

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ISOLAT ACTINOMYCETES
DARI RIZOSFER PADI (*Oryza sativa* L.) SEBAGAI
PENGHASIL ANTIFUNGI**

NASKAH PUBLIKASI



Oleh:

**HAMIDAH
K 100 090 166**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2013**

PENGESAHAN NASKAH PUBLIKASI
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ISOLAT ACTINOMYCETES DARI
RIZOSFER PADI (*Oryza sativa* L.) SEBAGAI PENGHASIL
ANTIFUNGI

Oleh :
HAMIDAH
K 100 090 166

Telah disetujui dan disahkan pada :

Hari : Rabu
Tanggal : 30 Januari 2013

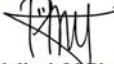
Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Dekan,


Dr. Muhammad Da'i, M.Si., Apt.


Penguji I


Ika Trisharyanti DK, M.Farm., Apt


Penguji II


Ratna Yuliani, M.Biotech.St

Pembimbing I


Ambarwati, M.Si

Pembimbing II


Peni Indrayudha, M.Biotech., Apt

Mahasiswa


Hamidah

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ISOLAT ACTINOMYCETES DARI
RIZOSFER PADI (*Oryza sativa* L.) SEBAGAI PENGHASIL ANTIFUNGI**

***ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ACTINOMYCETES ISOLATED
FROM RHIZOSPHERE of RICE TO PRODUCE ANTIFUNGAL***

Hamidah*, Ambarwati, Peni Indrayudha***

***Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta**

****Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Surakarta**

ABSTRAK

Actinomycetes merupakan kelompok mikroba penghasil antibiotik paling banyak. Actinomycetes menjadi sangat penting dalam industri farmasi karena kemampuannya dalam memproduksi senyawa metabolit yang bervariasi, baik dari struktur maupun fungsinya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jumlah isolat Actinomycetes yang dapat ditemukan pada rizosfer padi (*Oryza sativa* L.) serta potensinya sebagai penghasil antifungi.

Tanah rizosfer padi (*Oryza sativa* L.) diisolasi dengan metode *pour plate* pada media *Starch-Casein Agar* dan *Raffinose Histidine Agar*. Untuk mendapatkan isolat murni dari Actinomycetes, maka dilakukan purifikasi pada media *Starch-Casein Agar*. Dari hasil purifikasi dilakukan identifikasi isolat Actinomycetes. Identifikasi dilakukan berdasar karakteristik koloni, pewarnaan Gram serta *colour grouping*. Uji aktivitas antifungi isolat Actinomycetes dilakukan dengan metode agar blok. Aktivitas antifungi isolat Actinomycetes ditandai dengan ada (+) atau tidaknya (-) zona jernih pada media uji.

Isolasi Actinomycetes dari rizosfer padi (*Oryza sativa* L.) diperoleh 60 isolat dan setelah dipurifikasi diperoleh 39 isolat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 39 isolat Actinomycetes yang diperoleh hanya 2 isolat yang memiliki aktivitas antifungi dengan menghambat pertumbuhan *Candida albicans*, sedangkan tidak ditemukan isolat yang memiliki aktivitas antifungi pada *Aspergillus fumigatus*.

Kata kunci : Rizosfer, Padi (*Oryza sativa* L.), Actinomycetes, Antifungi, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*

ABSTRACT

Actinomycetes are kind of microbe that as the large producer of antibiotics. Actinomycetes can be crucial thing in pharmacy industry because its ability in produce metabolit compound which has some variations, both of structure and its function. The purpose of this research is to know quantity of Actinomycetes isolated which can found at rice rhizosphere, besides its potential as producer of antifungal.

Soil of rice rhizosphere isolated by puor plate method on the Strach-Casein Agar and Raffinose Histidine Agar medium. To get pure isolated from Actinomycetes, then performed purification on the Strach-Casein Agar medium .Identificate isolated Actinomycetes from the purification result. Identification done based on of colony characteristic, gram staining, colour grouping. Activity test antifungal isolated Actinomycetes through agar block method. Antifungal isolated Actinomycetes has been marked with presence and absence of clear zone on test medium.

Result from isolation of Actinomycetes rice rhizosphere to produce isolated 60 and then that purification produce 39 isolated. The result of this research show that from 39 isolate Actinomycetes which got only 2 isolat that has antifungal with hamper the growth of Candida albicans, while was not found isolated that has antifungal on Aspergillus fumigatus.

