris-HCl pH 7,4; 1 mmol/L EDTA, pH 8) dan disimpan pada suhu -20°C. Kemurnian larutan DNA dicek dengan menggunakan spektrofotometer pada λ_{260} dan λ_{280} nm.

2. Amplifikasi gen target dengan PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode untuk menggandakan (replikasi) sekuen DNA target yang spesifik. Metode ini sering dinyatakan sebagai cara untuk menggandakan gen secara enzimatik tanpa menggunakan sel atau organisme tetapi diluar organisme, sehingga disebut penggandaan fragmen DNA atau gen secara *in vitro*. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Karry Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam.

Bahan yang dibutuhkan untuk PCR antara lain: DNA cetakan (template), dua oligo/primer, DNA Taq polymerase, dNTP Deoxynucleotides-triphosphate, Buffer, 50% DMSO (Dimethylsulphoxide)/glycerol, dH₂O, es, PCR tubes, thermal cycler.

Pada siklus awal proses amplifikasi, maka DNA untai ganda (dsDNA) sebagai cetakan akan di denaturasi menjadi DNA untai tunggal (ssDNA). Pada tahap selanjutnya terjadi penempelan primer (oligonukleotida) yang dirancang khusus untuk menempel pada untai target (ssDNA).

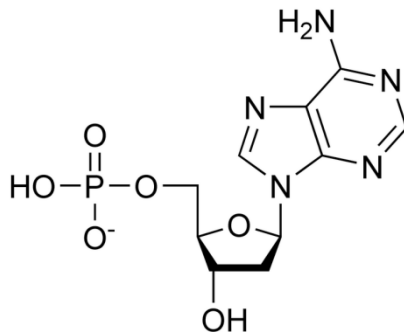
3. Primer

Beberapa primer yang biasa dilakukan untuk mengamplifikasi gen penyandi RNA ribosomal (16S rRNA) antara lain: Primer F1 (5'-AGAGTTT^IGATCITGGCTCAG-3; I=inosine) dan primer R5 (5'-ACGGTACCT^ITGTTACGACTT-3') (Cook & Meyers, 2003). Selain itu dapat juga digunakan: 27F (5'-AGAGTTT^IGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GGTACCT^ITGTTACGACTT-3').

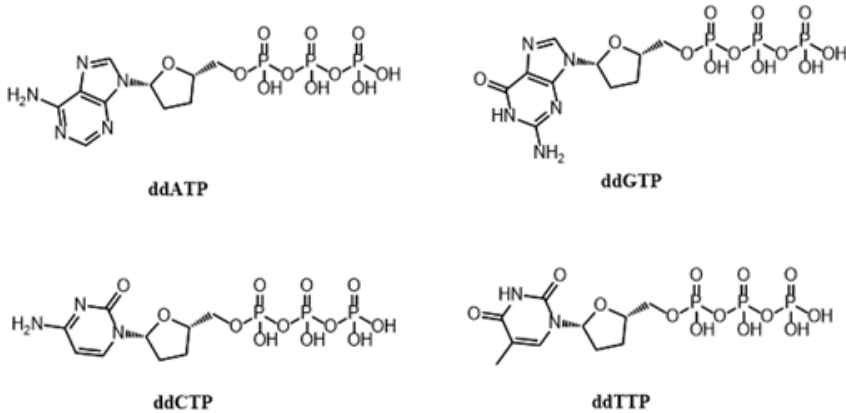
Dengan bantuan DNA polimerase, maka primer akan mensintesis untai ssDNA pada arah 5' → 3' untuk membentuk suatu untai ganda yang komplementer. DNA polimerase menggunakan Deoxynucleotide-triphosphates (dNTP) suatu campuran dari dATP, dCTP, dGTP & dTTP untuk mensintesis untai komplementernya.

PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (unamplified DNA) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (anneal primers) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (extend primers) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20 – 40 siklus. Target DNA yang diinginkan (short "target" product) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (long product) akan meningkat secara linier seperti tampak pada bagan di atas (Newton and Graham, 1994).

dNTPs merupakan suatu campuran yang terdiri atas dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat) dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). Dalam proses PCR dNTPs bertindak sebagai building block DNA yang diperlukan dalam proses ekstensi DNA. dNTP akan menempel pada gugus –OH pada ujung 3' dari primer membentuk untai baru yang komplementer dengan untai DNA templat. Konsentrasi optimal dNTPs untuk proses PCR harus ditentukan.



Gambar 6.1. Struktur basa nukleotida



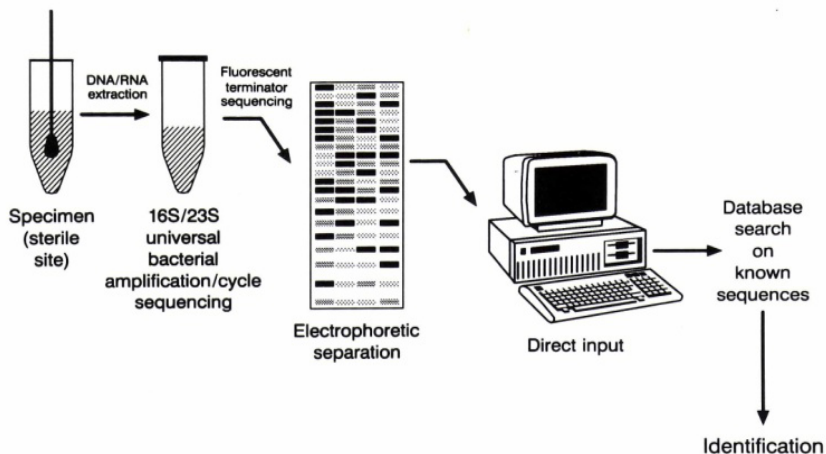
Gambar 6.2. Struktur molekul dNTP

Umumnya jumlah siklus yang digunakan pada proses PCR adalah 30 siklus. Penggunaan jumlah siklus lebih dari 30 siklus tidak akan meningkatkan jumlah amplicon secara bermakna dan memungkinkan peningkatan jumlah produk yang non-target. Siklus tersebut diulang-ulang sehingga akhirnya akan terbentuk dsDNA sintetik. Mesin PCR di program melalui suhu tertentu untuk menghasilkan amplifikasi yang diinginkan. Tahapan amplifikasi dapat dilihat contoh berikut:

Bahan	Kons Stok	Volume	Kons Akhir
Buffer	5x	10 μ L	1x
dNTPs	-	1.25mM	10 μ L
0.25mM			
MgCl ₂	25mM	5 μ L	2.5mM
DMSO	50%	5 μ L	5%
Upstream Primer	50pmol	1 μ L	1pmol
Downstream Primer	50pmol	1 μ L	1pmol
DNA Template	-	1 μ L	~0.5 μ g
H ₂ O	N/A	16.75 μ L	N/A
DNA Polymerase	5U/ μ L	0.25 μ L	1.25U

Contoh program amplifikasi pada mesin PCR:

- 96°C – 5 menit : Denaturasi semua DNA untai ganda
- 96°C – 1 menit : Suhu awal siklus – denaturasi
- 55°C – 30 detik >25 siklus : Suhu kedua siklus - annealing
- 72°C – 1 menit/ : Suhu ketiga siklus - extending
- 72°C – 5 minutes : Final extension untuk untai yang belum sempurna
- 4°C – hold : Selesai. Suhu rendah sampel dipertahankan



Gambar 6.3. Tahapan analisis gen penyandi RNA ribosom untuk identifikasi fenotipik

B. METODE SKRINING GENOTIFIK

Berbagai metode yang saat ini telah digunakan untuk tujuan sistematika mikroba, memiliki kemampuan untuk menentukan hubungan antar genus maupun spesies. Beberapa metode tersebut

memiliki kehandalan digunakan untuk mengkonstruksi filogenetik dapat diringkas pada Tabel 6.1.

Tabel 6.1.

Metode yang digunakan untuk mengkonstruksi filogenetik bakteri

Makromolekul	Metode	Cakupan
DNA	Pasangan DNA-DNA	Antar spesies
RNA	Pasangan DNA 16S/23S rRNA	Spesies → Familia
	Sekuen oligonukleotida 16S rRNA	Spesies → Kingdom
Protein	Protein spesifik (sekuen asam amino), (analisis imunologik)	Spesies → Ordo Spesies → Familia
	Kelompok protein (profil elektroforesis), (profil enzim dan aktivitasnya)	Antar spesies Spesies → Genus

1. Gen penyandi RNA Ribosomal sebagai target

Gen yang bersifat *conserved* (dilestarikan) telah digunakan secara luas untuk menganalisis hubungan antar mikroba (filogeni) dan juga dapat digunakan sebagai penanda molekular untuk mengidentifikasi mikroba pada tataran genus atau spesies. Salah satu gen yang paling banyak digunakan adalah gen penyandi RNA ribosomal.

Menurut Cooper (1997), sel prokariot mempunyai ribosom 70S yang terdiri atas sub unit ribosomal kecil 30S dan sub unit ribosomal besar 50S. Sub unit ribosomal kecil 30S mengandung 21 protein dan satu molekul 16S rRNA yang panjangnya 1541 basa (BM 500.000). Pada sub unit ribosomal besar 50S mengandung 31 protein, satu molekul 23S rRNA yang panjangnya 2904 basa (BM $1,05 \times 10^6$) dan satu molekul 5S rRNA yang panjangnya 120 basa (BM 36.000). Di antara ketiganya, 16S rRNA yang paling sering digunakan. Molekul 5S rRNA memiliki urutan basa terlalu pendek, sehingga tidak ideal dari

segi analisis statistika, sementara molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang sehingga menyulitkan analisis.

Menurut Atlas & Bartha (1997), *sequence* gen 16S rRNA digunakan untuk identifikasi karena gen 16S rRNA ditemukan pada semua mikroba prokariotik (bakteri dan Archaea). Sekuens ini memiliki jumlah nukleotida yang cukup untuk menggambarkan tingkat evolusi yang terjadi serta tidak mengalami perubahan *sequence* yang cepat, sehingga dapat digunakan sebagai kronometer evolusi yang baik. *Sequence* gen 16S rRNA memiliki bagian yang lestari dan variabel (lihat BAB II). Bagian yang lestari dapat menggambarkan tingkat hubungan filogenetik sedangkan bagian yang bervariasi (*hyper variable*) digunakan untuk menunjukkan tingkat kedekatan antar bakteri.

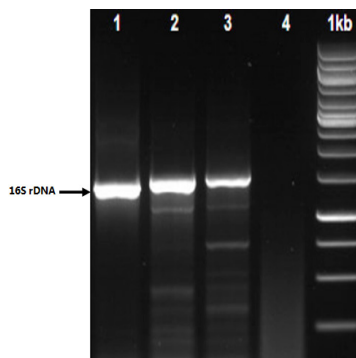
Perbandingan urutan basa yang konservatif berguna untuk mengkonstruksi pohon filogenetik universal karena mengalami perubahan relatif lambat dan mencerminkan kronologi evolusi bumi. Sebaliknya, urutan basa yang bersifat variatif dapat digunakan untuk melacak keragaman dan menempatkan galur-galur dalam satu spesies. Jika urutan basa 16S rRNA menunjukkan derajat kesamaan yang rendah antara dua taksa, deskripsi suatu takson baru dapat dilakukan tanpa hibridisasi DNA-DNA (Stackebrandt dan Goebel, 1994). Biasanya jika derajat kesamaan urutan basa gen penyandi 16S rRNA kurang dari 97% dapat dianggap sebagai spesies baru. Penentuan spesies baru pun dapat dilakukan tanpa mengisolasi mikroba yang bersangkutan. Taksa baru yang ditetapkan hanya berdasarkan data molekular oleh *The International Committee on Systematic Bacteriology* diberi status provisional candidatus (Murray dan Stackebrandt, 1995).

Data urutan basa gen penyandi 16S rRNA memungkinkan digunakan untuk mengkonstruksi pohon filogenetik yang dapat menunjukkan nenek moyang dan hubungan kekerabatan organisme, tetapi organisme yang sekerabat atau identik berdasarkan parameter ini belum tentu memiliki kesamaan secara fisiologi (Ward, 2002). Hal ini

disebabkan gen penyandi 16S rRNA bukan merupakan suatu gen yang fungsional untuk kelangsungan hidup dan adaptasi prokariota pada lingkungan tertentu. Selain gen-gen tersebut diatas yang sudah banyak di sekuensing, telah dilaporkan pula bahwa beberapa Actinobacteria berhasil dilakukan sekuen total genomnya misalnya *Streptomyces coelicolor*, *S. avermitilis*, *Mycobacterium tuberculosis* dan *M. leprae*.

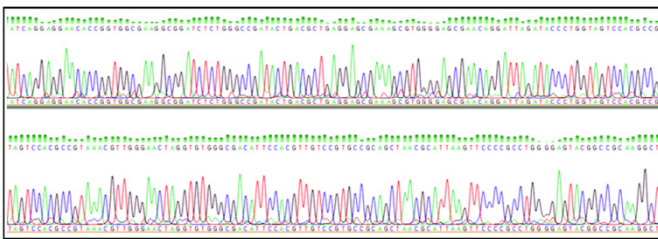
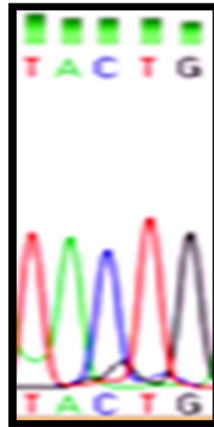
Karakterisasi menggunakan pendekatan molekular dalam sistematika mikroba telah menyebabkan perubahan dalam hal klasifikasi sehingga banyak kelompok mikroba yang mengalami klasifikasi kembali, seperti *Streptomyces* dan kelompok famili *Pseudomonadaceae*. Dengan demikian, identifikasi dengan pendekatan sistematik polifasik yang mencakup sistematik numerik-fenetik, sistematik kimiawi dan sistematik molekular dapat diandalkan untuk menghasilkan suatu klasifikasi mikroba yang bermakna sehingga dapat dijadikan sebagai dasar identifikasi yang bermanfaat dalam praktek studi keanekaragaman mikroba.

Tampak pada Gambar 6.4 diperoleh pita-pita hasil amplifikasi gen penyandi RNA ribosom yaitu 16S rRNA. Gen ini selanjutnya dipurifikasi untuk dilakukan sekuensing (pengurutan) basa-basa nitrogen yang menyusun gen tersebut.



Gambar 6.4. Hasil amplifikasi gen penyandi RNA ribosomal

Hasil sekuensing akan diperoleh data seperti pada Gambar 6.5 dan Gambar 6.6. Tampak urutan basa-basa nitrogen yang menyusun gen yang diamplifikasi tersebut. Pada prakteknya, susunan gen yang diperoleh kadang menunjukkan puncak (*peak*) yang saling bertautan sehingga perlu dilakukan editing untuk menentukan basa nitrogen dari puncak yang dimaksud. Selanjutnya urutan yang telah diedit disambung sehingga terbentuk untaian yang mengkode gen target. Urutan gen dikonfirmasi ke data base (Genebank) untuk kemudian dilakukan analisis dengan menggunakan software, sehingga dapat dikonstruksi pohon filogenetik seperti pada Gambar 6.7.



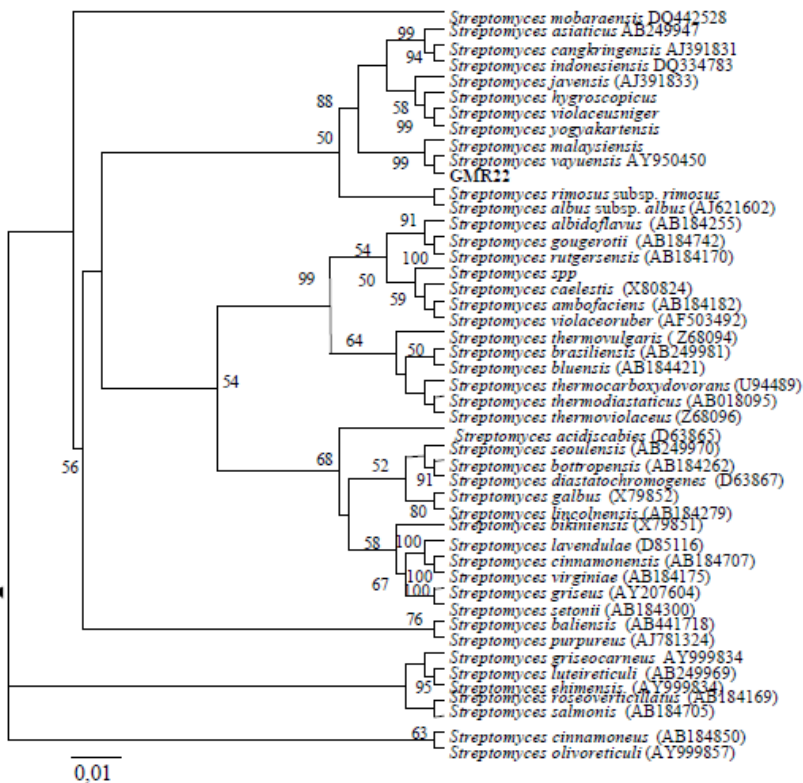
Gambar 6.5. Contoh kromatogram hasil sekuensing gen RNA ribosomal

```

27F
GGGCRAAGGG GGGGGTACTA CATGCACTGC ACGATGAAAC GGTTCGGGCC 1492R
GGGGATTAGT GCGCRAACGGG TGAGTACAC GTGGGCATTC TGCCCTGCAC
TCGTGGACAA GCCTGTGGAA CCGGGTCTAA TACCGGATAC GACTGCGGAC
CGCATGCTCT GGTGTGGAAA AGCTCCGGGC GTGCAGGATG AGCCCGGGCC
CTATCAGCTT GTTGTGGGGG TGATGGCCTA CCAAGGGGAC ACGGGGTAGC
CGCGCTGAGA GGGCGACCGG CCACACTTGG ACTGAGACAC GGCCCAAACT
CCTACGGGAG CGACGATTGG GGAATATTCC ACTAATGGGG CAAGCCTGAT
GGAGGACGCG CGCGTGGGG ATGACGGGGG TCGGGTTGTA AACCTCTTTC
ATCAGGGAAA AAGCGTGGGT GACGGTACCT CGCATATAG CGCCTGCTAA
CTAGTCCCA CTAGCCTGGG TATACACTAG GCGCAGAGG TTGTCCGGAA
TTATTGGGGG TAAAGACTCT GTAGCGGCTC TGTCCCGTGC GATGTGAAA
CCCGGGGCTT AACTCCGGGT CTGCATTCTA TAGCGGACG CTAGAGTTGC AACTGAACAA
GTAGGGGAGA TCGGAATCC TGSTGTAGCG GTGAAATGCG CAGATATCAG ATTTTCCGAA
GAGGRACACC GGTGGCGAAG CGGATCTCT GGCCCGATAC TGACGCTGAG
GAGCGARAAG GTGGGGAGCG AACAGGATTA GATACCTGGG TAGTCCACGC
CGTARACGTT GGAAGACTAGG TGTGGCGCAC ATTCACGTT GTCCGTGCCG
CACGTRACCG ATTAGTGTCT CCGCTGGGG AGTAGCGCG CRAAGTAAA
ACTCAAAGGA ATTAGCGGGG GCGCCACAAA GCGGCGGACG ATGTGGCTTA
AATCGAOCGA ACGCGTAAAA ACCTTACCAA AGGTTTGACA TACACCCGGA
CGCTCCAGA AGATGGGTTG CCGCCTGTG GTCGGTTGTA CAGTGTGGTG
CAATGGGCTG TCCTCCACTC CCGTGTCTG GARATGTTG GGTTTAAGTC
CCCGCAACCG AAGCGAAAC CCGTGGTCTC TGTGTTCCG AGCATAGCT
TTTGGGGTGT GATGGGGGAC TCACACGGAA AACTTCCCGG GGGTCAACT
CGAGAAAAA GGGG

```

Gambar 6.6. Hasil *sequencing* gen penyandi RNA Ribosomal dengan primer 27F/1492R



Gambar 6.7. Pohon filogeni yang dikonstruksi berdasarkan algoritma *Neighbour-joining* gen *16S rRNA* isolat GMR22 (Saitou & Nei, 1987)

Keterangan: Hubungan kekerabatan strain *Actinobacteria* terpilih dengan strain acuan anggota genus *Streptomyces* atas dasar *sequence* gen 16S rRNA. Angka pada percabangan mengindikasikan nilai *bootstrap* (%) berdasarkan analisis *Neighbour-joining* dengan 1000 kali replikasi. Tanda panah mengindikasikan perkiraan posisi akar pohon filogeni. Jarak skala mengindikasikan jumlah perubahan yang diharapkan 1 per 100 nukleotida per posisi *sequence* gen 16S rRNA (Hahn *et al.*, 1999).

2. Penentuan rasio basa DNA (persen mol G+C)

Penentuan persen mol guanosin + sitosin merupakan salah satu metode skrining genotifik klasik dan telah digunakan sebagai bagian dari deskripsi standar untuk penentuan taksa bakteri. Umumnya kisaran yang digunakan antara 30% untuk kategori spesies dan lebih dari 10% untuk kategori genus. Kandungan G+C pada dunia bakteri berkisar antara 24 sampai 76%. *Actinobacteria* merupakan bakteri yang memiliki kandungan G+C >70% dibandingkan dengan kelompok bakteri lainnya.

3. Hibridisasi DNA-DNA

Hibridisasi DNA-DNA merupakan metode skrining genotifik pertama yang digunakan untuk mengukur aras kedekatan genom dan menjadi metode yang paling banyak diterima sebagai metode pengembangan klasifikasi bakteri. Bahkan metode ini dinyatakan sebagai “gold standard” untuk mengetahui kekerabatan spesies.

Metode hibridisasi DNA-DNA menggunakan DNA untai tunggal yang di denaturasi (berasal dari DNA sel untai ganda) dari dua strain bakteri yang dibandingkan kemampuannya untuk melakukan penempelan kembali dengan lainnya untuk membentuk DNA untai ganda pada kondisi suhu dan konsentrasi ion yang berbeda. Suhu optimal untuk hibridisasi dihitung dengan menggunakan rumus $TOR = 0.51 \times (G+C) + 47^{\circ}C$. Aras kedekatan antara dua strain dinyatakan sebagai % homologi. Dua strain memiliki nilai homologi >70% (dan berbeda $\Delta Tm1 < 5^{\circ}C$) diantara spesies yang sama. Nilai homologi

antara 30% dan 70% menunjukkan kekerabatan yang sangat tinggi dan memiliki kemiripan dari kluster gen yang menyandi jalur metabolit yang sama. Sebaliknya homologi <30% menunjukkan bahwa kedua strain tersebut tidak memiliki kedekatan.

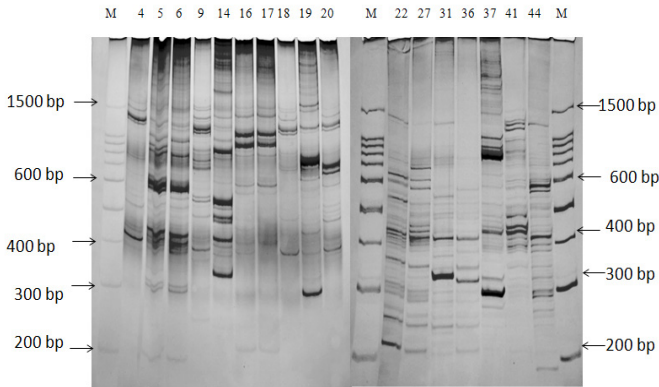
4. Rep-PCR (Elemen berulang, *rep-PCR*)

Analisis karakter isolat *Actinobacteria* berdasarkan koloni tidak dapat dilakukan untuk menunjukkan perbedaan antar isolat secara signifikan. Keragaman isolat *Actinobacteria* dipertegas dengan analisis berdasarkan variasi elemen BOX melalui metode *rep-PCR* dengan menggunakan primer BOXA1R. *Rep-PCR* merupakan salah satu metode PCR berdasarkan analisis genom. Prinsip ini melacak keberadaan sekuen DNA yang repetitif yang tersebar hampir diseluruh genom bakteri dan dapat menjadi petunjuk untuk melihat perbedaan atau keragaman bakteri.

Dengan *rep-PCR*, dimungkinkan untuk sidik jari genom bakteri dengan memeriksa strain atau pola sub tipe spesifik yang diperoleh dari PCR amplifikasi unsur DNA berulang hadir dalam genom bakteri. Ada tiga set utama DNA berulang-ulang pada *extragenic palindromic* (REP) sebagai unsur dari unit palindromik, yang berisi variabel loop dalam struktur *stem-loop* yang diusulkan (Stern *et al.*, 1984.).