Key word: Rhizosphere, Rice plant (Oryza sativa L.), Actinomycetes, Antifungal, Candida albicans, Aspergillus fumigatus.

PENDAHULUAN

Fungi dapat menyebabkan penyakit infeksi yang serius. Peningkatan infeksi berakibat pada morbiditas dan mortalitas yang berlebihan. Di samping itu, populasi yang berisiko terkena infeksi karena jamur akan meningkat secara signifikan (Aly *et al.*, 2011). Namun demikian, tidak semua populasi akan langsung merasakan dampak atau gejala dari infeksi tersebut, sehingga penyakit infeksi tersebut menjadi semakin serius. Infeksi serius yang mengancam jiwa dilaporkan semakin meningkat seiring dengan meningkatnya berbagai patogen, termasuk oportunistik *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, dan *Aspergillus fumigatus* (Mirza *et al.*, 2003). Kematian karena infeksi jamur selain penyakit kulit yang sangat tinggi juga dikarenakan diagnosis yang terlambat atau salah serta belum tersedia antibiotik nontoksik yang secara medis dapat digunakan, sehingga penyakit tersebut menjalar dan bertambah parah (Pelczar & Chan, 2007). Seiring perkembangan zaman, penyakit infeksi dapat ditanggulangi menggunakan antifungi baru yang berasal dari Actinomycetes.

Actinomycetes merupakan kelompok mikroba penghasil antibiotik paling banyak. Sekitar 70% - 80% antibiotik dihasilkan oleh Actinomycetes terutama genus *Streptomyces* (Kanna *et al.*, 2011). Actinomycetes menjadi sangat penting

dalam industri farmasi karena kemampuannya dalam memproduksi senyawa metabolit yang bervariasi, baik dari struktur maupun fungsinya. Senyawa metabolit yang dihasilkan oleh Actinomycetes mempunyai aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri dan fungi. Atas dasar ini maka metabolit yang dihasilkan Actinomycetes banyak dikembangkan sebagai bahan obat yang dapat menanggulangi berbagai macam penyakit (Nurkanto *et al.*, 2010).

Kamna *et al.* (2008) melaporkan bahwa terdapat 445 isolat Actinomycetes dari 16 tanah rizosfer tanaman obat. Adapun isolat-isolat tersebut 89% merupakan genus *Streptomyces* dan 11% genus selain *Streptomyces*. Isolasi rizosfer *Cucurbita mangga* mampu menghasilkan keanekaragaman Actinomycetes dibanding rizosfer dari tanaman obat yang lain. Isolat – isolat tersebut mempunyai aktivitas antifungi yang berbeda - beda terhadap *Alternaria brassicicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, dan *Sclerotium rolfsii*.

Actinomycetes juga dapat dihasilkan dari rizosfer tanaman budidaya, contohnya jagung (*Zea mays* L.) yang dapat menghasilkan 58 isolat Actinomycetes, 10 diantaranya dapat berpotensi sebagai penghasil antibiotik dengan cara menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif (Ambarwati *et al.*, 2010). Tanaman budidaya lainnya adalah padi. Padi merupakan tanaman budidaya yang penting bagi kelangsungan hidup manusia. Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mengetahui jumlah isolat yang didapat dari isolasi rizosfer padi (*Oryza sativa* L.) serta melakukan uji potensi isolat Actinomycetes sebagai penghasil antifungi. Pengujian dilakukan dengan mengukur diameter daerah hambatan terhadap pertumbuhan fungi uji. Fungi uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *Candida albicans* dan *Aspergillus fumigatus*

METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan:

Cawan petri (Herma[®], Normax[®]) steril, spatula, lilin, cawan porselin (Herma[®]), oven (Memmert[®]), mikropipet (Health[®]), *blue tips*, timbangan analitik

(Acis[®] CAD-360H), *beaker glass* (Pyrex[®]) ukuran 50mL, pengaduk gelas, pH meter, botol universal, tabung reaksi (Pyrex[®]), pipet (Pyrex[®]) steril, *vortex mixer* (Health[®]), *colony counter* (Stuart Scientific[®]), autoklaf (One Med[®]), ose steril, *objek glass*, bunsen, *tissue*, mikroskop (Olympus), perangkat digital mikroskop (Optilab CPU Intel RAM 512 MB), dan *cork borer* diameter 6 mm.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