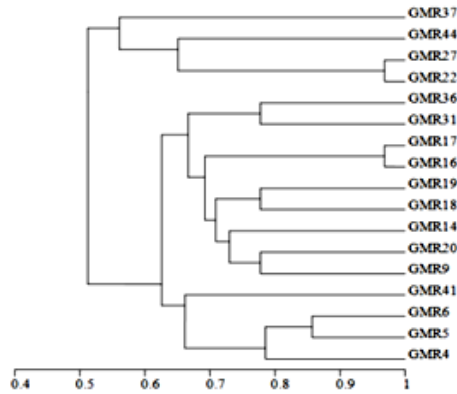
Sekuen REP-dan ERIC awalnya diidentifikasi pada bakteri Gram-negatif dan kemudian ditemukan dilestarikan di semua bakteri Gram-negatif enterik (Versalovic *et al.*, 1994). Urutan ERIC dicirikan oleh pusat yang dilestarikan oleh palindromik struktur (Hulton *et al.*, 1991). Amplifikasi elemen BOX dengan menggunakan metode *rep-PCR* dapat dilakukan untuk menentukan kedekatatan antara spesies *Actinobacteria*. Elemen BOX terdiri dari sub-unit diferensial kekal, yaitu boxA, boxB, dan boxC. Hanya subunit urutan BOXA seperti muncul sangat beragam kekal antara bakteri (Versalovic *et al.*, 1994). BOX elemen adalah sekuens berulang pertama diidentifikasi dalam organisme Gram-positif (*Streptococcus pneumoniae*) (Martin *et al.*, 1992).

Sadowsky *et al* (1996) melaporkan bahwa penggunaan primer BOXA1R dalam *rep*-PCR mampu membedakan *Streptomyces* sampai level galur, dan primer BOXA1R menunjukkan resolusi *rep*-PCR yang lebih baik dibandingkan primer REP dan ERIC.



Gambar 6.8. Karakter genetik isolat *Actinobacteria* pada tegakan hutan kayu putih yang dianalisis melalui amplifikasi elemen BOX menggunakan metode *rep*-PCR dengan primer BOXA1R (Ali *et al*, 2009)

Hasil amplifikasi dari *rep*-PCR kemudian diubah dalam bentuk gel matriks yang menghasilkan pola yang kompleks dan spesifik (Rademaker *et al.*, 2005) seperti pada Gambar 6.9. Genersch dan Otten 2003 menunjukkan bahwa pola pita DNA (genom) hasil *rep*-PCR tersebut bermanfaat dalam klasifikasi dan diferensiasi subtipe atau strain bakteri.

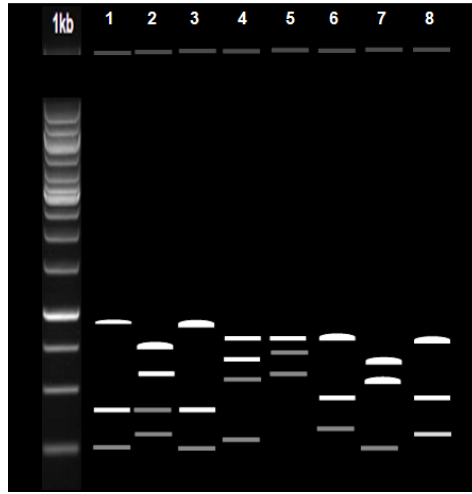


Gambar 6.9. Dendrogram hubungan kemiripan karakter genetik isolat *Actinobacteria* tegakan hutan kayu putih yang diamplifikasi dengan menggunakan metode *rep*-PCR dengan primer BOXA1R

5. ARDRA

Analisis sidik jari (*fingerprinting*) gen *16S rRNA* cukup efektif untuk mereduksi jumlah isolat yang dibutuhkan untuk mensekuen isolat yang dianggap penting untuk proses skrining dalam diversitas. Analisis ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) pada gen *16S rRNA* merupakan salah satu metode cepat dan murah yang dapat digunakan untuk kajian keberagaman komunitas mikroba. Bahkan strain *Actinobacteria* telah banyak diterapkan untuk mengidentifikasi aras genus dengan menggunakan 4 jenis enzim restriksi tanpa dilakukan sekuensing (Jiang *et al.*, 2007).

Hasil amplifikasi gen penyandi RNA ribosom dipotong dengan menggunakan enzim restriksi. Prinsipnya bahwa perbedaan urutan nukleotida pada gen tersebut akan memberikan sisi pemotongan yang berbeda oleh enzim, sehingga akan diperoleh pita-pita yang berbeda antara satu strain dengan strain lainnya. Secara skematis profil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 6.10.

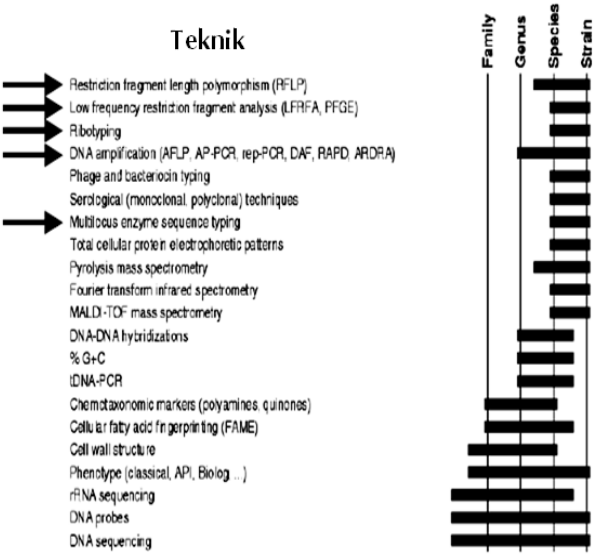


Gambar 6.10. Skematis profil pita-pita gen penyandi RNA ribosomal yang dipotong dengan enzim restriksi untuk analisis ARDRA

Beberapa metode lainnya yang dapat digunakan sebagai skrining karakter genotifik antara lain PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), DNA polimorfik teramplifikasi acak atau RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), PCR berbasis lokus spesifik RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), dan ribotyping. Metode RFLP telah digunakan secara luas untuk membedakan strain *Streptomyces* yang memiliki karakter yang sangat mirip sekali. Selain itu metode ini dapat juga digunakan untuk mengetahui keragaman strain pada kelompok isolat dalam lingkungan yang sama. Bahkan dinyatakan, metode ini memiliki sensitifitas tinggi dibandingkan dengan analisis sekuen 16S rRNA pada strain yang memiliki kemiripan tinggi atau pada subspecies atau variasi strain pada aras spesies. Maksudnya, jika ditemukan beberapa strain yang memiliki kesamaan bentuk, warna maupun karakter koloni yang sama, namun memiliki karakter lain yang berbeda (misalnya aktivitas biologis beda, metabolit berbeda atau karakter fisiologik yang dianggap beda antara yang lainnya).

Secara umum prinsip RFLP adalah memotong DNA kromosom dengan menggunakan enzim restriksi endonuklease, lalu dianalisis ukuran fragmen secara pulsed-field gel electrophoresis. Pola-pola pita fragmen DNA yang divisualisasi secara elektroforesis digunakan sebagai “sidik jari” untuk membandingkan antara satu strain dengan strain lainnya. Metode ini mirip dengan ARDRA, namun lebih umum karena bukan gen khusus yang dipotong-potong tetapi kromosom.

Pada dasarnya suatu metode dianggap bagus jika memiliki kemampuan diskriminasi yang tinggi. Berbagai metode atau teknik yang telah digunakan dan akan terus dikembangkan untuk mencari cara mendapatkan hasil terbaik untuk digunakan dalam pendekatan taksonomi. Secara umum metode skrining genotifik untuk pendekan molekular dapat dilihat pada Gambar 6.11.



Gambar 6.11. Kemampuan mendiskriminasi/pembeda secara taksonomi teknik skrining sidikjari genotifik

Tampak bahwa berbagai metode tersebut diatas memiliki keandalan masing-masing terhadap kemampuan menganalisis pada aras familia sampai spesies, bahkan strain.



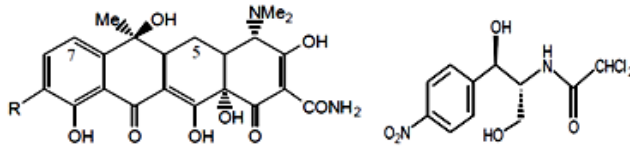
BAB 7

PERANAN DAN MANFAAT ACTINOBACTERIA

A. ACTINOBACTERIA PENGHASIL SENYAWA OBAT

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

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



Gambar 7.1. Struktur tetrasiklin dan kloramfenicol

Senyawa bioaktif yang digunakan dalam bidang kesehatan banyak yang diproduksi oleh mikroba. Pencarian mikroba terutama Actinobacteria menjadi fokus banyak periset. Beberapa genus dari Actinobacteria yang mampu menghasilkan senyawa antimikroba misalnya *Frankia* sp (Myers dan Tisa, 2004); *Actinomadura* sp (Kim *et al.*, 2000; Badji *et al.*, 2006); *Nocardia* sp (Lemriss *et al.*, 2003).

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

Urauchimycin merupakan anggota kelompok antimycin, yang diketahui bersifat antifungi (Barrow *et al.*, 1997). Senyawa ini aktif menghambat aliran elektron pada rantai respirasi mitokondria.

Antimycin diproduksi oleh *Streptomyces* yang diisolasi dari integumen semut attine (Schoenian *et al.*, 2011).

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

B. LINGKUNGAN DAN ACTINOBACTERIA

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

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

ditemukan pada habitat tanah, namun juga pada organisme lain seperti manusia dan hewan.

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

Actinobacteria ditemukan pada habitat yang cukup luas, misalnya pada tanah-tanah beku di daerah kutub, tanah kering di gurun, minyak mentah, tanah terkontaminasi logam berat, sedimen air tawar dan air laut. Umumnya Actinobacteria bersifat sebagai saprofit dan beberapa yang membentuk asosiasi parasitik maupun simbiosis dengan hewan maupun tanaman. Penyebaran Actinobacteria di lingkungan perairan laut dan ekologinya sangat memegang peranan penting namun belum banyak dikaji. Actinobacteria menghasilkan spora resisten yang tetap hidup dan mampu bertahan selama bertahun-tahun. Hal ini dapat dikatakan bahwa Actinobacteria yang ditemukan di perairan laut merupakan spora-spora yang berasal dari lingkungan darat yang telah mengalami pencucian di lautan.

C. PERTANIAN DAN ACTINOBACTERIA

1. Actinobacteria rizosfer

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

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

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

Rizosfer merupakan bagian dari tanah yang dipengaruhi oleh akar, dan sebagai titik sentral terjadinya proses-proses penting terbentuknya nutrisi tanaman. Lynch, 1990 membagi rizosfer menjadi endorizosfer, rizoplan dan ektorizosfer berdasarkan kaitan dengan bagian jaringan akar, permukaan akar dan yang berasosiasi dengan akar. Pengaruh rizosfer menggambarkan fenomena yang terjadi sebagai interaksi antara tanah, biomassa dan aktivitas mikroba yang meningkat sebagai akibat dari eksudasi senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh akar tanaman (Berg *et al.*, 2005). Interaksi yang amat kompleks tersebut terjadi di dalam rizosfer yaitu, interaksi antara patogen tanah dan antagonisnya menjadi bagian yang sangat penting untuk ketersediaan nutrisi dan kesehatan tanaman (Whipps, 2001).

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

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

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

Actinobacteria diketahui sebagai kelompok mikroba yang tersebar luas di alam dan juga dikenal sebagai saprofit di tanah. Umumnya *Actinobacteria* di dalam tanah didominasi oleh kelompok Streptomyces. *Actinobacteria* banyak ditemukan di daerah rizosfer tanaman dan banyak mendapat perhatian karena dapat dimanfaatkan untuk menghambat pertumbuhan fungi patogen tanaman (Suzuki *et al.*, 2000). Kemampuan menghambat pertumbuhan fungi patogen tersebut disebabkan oleh senyawa antifungi ataupun enzim-enzim yang dihasilkan oleh mikroba ini yang dapat merusak dinding sel fungi (Getha *et al.*, 2005).

Tumbuhan dan mikroba diketahui menunjukkan interaksi yang sangat kompleks dengan lingkungan dengan menghasilkan produk alami berupa senyawa-senyawa yang sangat bermanfaat terhadap kelangsungan hidup antar keduanya. Peranan senyawa tersebut

menunjukkan aktivitas biologik yang cukup besar, sehingga dapat digunakan untuk pengembangan atau proses lebih lanjut untuk penemuan obat-obatan (Pupo *et al.*, 2006).

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

2. Actinobacteria endofit

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

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

diketahui pula menghambat pertumbuhan jamur patogen manusia, *Cryptococcus neoformans*.

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

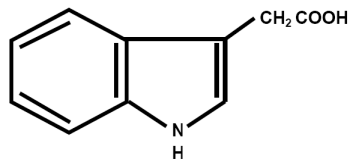


Figure 1 Chemical structure of the auxin, indole-3-acetic acid.

Gambar 7.2. Struktur kimia auksin, indole-3-acetic acid

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

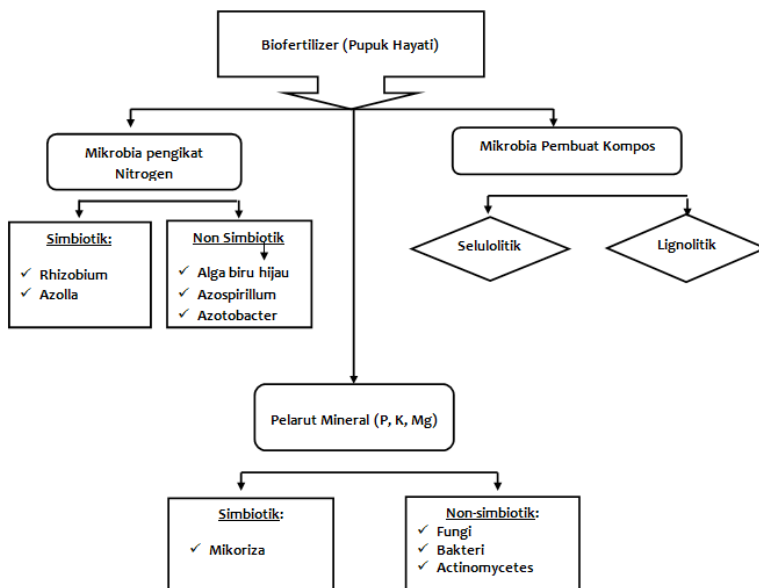
Diperkirakan sekitar 80% bakteri rizosfer mampu mensekresikan IAA. *Streptomyces* spp. yang menghuni rizosfer berbagai jenis tanaman dianggap sebagai mikroba penghasil IAA paling baik.

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

3. Actinobacteria sebagai Biofertilizer

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

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



Gambar 7.3. Aktivitas mikroba yang berkaitan dengan biofertilizer

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

Beberapa mikroba digunakan untuk pupuk hayati seperti kemampuan mengikat nitrogen, pelarut posfat dan mikoriza mampu mengikat nitrogen atmosferik atau melarutkan posfat di dalam tanah.

Ketersediaan P dalam tanah umumnya sangat rendah karena P biasanya terikat menjadi Fe-Posfat dan Al-Posfat pada tanah masam atau Ca-P [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] pada tanah basa. Posfor di dalam tanah diserap oleh tanaman dalam bentuk ion ortoposfat terlarut seperti $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$, HPO_4^{-2} dan PO_4^{-3} . Secara umum, tingkat ketersediaan ion ini untuk diserap oleh tanaman meliputi $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1} > \text{HPO}_4^{-2} > \text{PO}_4^{-3}$. Keberadaan tipe ion ortoposfat tergantung pada reaksi tanah. Pada kondisi pH rendah 4-5, maka biasanya ortoposfat berbentuk ion $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$. Meningkatnya pH maka ion $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ diubah menjadi ion PO_4^{-3} yang menyebabkan tanah menjadi basa.

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

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

Actinobacteria yang diisolasi dari endofit tumbuhan pada ekosistem karst diperoleh 11 isolat yang menunjukkan aktivitas pelarut posfat. Satu isolat yang diberi kode SBx menunjukkan aktivitas pelarut posfat tertinggi dengan nilai ratio hidrolisis sekitar 2,27 pada uji *in vitro*. Isolat dengan kode MRS1 yang diisolasi dari sampel rizosfer tanaman ubi kayu menunjukkan aktivitas pelarut posfat yang tinggi seperti tertera pada Gambar 7.4.

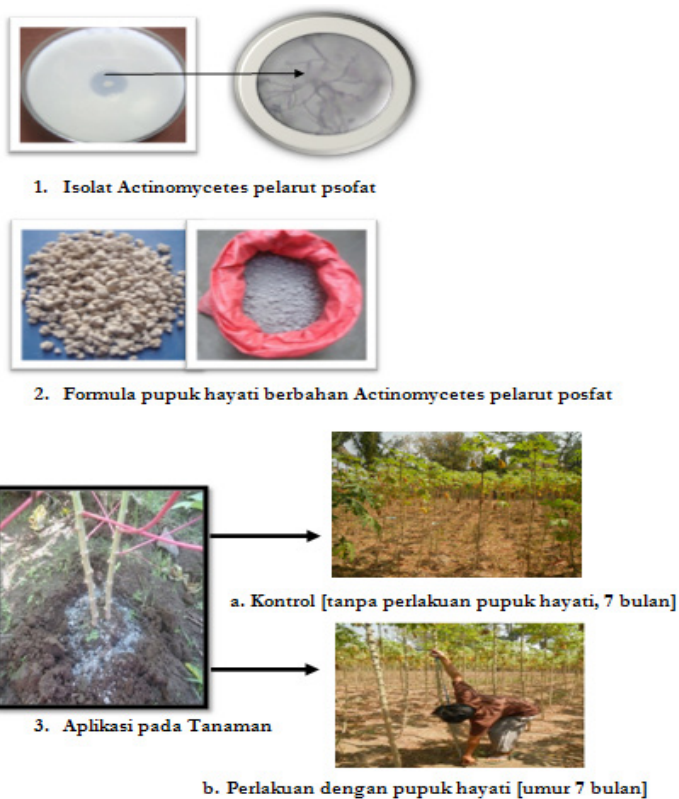


Isolat SBx

Isolat MRS1

Gambar 7.4. Isolat pelarut posfat hasil isolasi dari risofer dan endofit.

Actinobacteria yang menunjukkan kemampuan melarutkan posfat digunakan untuk meningkatkan pertumbuhan vegetatif tanaman ubi kayu. Konsorsium Actinobacteria dengan fungi yang memproduksi IAA dan sebagai pelarut posfat mampu memicu pertumbuhan tanaman ubi kayu (Gambar 7.5).



Gambar 7.5. Aplikasi Actinobacteria pelarut posfat untuk pupuk hayati

Hal yang sama ditunjukkan terhadap produktivitas tanaman ubi yang diberi perlakuan isolat Actinobacteria lebih tinggi dibandingkan yang tidak diberi perlakuan isolat (kontrol). Hal ini menunjukkan bahwa keberadaan Isolat dengan potensi yang berbeda mampu menjaga ketersediaan nutrisi lingkungan tanah.

4. Actinobacteria sebagai Biokontrol (Pengendali Hayati)

Banyak laporan peneliti membuktikan bahwa spesies Actinobacteria memiliki kemampuan secara efektif mengendalikan perkembangan fungi dan bakteri patogen pada tanaman. Dalam banyak kasus, tingkat pengendalian hayati yang ditemukan pada berbagai

Actinobacteria baik kajian di laboratorium maupun pada lingkungan terkontrol lainnya diperoleh indikasi bahwa penggunaan Actinobacteria bersifat andal dan efektif. Oleh karena itu penggunaan Actinobacteria untuk pengendalian patogen tanaman dapat dijadikan sebagai alternatif pengganti pestisida kimiawi.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5. Actinobacteria penghasil pestisida

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

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

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

molting dari serangga sehingga dimanfaatkan untuk mengendalikan fungsi patogen tanaman.

Menurut Okazaki, 2003 beberapa strain Actinobacteria menghasilkan herbisida. *Herbicidin H* merupakan suatu metabolit yang dihasilkan oleh *Streptomyces* sp. strain SANK 63997 yang diisolasi dari daun *Setaria viridis* var. *pachystachys*. *Microbispora* sp. Strain SANK 62597 yang diisolasi dari *Carex kobomugi* menghasilkan *g*-glutamylmethionine sulfoximine pada cairan kultur fermentasi.

D. PANGAN DAN ACTINOBACTERIA

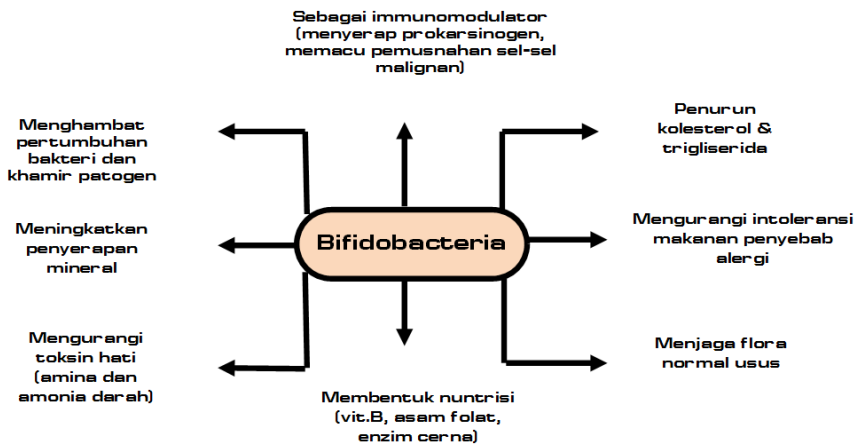
Actinobacteria merupakan bakteri yang dapat digunakan dalam industri pangan (susu probiotik atau yoghurt) seperti: Bifidobacteria. Secara alamiah *Bifidobacteria* sp merupakan mikroba yang mendominasi mikrobiota yaitu mencapai 26% lebih pada orang dewasa dan 80% pada bayi (sekitar 10^8 sampai 10^9 cfu/g). Bakteri ini memiliki karakteristik Gram positif, bersifat anaerobik, tidak bergerak (non motil), berbentuk batang tanpa spora. Bakteri ini memiliki persen G+C tinggi seperti pada anggota Actinobacteria lainnya yang mencapai 55-67%. Secara umum sel tampak berpasangan dan membentuk seperti huruf V atau Y (Gambar 7.6). Secara umum *Bifidobacteria* sp tumbuh pada kisaran suhu optimal mencapai 37 sampai 41°C dan pH 6,5-7.



Gambar 7.6. Karakteristik morfologi sel *Bifidobacteria* sp

Secara fisiologik *Bifidobacterium* bersifat sakarolitik dan mampu menghasilkan asam laktat dan asam asetat tanpa CO₂. Bakteri ini termasuk organisme fastidius (rewel), sehingga tidak dapat tumbuh di sembarang media. Salah satu media yang dapat digunakan untuk menumbuhkan *Bifidobacterium* adalah agar MRS (de Man, Rogosa and Sharpe).

Penelitian menunjukkan bahwa *Bifidobacteria* sp sebagai probiotik memiliki manfaat yang sangat vital mencegah dan memelihara gangguan saluran cerna pada manusia atau hewan (Gambar 7.7)



Gambar 7.7. Peranan *Bifidobacteria* pada manusia dan hewan

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

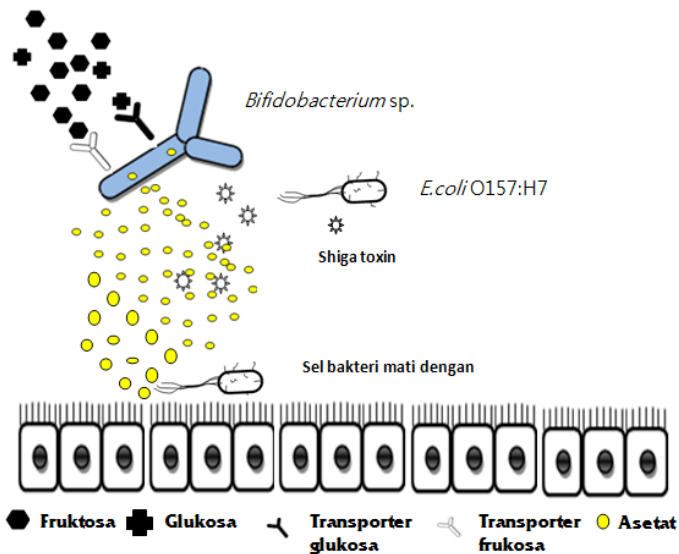
Bifidobacterium bifidum dominan pada membran mukus di sekitar usus besar dan saluran vagina. Spesies ini dimanfaatkan sebagai probiotik yang mampu meningkatkan asimilasi mineral yang penting untuk kesehatan tulang, contohnya besi, kalsium, magnesium, dan seng. Kajian menunjukkan bahwa pemberian secara oral *B. longum* berkorelasi terhadap peningkatan kekuatan tulang pada tikus model osteoporesis (Igarashi *et al.*, 1994). Peningkatan kekuatan dan kerapatan tulang tersebut diyakini akibat pengaruh peningkatan absorpsi mineral oleh pengaruh *Bifidobacterium*. Mekanisme ini berkaitan dengan peningkatan kelarutan mineral akibat asam lemak rantai pendek yang diproduksi bakteri. Selain itu terjadinya perluasan permukaan absorpsi oleh proliferasi enterosit yang dipengaruhi oleh produk fermentasi bakteri yaitu laktat dan butirir. Hal lainnya adalah peningkatan ekspresi *calcium binding protein*. Sementara itu peningkatan kerapatan tulang disebabkan oleh pembentukan vitamin seperti C, D, K dan folate yang terlibat dalam metabolisme kalsium (Scholz-Ahrens *et al.*, 2007)

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

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

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

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



Gambar 7.8. Mekanisme peran *Bifidobacteria* pada usus manusia dan hewan



Gambar 7.9. Produk komersil probiotic Bifidobacterium

Bifidobacterium spp telah dibuat produk komersil dalam bentuk sediaan cair atau padat. Produk ini biasanya menggunakan bakteri yang diisolasi dari flora mikroba manusia atau hewan (Gambar 7.9). Biakan dalam produk ini dapat berupa biakan tunggal atau campuran beberapa spesies.