Sampel tanah rizosfer padi (*Oryza sativa* L.), *aquadest*, larutan ringer, media *Starch-Casein Agar* (SCA), media *Raffinose Histidin Agar* (RHA), media *Oatmeal Agar* (OA), media *Potato Dextrose Agar* (PDA), nistatin, pewarna Carbol gentian violet, pewarna iodium, alkohol 95%, pewarna safranin, minyak imersi, fungi uji (*Candida albicans* dan *Aspergillus fumigatus*)

B. Jalannya Penelitian

Koleksi sampel tanah yang digunakan pada penelitian ini adalah tanah rizosfer padi (*Oryza sativa* L.) milik Bapak Budi Kiswanto di daerah Rojoniten RT 02/ RW 1 yang diambil secara aseptis. Waktu pengambilan yaitu: Sabtu, 31 Maret 2012. Jenis Padi adalah Joe apu yang berumur 80 hari. Sampel diambil dari 5 titik dengan jarak tiap titik \pm 50 cm. Sampel tanah rizosfer tersebut dimasukkan dalam cawan petri dan dibiarkan di udara terbuka selama 4 hari Sampel tanah rizosfer tersebut diletakkan dalam cawan petri dan dibiarkan di udara terbuka selama 4 hari.

Estimasi berat kering -suspensi sampel pada pengenceran 10^{-1} yang tersisa dipindahkan ke cawan porselin yang telah ditimbang berat kosongnya. Selanjutnya cawan porselin yang berisi suspensi sampel tanah tersebut dimasukkan oven (105°C) selama 24 jam untuk mengeringkan air. Setelah kering, cawan porselin dan isinya ditimbang untuk mengetahui berat kering tanah tersebut. Estimasi kelembaban-satu gram tanah rizosfer dimasukkan cawan porselin yang sudah diketahui beratnya, kemudian dipanaskan dalam oven (105°C) selama 24 jam.

Penentuan pH-Dua gram tanah ditimbang, lalu dimasukkan dalam *beaker glass* 50 mL, kemudian ditambahkan *aquadest* hingga terbentuk lapisan air di

permukaan masa sampel tanah lalu dibiarkan selama 30 menit sampai 1 jam. Pengukuran nilai pH dilakukan dengan pH meter, nilai pH yang terukur dicatat.

Ekstraksi propagul sampel tanah- satu gram tanah dimasukkan tabung reaksi kemudian ditambah 9 mL larutan ringer lalu dikocok selama 5 menit dengan vortex (pengenceran 10^{-1}). Setelah itu suspensi sampel diletakkan dalam air panas (50°C) selama 10 menit. Diambil 4 tabung reaksi yang masing-masing diisi 9 mL larutan ringer dengan pipet steril. Dimasukkan 1 mL suspensi dari pengenceran 10^{-1} ke salah satu tabung reaksi yang telah berisi 9 mL larutan ringer, lalu dikocok merata dengan vortex (pengenceran 10^{-2}). Dengan cara yang sama dibuat suspensi dengan tingkat pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} .

Isolasi dan purifikasi sampel dilakukan dengan pengenceran sampel tanah, ditimbang sebanyak 1 gram kemudian ditempatkan pada botol universal. Setelah itu ditambahkan 9 mL larutan ringer dan dikocok selama 5 menit (suspensi ini merupakan pengenceran 10^{-1}). Setelah itu suspensi sampel diletakkan dalam air panas (50°C) selama 10 menit. Empat tabung reaksi disiapkan, masing-masing diisi dengan 9 mL larutan ringer dengan pipet steril. Kemudian diambil 1 mL suspensi pengenceran 10^{-1} , dimasukkan ke salah satu tabung reaksi yang berisi 9 mL larutan ringer, dan dikocok secara merata (suspensi ini merupakan tingkat pengenceran 10^{-2}). Dengan cara yang sama dibuat suspensi dengan tingkat pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} , dan 10^{-5} . Isolasi dilakukan secara *puor plate* pada media *Starch-Casein Agar* (SCA) dan media *Raffinose Histidin Agar* (RHA) dengan penambahan nistatin sebagai antifungi. Media yang telah diinokulasi diinkubasikan pada suhu 28°C selama empat hari sampai dua minggu (Sembiring *et al.*, 2000). Hasil koloni yang menunjukkan kenampakan berbeda, dilakukan purifikasi secara *streak plate* pada media *Starch-Casein Agar*.