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

Ditemukan pula beberapa bukti kuat bahwa bifidobacteria dapat memproteksi carcinogen pada inang dengan cara mengurangi

pembentukan carsinogen melalui mekanisme penurunan aktivitas enzim spesifik. Penelitian lain membuktikan bahwa konsumsi susu fermentasi yang mengandung bifidobacterium menurunkan aktivitas enzim β -glucuronidase dan nitroreductase yang memicu pembentukan senyawa penyebab kanker pada manusia.



BAB 8

TAKSONOMI ACTINOBACTERIA

Filum Actinobacteria merupakan salah satu filum terbesar diantara 18 garis keturunan yang diakui saat ini dalam domain Bacteria, termasuk 5 subkelas dan 14 subordo. Mikroba ini beranggotakan mikroba Gram-positif dengan kandungan GC tinggi yaitu >51mol% pada DNA genomik, misalnya: *Corynebacteria* atau >70%, misalnya: *Streptomyces* dan *Frankia*. Namun pengecualian untuk patogen obligat *Tropheryma whipplei*, kurang dari 50% GC.

Genera yang merupakan bagian yang menyusun filum ini menunjukkan keragaman besar dalam hal morfologi, fisiologi, dan kemampuan metabolisme. Karakter morfologi dari spesies Actinobacteria bervariasi mulai dari coccus (misalnya, *Micrococcus*) atau batang-coccus (misalnya, *Arthrobacter*) sampai pada bentuk hifa berfragmen (misalnya, *Nocardia*) atau miselium bercabang yang berdiferensiasi tinggi (misalnya, *Streptomyces*).

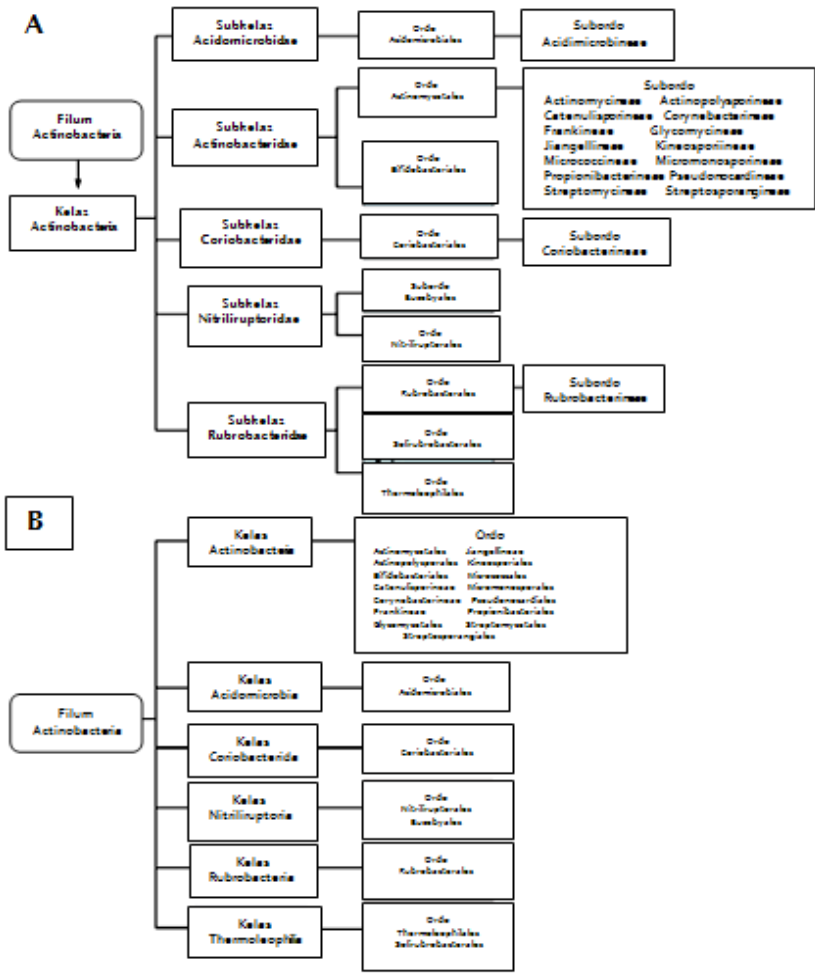
Filum Actinobacteria juga sebagai salah satu garis keturunan awal dalam prokariota. Pembentukan antibiotik oleh Actinobacteria menjadi faktor penentu utama dalam evolusi bakteri Archaea maupun Gram-negatif dari bakteri Gram-positif.

Saat ini filum Actinobacteria digambarkan dari bakteri lainnya hanya pada dasar posisi percabangannya di dalam pohon filogenetik dari gen 16S rRNA. Publikasi taksonomi terbaru dari Actinobacteria oleh Zhi *et al*, 2009, membagi filum ini pada tingkat yang paling tinggi ke dalam empat subkelas yaitu *Actinobacteridae*, *Acidimicrobidae*, *Coriobacteridae*, dan *Rubrobacteridae*, yang secara bersama-sama tercakup ke dalam 219 genera dalam 50 familia.

Dalam versi terbaru taksonomi berdasarkan *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*, maka filum Actinobacteria terbagi ke dalam lima subkelas yaitu *Actinobacteridae*, *Acidimicrobidae*, *Coriobacteridae*, *Nitriliruptoridae*, dan *Rubrobacteridae*. Subkelas ini kemudian dibagi ke dalam sejumlah ordo dan subordo yang berbeda (Gambar 8.1.A). Perlu diketahui bahwa dalam taksonomi tersebut sebanyak 47 dari 57 familia di dalam filum Actinobacteria adalah bagian dari subkelas tunggal *Actinobacteridae*, sedangkan empat subkelas lainnya hanya terdiri atas 10 familia.

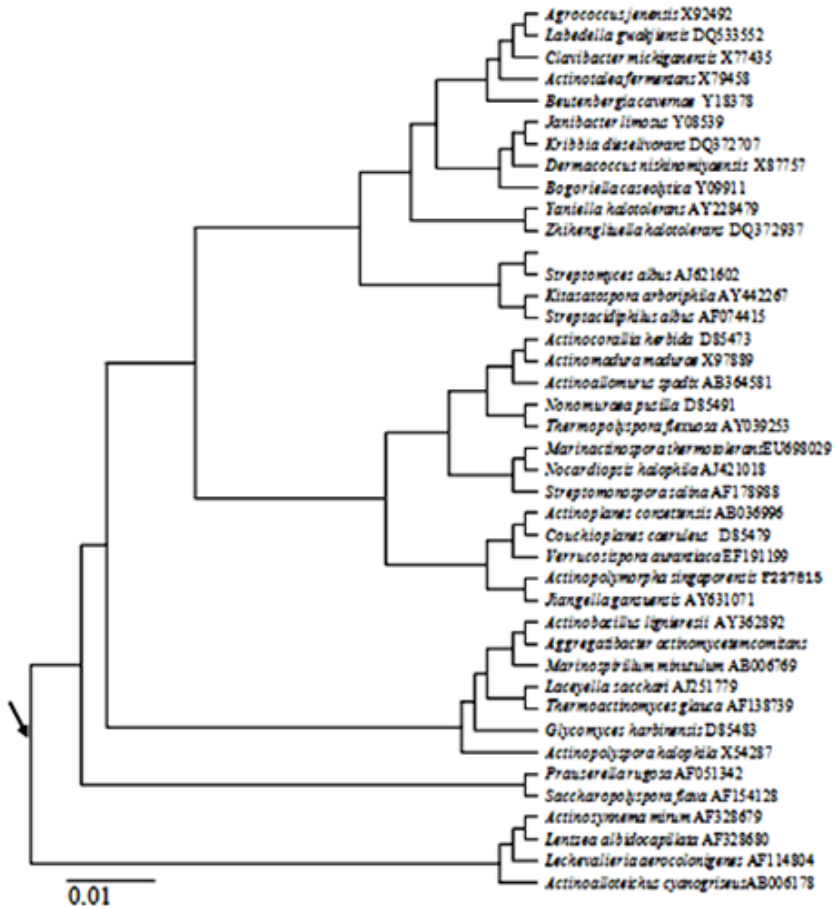
Baru-baru ini dilaporkan revisi lain taksonomi filum Actinobacteria berdasarkan pohon 16S rRNA, yang akan menjadi dasar dari pembahasan tentang Actinobacteria pada edisi berikutnya dari *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Meskipun informasi filogenetik yang diperbaharui ini tidak diposting di situs Bergey's Manual Trust, tingkatan taksonomi dari subkelas dan subordo dihilangkan, kemudian dinaikkan masing-masing menjadi kelas dan ordo (Gambar. 8.1.B).

Pada tingkat tertinggi, filum Actinobacteria dibagi menjadi enam kelas, yaitu Actinobacteria, Acidimicrobiia, Coriobacteriia, Nitriliruptoria, Rubrobacteria, dan Thermoleophilia. Kelas Actinobacteria totalnya terdiri atas 15 ordo, termasuk kedua ordo yang sebelumnya diusulkan yaitu Actinomycetales dan Bifidobacteriales. Namun, ordo Actinomycetales kini dibatasi pada anggota familia Actinomycetaceae, dan subordo lainnya yang sebelumnya menjadi bagian dari ordo ini kini dinyatakan sebagai ordo yang berbeda.



Gambar 8.1. (A) Garis taksonomi filum Actinobacteria berdasarkan *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* dan (B) Taksonomi yang diusulkan untuk Actinobacteria dalam *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* berikutnya.

Pohon filogeni yang dikonstruksi berdasarkan algoritma *Neighbour joining* gen *16S rRNA* (Saitou & Nei, 1987) menunjukkan wakil genus dari Actinobacteria (Gambar 8.2).



Gambar 8.2. Pohon filogenetik yang dikonstruksi berdasarkan gen 16S rRNA mewakili genus Actinobacteria.

Berdasarkan Gambar 8.2, terlihat bahwa Actinobacteria dapat dibedakan berdasarkan gen 16S rRNA. Akan tetapi beberapa genus yang sangat mirip sekali sangat sukar untuk membedakannya berdasarkan analisis gen tersebut. Salah satu contoh adalah *Kitasatospora* yang kini dinyatakan sebagai kelompok genus *Streptomyces*. Oleh karena itu para ahli mencoba mencari alternatif yang dapat digunakan untuk menentukan perbedaan dalam genus tersebut.

Salah satu metode baru yang dikembangkan oleh ahli adalah protein lestarti yaitu SsgA dan SsgB. Protein tersebut berperan penting pada morfogenesis dan mengatur perkembangan pembelahan sel dan proses sporulasi Actinobacteria baik pada kultur cair maupun padat. Analisis sekuen protein tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang dapat digunakan sebagai teknik diskriminasi bahkan pada genus yang sama. Gen *gyrB* yang mengkode subunit B DNA girase, telah dilaporkan pula digunakan untuk membandingkan spesies *Streptomyces* pada aras spesies.

Pada kasus *Streptomyces*, keragaman yang sangat tinggi menyebabkan kesulitan untuk mendeskripsikan perbedaan diantara genus-genusnya. Oleh karena itu evaluasi taksonominya membutuhkan pendekatan polifasik yaitu menggunakan metode pendekatan secara morfologi dan fenotipik serta teknik biologi molekular.

Sebagaimana telah dijelaskan pada Bab sebelumnya bahwa klasifikasi Actinobacteria mengacu pada pendekatan polifasik yaitu pada tiga metode: Pertama, penggunaan kemotaksonomi yang menganalisis perbedaan komposisi kimia sel seperti peptidoglikan, lipida polar, asam lemak, quinon isoprenoid, sitokrom, dan komposisi basa DNA. Kedua, reasosiasi DNA-DNA untuk mengetahui kemiripan diantara DNA untai tunggal dari strain yang memiliki kedekatan spesies. Ketiga, kemiripan sekeun gen 16S rRNA untuk menentukan variasi sekuen antar strain. Dengan demikian, upaya untuk membuat taksonomi Actinobacteria dilakukan dengan mengacu pada berbagai macam pendekatan atau sering disebut polifasik.