Isolat hasil purifikasi, kemudian dilakukan *colour grouping* secara *spread plate* pada media *Oatmeal Agar* (Sembiring *et al.*, 2000). Hal ini dilakukan untuk mengelompokkan isolat berdasarkan warna miselium udara, miselium vegetatif dan warna pigmen terdifusi ke media atau tidak.

Pewarnaan Gram dilakukan berdasarkan Pelczar & Chan (2007)-Pada isolat yang telah dipurifikasi dilakukan pewarnaan gram. Pada isolat yang telah

dipurifikasi dilakukan pewarnaan gram. Caranya: diambil *objek glass* dan difiksasi dengan melidah apikan di atas bunsen sebanyak 2-3 kali secara cepat. Selanjutnya diambil 1 ose biakan koloni yang diduga Actinomycetes dan letakkan di atas *objek glass*. Kemudian biakan Actinomycetes diratakan dengan jarum ose. Setelah itu lakukan fiksasi dengan melidahapikan bagian yang tidak ada Actinomycetesnya di atas bunsen 2-3 kali dengan cepat. Langkah selanjutnya adalah menuangkan cat gram A (Carbol gentian violet), B (iodium), C (Alkohol 95%), dan D (Safranin) secara berurutan.

Isolat-isolat yang merupakan hasil purifikasi diuji cobakan pada fungi uji, yaitu *Candida albicans* dan *Aspergillus fumigatus*. Media yang digunakan *Potato Dextrose Agar* dengan metode agar blok (Nedialkova & Naidenova., 2005). Langkah terakhir yaitu mengamati terbentuknya zona hambat baik radikal maupun irradikal.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengambilan sampel sangat mempengaruhi keberadaan mikroorganisme, sehingga proses pengambilan sampel dilakukan secara aseptis. Kondisi lain yang dapat mempengaruhinya adalah faktor kimiawi yang meliputi: estimasi berat kering, kelembaban dan penentuan pH (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil estimasi berat kering, kelembaban dan pH

| Replikasi | Berat kering (g) | Kelembaban (%) | pH |
|-----------|------------------|----------------|------|
| 1 | 0,71 | 0,79 | 7,59 |
| 2 | 1,93 | 0,81 | 7,44 |
| 3 | 0,65 | 0,86 | 7,43 |
| Rerata | 1,09 | 0,85 | 7,49 |

Metode pengenceran tanah dapat digunakan untuk menaksir jumlah mikroorganisme di dalam tanah rizosfer per gram tanah. Berdasarkan hasil (Tabel 1), diperoleh rerata estimasi berat kering 1,09 g. Menurut Budiyanto (2002), populasi mikroorganisme dalam tanah yang subur dapat diasumsikan sebagai berikut: bakteri (2.500.000), Actinomycetes (700.000), fungi (400.000), alga (50.000), dan protozoa (30.000) per gram tanah yang subur. Bahkan, Waluyo (2009) menyatakan bahwa kelimpahan populasi Actinomycetes di dalam tanah adalah 500.000-100.000.000 propagul per gram tanah. Sehingga dari hasil estimasi berat kering tersebut dapat diperkirakan bahwa Actinomycetes yang

terdapat di rizosfer padi (*Oryza sativa* L.) berkisar antara 500.000-100.000.000. Hasil estimasi berat kering berkaitan erat dengan estimasi kelembaban.

Menurut Rao (1994), tanah yang penuh berisi air tidak cocok untuk pertumbuhan Actinomycetes, sedangkan tanah di daerah kering dan setengah kering dapat mempertahankan populasi yang cukup besar karena adanya ketahanan spora terhadap kekeringan. Actinomycetes dapat tumbuh sebagai populasi yang cukup besar di daerah kering (Budiyanto, 2002; Rao, 1994 & Kar, 2008). Sehingga semakin kering sampel tanah maka semakin sedikit kandungan airnya. Zenova *et al.* (2007) menyatakan bahwa populasi Actinomycetes beranekaragam pada tanah subur dengan rentang kelembaban 0,67-0,89%. Actinomycetes dapat tumbuh pada kelembaban rendah (0,67%) dan tumbuh secara optimal pada kelembaban (0,98%). Hasil penelitian ini menunjukkan estimasi kelembaban 0,82% diasumsikan terdapat pertumbuhan Actinomycetes. Semakin kering sampel tanah semakin banyak jumlah Actinomycetes yang hidup.