Berikut diuraikan tingkatan taksonomi dari filum Actinobacteria sebagai berikut:

Domain: Bacteria

Filum: Actinobacteria

Kelas: Actinobacteria

Subkelas: Acidimicrobidae

Ordo: Acidimicrobiales

Subordo: Acidimicrobineae

Familia: Acidimicrobiaceae

Acidimicrobium, Ferrimicrobium, Ferrithrix,
Ilumatobacter

Familia Iamiaceae

Iamia

Belum dikelompokkan: "Acidimicrobineae"

Aciditerrimonas

Subkelas: Actinobacteridae

Ordo: Actinomycetales

Subordo: Actinomycineae

Familia: Actinomycetaceae

Actinobaculum, Actinomyces, Arcanobacterium,
Falcivibrio, Flaviflexus, Mobiluncus, Trueperella,
Varibaculum

Subordo: Actinopolysporineae

Familia: Actinopolysporaceae

Actinopolyspora

Subordo: Catenulisporineae

Familia: Actinospicaceae

Actinospica

Familia: Catenulisporaceae

Catenulispora

Subordo: Corynebacterineae

Familia: Corynebacteriaceae

Bacterionema, Caseobacter, Corynebacterium,
Turicella

Familia: Dietziaceae

Dietzia

Familia: Gordoniaceae

Gordonia, Millisia, Skermania

Familia: Mycobacteriaceae

Amycolicococcus, Mycobacterium

Familia: Nocardiaceae

Gordonia, Micropolyspora, Millisia, Nocardia,
Rhodococcus, Skermania, Smaragdicoccus,
Williamsia

Familia: Segniliparaceae

Segniliparus

Familia: Tsukamurellaceae

Tsukamurella, Hoyosella, Tomitella

Subordo: Frankineae

Familia: Acidothermaceae

Acidothermus

Familia: Cryptosporangiaceae

Cryptosporangium, Fodinicola

Familia: Frankiaceae

Frankia, Jatrophihabitans

Familia: Geodermatophilaceae

Blastococcus, Geodermatophilus, Modestobacter

Familia: Nakamurellaceae

Humicoccus, Nakamurella, Saxeibacter

Familia: Sporichthyaceae

Sporichthya

Subordo: Glycomycineae

Familia: Glycomycetaceae

Glycomyces, Haloglycomyces, Stackebrandtia

Subordo: Jiangellineae

Familia: Jiangellaceae

Jiangella, Haloactinopolyspora

Subordo: Kineosporiineae

Familia: Kineosporiaceae

Angustibacter, Kineococcus, Kineosporia,
Pseudokineococcus, Quadrisphaera

Subordo: Micrococcineae

Familia: Beutenbergiaceae

Beutenbergia, Miniimonas, Salana, Serinibacter

Familia: Bogoriellaceae

Bogoriella, Georgenia, Oceanitalea

Familia: Brevibacteriaceae

Brevibacterium

Familia: Cellulomonadaceae

Actinotalea, Cellulomonas, Oerskovia,
Paraoerskovia, Sediminihabitans, Tropheryma

Familia: Demequinaceae

Demequina, Lysinimicrobium

Familia: Dermabacteraceae

Brachybacterium, Dermabacter, Devriesea,
Helcobacillus

Familia: Dermacoccaceae

Barrientosiimonas, Branchiibius, Calidifontibacter,
Demetria, Dermacoccus, Flexivirga, Kytococcus,
Luteipulveratus, Rudaeicoccus, Tamlicoccus,
Yimella

Familia: Dermatophilaceae

Austwickia, Dermatophilus, Kineosphaera,
Mobilicoccus, Piscicoccus

Familia: Intrasporangiaceae

Aquipuribacter, Arsenicococcus, Fodinibacter,
Humibacillus, Humihabitans, Intrasporangium,
Janibacter, Knoellia, Kribbia, Lapillicoccus,
Marihabitans, Ornithinibacter, Ornithinicoccus,
Ornithinimicrobium, Oryzihumus,
Phycococcus, Serinicoccus, Terrabacter,
Terracoccus, Tetrasphaera

Familia: Jonesiaceae

Jonesia

Familia: Microbacteriaceae

Agreia, Agrococcus, Agromyces, Alpinimonas,
Amnibacterium, Aureobacterium, Chryseoglobus,
Clavibacter, Compostimonas, Cryobacterium,
Curtobacterium, Diaminobutyricimonas,
Frigoribacterium, Frondihabitans, Glaciibacter,
Gryllotalpicola, Gulosibacter, Herbiconiux,
Homoserinimonas, Humibacter, Klugiella,
Labeledella, Leifsonia, Leucobacter, Lysinimonas,
Marisediminicola, Microbacterium, Microcella,
Microterricola, Mycetocola, Okibacterium,

Phycicola, Plantibacter, Pontimonas,
Pseudoclavibacter, Rathayibacter, Rhodoglobus,
Salinibacterium, Schumannella, Subtercola,
Yonghaparkia, Zimmermannella

Familia: Micrococcaceae

Acaricomes, Arthrobacter, Auritidibacter,
Citricoccus, Enteractinococcus, Kocuria,
Micrococcus, Nesterenkonia, Pelczaria,
Renibacterium, Rothia, Sinomonas,
Stomatococcus, Yaniella, Zhihengliuella

Familia: Promicromonosporaceae

Cellulosimicrobium, Isoptericola, Myceligenerans,
Promicromonospora, Xylanibacterium,
Xylanimicrobium, Xylanimonas

Familia: Rarobacteraceae

Rarobacter

Familia: Ruaniaceae

Haloactinobacterium, Ruania

Familia: Sanguibacteraceae

Sanguibacter

Familia: Yaniellaceae

Yaniella

Subordo yang belum dikelompokkan:

Micrococcineae

Koreibacter, Luteimicrobium

Subordo: Micromonosporineae

Familia: Micromonosporaceae

Actinaurispora, Actinocatenispora, Actinoplanes,

Allocatelliglobosispora, Amorphosporangium,
Ampullariella, Asanoa, Catellatospora,
Catelliglobosispora, Catenuloplanes,
Couchioplanes, Dactylosporangium, Hamadaea,
Jishengella, Krasilnikovia, Longispora,
Luedemannella, Micromonospora, Phytohabitans,
Phytomonospora, Pilimelia, Planopolyspora,
Planosporangium, Plantactinospora,
Polymorphospora, Pseudosporangium,
Rugosimonospora, Salinispora, Spirilliplanes,
Verrucosipora, Virgisporangium, Xiangella

Subordo: Propionibacterineae

Familia: Nocardioideae

Actinopolymorpha, Aeromicrobium, Hongia,
Flindersiella, Kribbella, Marmoricola,
Nocardioides, Pimelobacter, Thermasporomyces

Familia: Propionibacteriaceae

Aestuariiimicrobium, Arachnia Auraticoccus,
Brooklawnia, Friedmanniella, Granulicoccus,
Luteococcus, Microlunatus, Micropruina,
Naumannella, Propionibacterium, Propionicicella,
Propioniciclava, Propionicimonas, Propioniferax,
Propionimicrobium, Tessaracoccus

Subordo: Pseudonocardineae

Familia: Actinosynnemataceae

Familia: Pseudonocardiaceae

Actinoalloteichus, Actinobispora,
Actinokineospora, Actinomycetospora,
Actinophytocola, Actinosynnema,
Alloactinosynnema, Allokutzneria, Amycolata,
Amycolatopsis, Crossiella, Faenia, Goodfellowiella,

Haloechothrix, Kibdelosporangium,
Kutzneria, Labedaea, Lechevalieria, Lentzea,
Prauserella, Pseudoamycolata, Pseudonocardia,
Saccharomonospora, Saccharopolyspora,
Saccharothrix, Sciscionella, Streptoalloteichus,
Thermobispora, Thermocrisum, Umezawaea,
Yuhushiella

Subordo: Streptomycineae

Familia: Streptomycetaceae

Actinopycnidium, Actinosporangium, Chainia,
Elytrosporangium, Kitasatoa, Kitasatospora,
Microellobosporia, Streptacidiphilus,
Streptomyces, Streptoverticillium

Subordo: Streptosporangineae

Familia: Nocardiopsaceae

Haloactinospora, Marinactinospora,
Murinocardiopsis, Nocardiopsis, Salinactinospora,
Spinactinospora, Streptomonospora,
Thermobifida

Familia: Streptosporangiaceae

Acrocarpospora, Herbidospora, Microbispora,
Microtetrastroma, Nonomuraea, Planobispora,
Planomonospora, Planotetrastroma,
Sphaerisporangium, Streptosporangium,
Thermoactinospora, Thermocatellispora,
Thermopolyspora

Familia: Thermomonosporaceae

Actinoallomurus, Actinocorallia, Actinomadura,
Excellospora, Spirillospora, Thermomonospora

**Subordo yang belum dikelompokkan
Streptosporangineae**

Allonocardiopsis, Sinosporangium

Ordo: Bifidobacteriales

Familia: Bifidobacteriaceae

Aeriscardovia, Alloscardovia, Bifidobacterium,
Gardnerella, Metascardovia, Parascardovia,
Scardovia

Subkelas: Coriobacteridae

Ordo: Coriobacteriales

Subordo: Coriobacterineae

Familia: Coriobacteriaceae

Adlercreutzia, Asaccharobacter, Atopobium,
Collinsella, Coriobacterium, Cryptobacterium,
Denitrobacterium, Eggerthella, Enterorhabdus,
Gordonibacter, Olsenella, Paraeggerthella, Slackia

Subkelas: Nitriliruptoridae

Ordo: Euzebyales

Familia: Euzebyaceae

Euzebya

Ordo: Nitriliruptorales

Familia: Nitriliruptoraceae

Nitriliruptor

Subkelas: Rubrobacteridae

Ordo: Gaiellales

Familia: Gaiellaceae

Gaiella

Ordo: Rubrobacterales

Subordo: Rubrobacterineae

Familia: Rubrobacteraceae

Rubrobacter

Ordo: Solirubrobacterales

Familia: Conexibacteraceae

Conexibacter

Familia: Patulibacteraceae

Patulibacter

Familia: Solirubrobacteraceae

Solirubrobacter

Ordo: Thermoleophilales

Familia: Thermoleophilaceae

Thermoleophilum

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, A. 2012. Actinobacteria penghasil antifungi asal rizosfer tegakan kayu putih hutan Wanagama I Yogyakarta: Isolasi, optimasi dan karakterisasi Actinobacteria serta isolasi senyawa antifungi. Disertasi Program Studi Bioteknologi, UGM Yogyakarta, Tidak Dipublikasi.
- Ali, A., Junda, M., Dini, I. 2014. Skrining dan karakterisasi *Actinomyces* penghasil senyawa antibakteri dari beberapa lokasi di Sulawesi Selatan. Laporan Penelitian. DIKTI
- Arai, T., Mikami, Y. 1972. Chromogenecity of *Streptomyces*. *Appl. Microbiol.* 23:402-406
- Asolkar, R.N., Freel, K.C., Jensen, P.R., Fenical, W., Kondratyuk, T.P., Park, E.J., Pezzuto, J.M. 2009. Arenamides A-C, cytotoxic NF- κ B inhibitors from the marine Actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Nat. Prod.* 72: 396-402
- Atlas, R.M. 1997. Principle of Microbiology. WmC. Brown Publisher, USA
- Atlas, R.M., Bartha, R. 1997. Microbial Ecology. Fundamental and Applications. An Imprint of Addison Wesley Longman, Inc. New York.
- Ayuso-Sacido A., Genilloud, O., 2005. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in Actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbiol. Ecol.*, 49: 10-24.
- Badji, B., Zitouni,A., Mathieu,F., Lebrihi, A., Sabaou, N. 2006. Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp AC104 isolated from an Algerian Sahara soil. *Can J Microbiol*, 55 (4): 373-382

- Barrow, C.J., Oleynek, J.J., Marinelli, V. 1997. Antimycins, inhibitors of ATP-citrate lyase, from a *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* 50:729-733.
- Behal, V. 2000. Bioactive products from Streptomyces. *Adv. Appl. Microbiol.* 47: 113-157
- Bendl, B.J., Mackey, D., Al-Saati, F., Sheth, K.V., Ofole, S.N., Bailey, T.M. 1987. Mycetoma in Saudi Arabia. *J Trop Med Hyg* 90(2): 51-9.
- Bennett, M., Marchant, A., May, S.T., Swarup, R., 1998. Going the distances with auxin: Unrevealing the molecular basis of auxin transport. *Philos. Trans. R. Soc, London, Ser. B.* 353: 1511-1515
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Tarraga, A.M.C., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D. 2002. Complete genome sequence of the model *Actinomycetes* *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, 417: 141-147.
- Berg, G., Opelt, K., Zachow, C., Lottmann, J., Monika, G, Costa, R., Smalla, K. 2006. The rhizosphere selection bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiol Ecol*, 56: 250–261
- Bernan, V.S., Greenstein, M., Carter, G.T. 2004. Mining marine microorganisms as a source of new antimicrobials and antifungals. *Curr. Med. Chem. Anti-Infective Agents* 3: 181-195.
- Betina, V. 1983. The chemistry and biology of antibiotics. Amsterdam: Elsevier Scientific Pub. Co.

- Challis, G.L., Hopwood, D.A. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(Suppl 2):14555–14561
- Chamberlain, K., Crawford, D.L. 2000. Thatch biodegradation and antifungal activities of two lignocellulolytic *Streptomyces* strains in laboratory cultures and in golf green turfgrass. *Can J Microbiol* 46(6): 550-8.
- Cheng, Y.Q., Tang, G.L., Shen, B. 2003. Type I polyketide synthase requiring a discrete acyltransferase for polyketide biosynthesis. *PNAS* 100(6):3149–3154 ([www.pnas.org/cgi/doi/10.1073_pnas.0537286100](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0537286100)).
- Clarridge, J.E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 17:840–862
- Colwell, R. R., 1970, Polyphasic taxonomy of bacteria. In *Proceedings of the International Conference on Culture Collections*: 421436. Edited by H. Iizuka & T. Hasegawa. Tokyo, Tokyo Univ. Press
- Collins, M.D. 1985. 11 Analysis of isoprenoid quinones. *Methods in Microbiology.* 18: 329-366.
- Cooper, D.M., Swanson, D. L., Barns, S.M., Gebhart, C.J. 1997. Comparison of the 16S Ribosomal DNA sequences from the intracellular agents of proliferative Enteritis in a hamster, deer, and ostrich with the sequences of a porcine isolate of *Lawsonia intracellularis*. *Int. J. Sys Bacteriol.* 47 (3): 635-639
- Crawford, D.L., Lunch, J.M., Whipps, J.M., Ousley, M.A. 1993. Isolation and characterization of *Actinomycetes* antagonists of fungal root pathogen. *Appl Environ Microbiol* 59: 3899–3905

- Demain AL, 1989. Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in Actinomycetes. In: Shapiro S, editor. Regulation of actinomycetes, Boca Raton, FL: CRC Press: 127-34.
- Dewick, P.M. 2002. Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach, Second Edition. John Wiley & Sons, Ltd
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Broek, A. V., Vanderleyden, J. 1999. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*. 155-164
- Dutkiewicz, J., Krysinska-Traczyk, E., Skorska, C., Sitkowska, J., Prazmo, Z., Golec, M. 2001. Exposure to airborne microorganisms and endotoxin in herb processing plants. *Ann Agric Environ Med*, 8(2): 201-11.
- Ezra, D., Castillo, U.F., Strobel, G.A., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Condrón, M.A.M., Teplow, D.B., Sears, J., Maranta, M., Hunter, M., Weber, B., Yaver, D. 2004. Coronomycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology*. 150: 785-793
- Euverink, G.J.W. 1999. Aromatics amino acid biosynthesis in *Actinomycetes*. *Reviews* :11-34
- FAO. 2008. <http://www.fao.org/organicag>
- Feling, R.H., Buchanan, G.O., Mincer, T.J., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. 2003. Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospora*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42: 355-357.
- Fenical, W., Jansen, P.R. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology*. 2: 666 - 673

- Fenical, W., Jensen, P.R., Palladino, M.A., Lam, K.S., Lloyd, G.K., Potts, B.C. 2009. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052). *Bioorg Med Chem* 17: 175-2180.
- Fiedler, H.P., Bruntner, C., Riedlinger, J., Bull, A.T., Knutsen, G., Goodfellow, M., Jones, A., Maldonado, L., Pathomaree, W., Beil, W., Schneider, K., Keller, S., Sussmuth, R.D. 2008. Proximicin A, B and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds isolated from marine strains of the actinomycete *Verrucosispora*. *J. Antibiot.*, 61: 158-163
- Finking, R., Marahiel, M.A. 2004. Biosynthesis of non-ribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58:453–488.
- Genersch, E., Otten, C. 2003. The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie*: 195-206
- Getha, K., Vikinesway, S. 2005. Evaluation of *Streptomyces* sp. Strain g10 for suppression of Fusarium wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J Ind Microbiol Biot*, 32(1):24-32
- Goodfellow, M. 1989. Suprageneric classification of Actinomycetes. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4, Williams and Wilkins Company, Baltimore : 2333-2339
- Grayston, S.J., Vaughan, D., Jones, D. 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl Soil Ecol*, 5:29-56.
- Hahn, D., Nickel, A., Dawson, J. 1999. Assessing Frankia populations in plants and soil using molecular methods. *FEMS Microbiol Ecol*, 29:215-227.

- Hasegawa, T., M. Takisawa., S. Tanida, 1983. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic Actinomycetes. *J. Gen. Applied Microbiol.*, 29: 319-322.
- Hasegawa, S., Meguro, A., Shimizu, M., Nishimura, T., Kunoh, H. 2006. Endophytic Actinomycetes and their interaction with host plants. *Actinomycetologica*, 20, 72-81
- Hayakawa, M., Nonomura, H., 1987, Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil Actinomycetes. *J. Ferment. Technol.*, 65:501-509.
- Hayakawa, M., Takeuchi, T., Yamazaki, T. 1996. Combined use of trimethoprim with nalidixic acid for the selective isolation of Actinomycetes from soil. *Actinomycetologica*, 10: 80–90.
- He, R., Wang, G., Liu, X.H., Zhang, C., Lin, F. 2009. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Epimedium brevicornu* Maxim. *African Jof Biotech* 8 (2):191-195
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th edition.
- Hoskisson, P.A., Hobbs, G., Sharples, G.P. 2001. Antibiotic production, accumulation of intracellular carbon reserves, and sporulation in *Micromonospora echinospora* (ATCC 15837). *Canadian Journal of Microbiology*, 47(2): 148-152
- Hughes, D. 2003. Exploiting genomic genetics and chemistry to combat antibiotics resistance. *Nat Rev*, 4:432-439.
- Hussain, A.A., S.A. Mostafa, S.A. Ghazal., S.Y. Ibrahim, 2002. Studies on antifungal antibiotic and bioinsecticidal activities of some Actinomycete isolates. *African J. Mycol. Biotechnol.* 10: 63-80.

- Hulton, C. S. J., Higgins, C. F., Sharp, P. M. 1991, ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other Enterobacteria. *Mol. Microbiol.*, 5:825–762
- Igarashi, M., Liyama, Y., Kato, R., Tomita, M., Asami, N., Ezawa, I. 1994. Effect of *Bifidobacterium longum* and lactulose on the strength of bone in ovariectomised osteoporosis model rats. *Bifidus* 7:139 - 147
- Itoh, T., Kinoshita, M., Wei, H., Kobayashi, M. 2003. Stereostructure of komodoquinone A, a neurotogenic anthracycline, from marine *Streptomyces* sp. KS3. *Chem. Pharm. Bull.* 51: 1402-1404.
- Janse, J.D. 2005. *Phytobacteriology: Principle and Practice*. Cambridge: CAB International Publishing
- Jeong, S.Y., Shin, H.J., Kim, T.S., Lee, H.S., Park, S.K., Kim, H.M. 2006. Streptokordin, a new cytotoxic compound of the methylpyridine class from a marine-derived *Streptomyces* sp. KORDI-3238. *J. Antibiot.* 59: 234-240
- Jiang, S.M., Sun, W., Chen, M., Dai, S., Zhang, L., Liu, Y., Lee, K.J., Li, X. 2007. Diversity of culturable Actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek* 92:405–416
- Jørgensen, O.B., Karlsen, L.G., Nielson, N.B., Pederson, S., Rugh, S. 1988. A new immobilized glucose isomerase with high productivity produced by a strain of *Streptomyces murinus*. *Starch Staerke* 40: 307-313
- Kansoh, A.L., Nagieb, Z.A. 2004. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Anton Leeuw Int J G* 85: 103–114

- Kanoh, K., Matsuo, Y., Adachi, K., Imagawa, H., Nishizawa, M., Shizuri, Y. 2005. Mechercharmycins A and B, cytotoxic substances from marine-derived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251. *J. Antibiot.* 58: 289-292
- Kekuda, T.R.P., Shobha, K.S., Onkarappa, R. 2010. Fascinating diversity and potent biological activities of Actinomycete metabolites. *J Pharm Res.* 3(2): 250-256
- Kerry, B. R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 38: 423-441.
- Ketela, M.M., Halo, L., Munukka, E., Hakala, J., Mantsala, P., Ylihonko, K. 2002. Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequences analysis of polyketide ketosynthase and 16S rDNA genes from various *Streptomyces* species. *Appl Environ Microbiol*, 69 (9):4472-4479
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. A. 2000. Practical streptomyces genetics. *The John Innes Foundation* (Norwich)
- Kim, B.S., Moon, S.S., Hwang, B.K. 2000. Structure elucidation and antifungal activity of an antracycline antibiotic, daunomycin, isolated from *Actinomadura rosela*. *J Agr Food Chem*, 48: 1875-1881.
- Klokke, A.H., Swamidasan, G., Anguli, R., Verghese, A. 1968. The causal agents of mycetoma in South India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 62: 509-516
- Kock, I., Maskey, R.P., Biabani, M.A., Helmke, E., Laatsch, H. 2005. 1-Hydroxy-1-norresistomycin and resistoflavin methyl ether: new antibiotics from marine-derived streptomycetes. *J. Antibiot.* 58: 530-534.

- Komaki, H., Harayama, S. 2006. Sequence diversity of type-II Polyketide Synthase genes in *Streptomyces*. *Actinomycetologica*, 20(2): 42-48
- Kroppenstedt, R. M. 1985. Fatty acid and menaquinone analysis of Actinomycetes and related organisms. In *Chemical Methods in Bacterial Systematics*: 173-199. Edited by M. Goodfellow & D. E. Minnikin. London: Academic Press.
- Kwon, H.C., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. 2006. Marinomycins A-D, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine Actinomycete of the recently discovered genus "*Marinispora*". *J. Am. Chem. Soc.* 128: 1622-1632.
- Lazzarini, A., L. Cavaletti, G. Toppo., F. Marinelli. 2000. Rare genera of Actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 399-405.
- Lee, J.P., Hwang, B.K. 2002. Diversity of antifungal Actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can J Microbiol*, 48: 407-417
- Lehninger, A. L., 1993. Principles of biochemistry. Worth New York.
- Lemriss, S., Laurent, F., Couble, A., Casoli, E., Lancelin, J.M., Bonaccio, D.S., Rifai, S., Fassauane, A., Boiron, P. 2003. Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of Actinomycetes. *Can J Microbiol*, 49 (11): 669-674.
- Li, W.J., Jiang, Y., Kroppenstedt, R.M., Xu, L.H., Jiang, C.L. 2004. *Nocardia alba* sp.nov., a novel Actinomycetes strain isolated from soil in China. *Syst Appl Microbiol*, 27: 308-312

- Li, F., Maskey, R.P., Qin, S., Sattler, I., Fiebig, H.H., Maier, A., Zeeck, A., Laatsch, H. 2005. Chinikomycins A and B: isolation, structure elucidation, and biological activity of novel antibiotics from a marine *Streptomyces* sp. isolate M045. *J. Nat. Prod.* 68:349-353.
- Ludwig, W., Euzéby, J., Schumann, P., Busse, H., Trujillo, M. E., Kampf, P., Whitman, W. B. 2011. Road map of the Actinobacteria, *Bergey's Manual System. Bacteriol.* 5: 25-50.
- Lynch, J.M. 1983. Soil Biotechnology: Microbiological factors in crop productivity. Blackwell Scientific Publication, London.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 1997. *Brock Biology of Microorganisms, Eighth Edition*, Prentice Hall .
- Madigan, M.T., J. M. Martinko., J. Parker. 2003. Brock Biology of Microorganism. Prentice Hall.
- Mahe, A., Develoux, M., Lienhardt, C., Keita, S., Bobin, P. 1996. Mycetomas in Mali: causative agents and geographic distribution. *Am J Trop Med Hyg.* 54(1):77-9.
- Magarvey, N.A., Keller, J.M., Bernan, V., Dworkin, M., Sherman, D.H. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived Actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl Environ Microbiol* 70:7520–7529
- Manam, R.R., Teisan, S., White, D.J., Nicholson, B., Grodberg, J., Neuteboom, S.T., Lam, K.S., Mosca, D.A., Lloyd, G.K., Potts, B.C. 2005. Lajollamycin, a nitro-tetraene spiro-beta-lactone-gamma lactam antibiotic from the marine Actinomycete *Streptomyces nodosus*. *J. Nat. Prod.* 68:240-243.

- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D. A., Boulnois, G. J., Claverys, J. P., 1992, A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae* *Nucl. Acids. Res.*, 20: 479–3483
- Mayer, K.M., Ford, J., Macpherson, G.R., Padgett, D., Kohlmeyer, B.V., Kohlmeyer, J., Muphy, C., Douglas, S.E., Wright, J.M., Wright, J.L.C. 2007. Exploring the diversity of marine-derived fungal polyketide synthases. *Can J Microbiol*, 53: 291-302
- Miller, L.T, 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxyl acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 16(3): 584-586
- Miller, E.D., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. 2007. Piperazimycins: cytotoxic hexadepsipeptides from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. *J. Org. Chem.* 72: 323-330
- Money, N. P. 1997. Wishful thinking of turgor revisited: The mechanics of fungal growth. *Fungal Genet. Biol.* 21: 173-187
- Moore, B. S., Trischman, J. A., Seng, D., Kho, D., Jensen, P. R., Fenical, W. 1999. Salinamides, anti-inflammatory depsipeptides from a marine streptomycete. *J. Org. Chem.* 64(4): 1145-1150
- Mossad S.B., Tomford J.W., Stewart, R., Ratliff, N.B., Hall, G.S. 1995. Case report of *Streptomyces endocarditis* of a prosthetic aortic valve. *J Clin Microbiol* 33(12), 3335-7
- Muramatsu, H. 2008. Development of simple-identification method for Actinomycetes based on partial 16S rDNA sequences as exemplified by a comparative study of Malaysian and Japanese Actinomycetes. *Actinomycetologica*, 22: 30-33.

- Murray, R.G.E., Stackebrandt, E. 1995. Taxonomic Note: Implementation of the provisional status Candidatus for incompletely described procaryotes. *Int. J. Systematic Bacteriology* 45 (1): 186-187
- Myers, A.K., Tisa, L.S. 2004. Isolation of antibiotics-resistant and antimetabolite-resistant mutants of *Frankia* strains Eullc and Cc1.17. *Can J Microbiol*, 50(4): 261-267.
- Nedal, A. 2007. Post-PKS modifications in the biosynthesis of the antifungal antibiotic nystatin. Doctoral thesis for the degree of Philosophiae Doctor (Ph.D). Norwegian University of Science and Technology
- Newton, C.R, Graham, A. 1994. PCR. UK: Bios Scientific Publisher
- Nimnoi, P., Pongsilp, N., Lumyong, S. 2010. Endophytic Actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World J Microbiol Biotechnol* 26: 193–203
- Nishimura, T., Meguro, A., Hasegawa, S., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Hunoh, H. 2002. An endophytic Actinomycete, *Streptomyces* sp. AOK-30, isolated from Mountain Laurel and its antifungal activity. *J Gen Plant Pathol*, 68: 390-397.
- Oh, D.C., Gontang, E.A., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. 2008. Salinipyrones and pacificanones, mixed-precursor polyketides from the marine Actinomycete *Salinispora pacifica*. *J. Nat. Prod.* 71: 570-575
- Okazaki, T. 2003. Studies on Actinobacteria isolated from plant leaves. In selective isolation of are Actinobacteria (Ed. I.Kurtboke), pp 102–121, National Library of Australia.
- Olano, C., Méndez, C., Salas, J.A. 2009. Antitumor compounds from marine Actinomycetes. *Mar. Drugs.* 7:210-248

- Orhan, I., Sener, B., Kaiser, M., Brun, R., Tasdemir, D. 2010. Inhibitory activity of marine sponge-derived natural products against parasitic protozoa. *Mar. Drugs*. 8: 47-58
- Oskay, M. 2009. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. *African J Biotech* 8 (13): 3007-3017
- Paciorek, T., Friml, J. 2006. Auxin signaling. *J. Cell Sci.* 119: 1199-1202
- Paradkar, A., Trefzer, A., Chakraburty, Stassi, D. 2003. *Streptomyces* genetics: A genomic perspective. *Crit Rev Biotechnol*, 23:1-5.
- Pelaez, F. 2006. The historical derive of antibiotic from microbial natural product—can history repeat? *J. Biochem. Pharmacol.* 71: 981-990
- Pérez, B. J., Cañedo, L.M.; Fernández, P.J.L., Silva, E.M.V. 1997. Thiocoraline, a novel depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. II. Physicochemical properties and structure determination. *J. Antibiot.* 50: 738-741.
- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., Matuchansky C. 2005. Review article: bifidobacteria as probiotic agents-physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther* 22:495-512.
- Piel, J. 2004. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 21: 519-538
- Ping, L, Boland, W. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* 9: 263–266

- Pupo, M.T., Guimaraes, D.O., Furtado, N.A.J.C., Borges, W.S. 2006. Microbial natural products: *a promising source of bioactive compounds. Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry* (Taft CA, ed): 51–78
- Qin, S., Li, J., Zhao, G.Z., Chen, H.H., Xu, L.H., Li, W.J. 2008. *Scharopolyspora endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the root of *Maytenus austroyunnanensis*. *Syst Appl Microbiol* 31, 352– 357.
- Rademaker, J.L.W., Aarts, H.J.M., Vinuesa, P. 2005. Molecular typing of environmental isolates. In: A.M. Osborn and Smith, J.S (eds). 2005. *Molecular Microbial Ecology*. Taylor and Francis Group. New York 97-134.
- Rascher, A., Zhihao, H., Buchanan, G.O., Reid, R., Hutchinson, R 2005. Insights into the biosynthesis of the Benzoquinone, Ansamycins, Geldanamycin and Herbimycin, obtained by gene sequencing and disruption. *Appl Environ Microbiol*, 4862–4871
- Robinson, J.A 1991. Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis". *Philos T Roy Soc B*. 332: 107– DOI:10.1098/rstb.1991.0038.
- Sadowsky, M.J., Kinkel, L.L., Bowers, J.H., Schottel, J.L. 1996. Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease_suppressive Streptomyces strain. *Appl. Environ. Microbiol*, 62: 3489-3493
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor joining method: A new method for constructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.

- Schneider, K., Keller, S., Wolter, F.E., Röglin, L., Beil, W., Seitz, O., Nicholson, G., Bruntner, C., Riedlinger, J., Fiedler, H.P., Süßmuth, R.D. 2008. Proximicins A, B, and C-antitumor furan analogues of netropsin from the marine actinomycete *Verrucosispora* induce upregulation of p53 and the cyclin kinase inhibitor p21. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47: 3258-3261
- Schoenian, I., Paetz, C., Dickschat, J.S., Aigle, B., Leblond, P., Spittler, D. 2012. An unprecedented 1,2-shift in the biosynthesis of the 3-aminosalicylate moiety of antimycins. *Chem Bio Chem.* 13:769–773
- Scholz-Ahrens, K.E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Ail, Y., Gluer, C.C., Schrezenmeir, J. 2007. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *J Nutr* 137:838S-846.
- Sembiring, L. 2009. Molecular phylogenetic classification of Streptomycetes isolated from the rhizosphere of tropical legume (*Paraserianthes falcataria*) (L.) Nielsen. *Hayati J Bios*, 16 (3): 100-108.
- Shirling, E.B., Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16, 313-340.
- Sivakumar, K. 2002. Actinomycetes. <http://ocw.unu.edu/international-network-on-water-environment-and-health/unu-inweh-course-1-mangroves/Actinomycetes>
- Smolander, A, Sundman, V. 1987. Frankia in acid soils of forests devoid of actinorhizal plants. *Plant Physiol*, 70:297-303.
- Söderberg, KH., Bååth, E. 1998. Bacterial activity along a young barley root measured by the thymidine and leucine incorporation techniques. *Soil Biol Biochem*, 30:1259-1268

- Solanki, R., Khanna, M., Lai, R. 2008. Bioactive compounds from marine Actinomycetes. *Indian J. Microbiol.* 48: 410-431
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44, 846-849.
- Stanek, J.L., Roberts, G.D. 1974. Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Microbiol*, 28(2): 226-231
- Stackebrandt, E., Goebel, B.M. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44: 846-849.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 471–491.
- Sturz, A.V., Kimpinski, J. 2004. Endo-root bacteria derived from marigolds (*Tagetes* spp.) can decrease soil population densities of root-lesion nematodes in the potato root zone. *Plant Soil* 262: 241–249
- Sundarapandian, S., Sundaram, M.D., Tholkappian, P., Balasubramanian, V. 2002. Mosquitocidal properties of indigenous fungi and Actinomycetes against *Culex quinquefasciatus* Say. *J. Biol. Control.* 16: 89-91.
- Suzuki, S.I., Okuda, T., Komatsubara, S. 2000. Selective isolation and distribution of *Actinobispora* strain in soil. *Can J Microbiol*, 46: 708-715.

- Tahvonen, R., Avikainen, H. 1987. The biological control of seedborne *Alternaria brassicicola* of cruciferous plants with a powdery preparation of *Streptomyces* sp. *J. Agric. Sci. Finl.* 59: 199-208
- Tanaka, Y., S. Omura. 1993. Agroactive compounds of microbial origin. *Annu. Rev. Microbiol.* 47 : 57-87
- Tresselt, D.; Eckardt, K.; Ihn, W. 1978. Antibiotics from Actinomycetes chemical composition of antibiotic griseorhodin A. *Tetrahedron* 34: 2693-2699.
- Trivedi, P.C., Pandey, S., Bhaduria, S. 2010. Text book of Microbiology, First Published in 2010 by Prem C. Bakliwal
- Trujillo, M.E., Goodfellow, M. 2003. Numerical phenetic classification of clinically significant aerobic sporoactinomycetes and related organisms. *Antonie van Leeuwenhoek.* 84(1), 39-68
- Tuncer, M., Andrew, S. B., Rob, A., Michael, T. W. 1999. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic Actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. *Enzyme and Microbial Technology.* 25. Issues 1–2: 38–47
- Uchida, K., Aida, K. (1977). Acyl type of bacterial cell wall: its simple **identification** by colorimetric method. *J Gen Appl Microbiol* 23: 249-260.
- Unaogu, I. C., Gugnani, H.C., Lacey, J. 1994. Occurrence of thermophilic Actinomycetes in natural substrates in Nigeria. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 65: 1-5
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60, 407-438.

- Vernekar, J.V., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, W. 2001. Novel bifunctional alkaline protease inhibitor protease inhibitory activity as the biochemical basis of antifungal activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 285(4): 1018-1024
- Versalovic, J, Schneider, M., de Bruijn, F. J., Lupski, J. R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based on PCR (rep-PCR). *Meth. Cell Mol. Biol.*, 5:25–40.
- Vishnupriya, B., Sundaramoorthi, C., Kalaivani, M., Selvam, K. 2010. Production of lipase from *Streptomyces griseus* and evaluation of bioparameters. *International Journal of Chem Tech Research.* 2 (3):1380-1383.
- Waksman, S., Henrici, A. 1943. The nomenclature and classification of the Actinomycetes. *J Bacteriol* 46: 337-341.
- Ward, B.B., dan O'Mullan, G.D. 2002. Worldwide distribution of *Nitrosococcus oceani*, a marine ammonia-oxidizing γ -Proteobacterium, detected by PCR and sequencing of 16S rRNA and *amoA* genes. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8): 4153-4157
- William, S.T., Davies, F.L. 1965. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of Actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbiol.* 38:251-261
- Williams, P.G., Miller, E.D., Asolkar, R.N., Jensen, P.R., Fenical, W. 2007. Arenicolides A-C, 26-membered ring macrolides from the marine Actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Org. Chem.* 72: 5025-5034
- Whipps, J. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* 52: 487–511
- Woese, C. R., Stackebrandt, E., Macke, T. J., Fox, G. E. 1985, A phylogenetic definition of major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6:143–151.

- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(12): 4576-9.
- Wu, S.J., Fotso, S., Li, F., Qin, S., Kelter, G., Fiebig, H.H., Laatsch, H. 2006. 39-N-carboxamidostaurosporine and selina-4(14),7(11)-diene-8,9-diol, new metabolites from a marine *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* 59: 331-337
- Wu, S.J., Fotso, S., Li, F., Qin, S., Laatsch, H. 2007. Amorphane sesquiterpenes from a marine *Streptomyces* sp. *J. Nat. Prod.* 70: 304-306.
- Yao, C.B.F., Schiebel, M., Helmke, E., Anke, H., Laatsch, H. 2006. Prefluostatin and new urauchimycin derivatives produced by *Streptomyces* isolates, *Zeitschrift fur Naturforschung B* 61 (3): 320-325
- Yanti, N.A. 2011. Kajian bakteri amilolitik penghasil Poli- β -Hidroksibutirat (PHB) dari pati sagu. Disertasi. UGM Yogyakarta
- Yehuda, M.L. 2005. The search for novel secondary metabolites from marine obligate Actinomycetes. *myehuda@uscd.edu*
- Zhi, X.Y., Li, W.J., Stackebrandt, E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class *Actinobacteria*, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 589-608.