Umumnya Actinomycetes intoleran terhadap asam dan jumlahnya menurun pada pH 5,0. Secara teori, Actinomycetes cocok tumbuh pada rentang pH 6,5–8,0 (Rao, 1994). Berdasarkan penelitian ini, diperoleh pH 7,49 sehingga dapat disimpulkan bahwa pada sampel rizosfer padi (*Oryza sativa* L.) terdapat pertumbuhan Actinomycetes. Labeda (1990), menerangkan bahwa Actinomycetes merupakan mikroorganisme yang jumlah dan jenisnya sangat dipengaruhi oleh suhu, jenis, pH, kandungan organik, aerasi, serta kadar air dalam tanah.

Isolasi dan purifikasi-menurut Labeda (1990) isolasi Actinomycetes dapat dimulai dengan pra perlakuan selektif pada Actinomycetes yang dilakukan untuk memilih kenampakan yang berbeda dari populasi Actinomycetes. Pra perlakuan dilakukan untuk memilih kelompok Actinomycetes dengan menghambat atau menghilangkan mikroorganisme yang tidak diinginkan.

Isolasi semua suspensi sampel dengan metode *pour plate* pada media *Starch-Casein Agar* dan *Raffinose Histidine Agar* serta ditambahkan nistatin. Penambahan nistatin digunakan untuk meminimalkan kontaminasi oleh jamur (Ambarwati *et al.*, 2012; da Silva *et al.*, 2011; Kamna *et al.*, 2009; Labeda, 1990 & Oskay, 2004). Hasil isolasi rizosfer padi berupa koloni.

Menurut Goodfellow & Williams (1986), media *Starch-Casein Agar* merupakan media selektif untuk pertumbuhan Actinomycetes dengan populasi terbesar adalah *Streptomyces albidoflavus* sehingga pada media ini belum dapat menggambarkan keanekaragaman dari Actinomycetes. Sedangkan, pada media *Raffinose Histidine Agar* yang memiliki sumber karbon dan nitrogen dapat mengurangi jumlah pertumbuhan *Streptomyces albidoflavus*.

Secara teoritis menurut Goodfellow & Williams (1986) jumlah koloni pada media *Raffinose Histidine Agar* lebih sedikit dibandingkan jumlah koloni pada media *Starch-Casein Agar*. Namun, pada penelitian ini didapat hasil yang berbeda isolasi pada media *Starch-Casein Agar* diperoleh koloni sebanyak 981.410 koloni/gram, sedangkan pada media *Raffinose Histidine Agar* diperoleh koloni sebanyak 1.870.724 koloni/gram. Hal ini disebabkan karena koloni pada media *Starch-Casein Agar* terlalu banyak dan ukurannya relatif kecil sehingga sulit melakukan perhitungan dengan *colony counter*.

Berdasarkan hasil isolasi pada media *Starch-Casein Agar* dan media *Raffinose Histidine Agar* didapat 60 isolat yang diduga Actinomycetes., koloni yang memiliki penampakan berbeda perlu dipurifikasi agar diperoleh isolat murni Actinomycetes. Isolat yang dihasilkan tersebut dipurifikasi dengan media *Starch-Casein Agar*. Hasil purifikasi pada media *Starch-Casein Agar* diperoleh pertumbuhan sebanyak 39 isolat, 7 isolat dari media *Starch-Casein Agar* dan 32 isolat dari media *Raffinose Histidine Agar*.

Koloni Actinomycetes memerlukan waktu yang lama untuk tumbuh (2 minggu) dan tumbuh melekat pada permukaan media serta dapat memproduksi spora seperti serbuk. Menurut Krieg & Holt (1994) *cit* Susilowati (2007) menyatakan bahwa salah satu ciri khas Actinomycetes adalah mempunyai koloni yang diselimuti oleh miselium udara dan memiliki hifa yang dikelilingi selubung hidrofobik dari permukaan koloni ke udara bebas. Actinomycetes mempunyai warna koloni yang berbeda-beda karena adanya perbedaan kandungan pigmen dari tiap sel penyusunnya

Colour Grouping-Identifikasi Actinomycetes dapat dilakukan dengan cara pengamatan *colour grouping* (Tabel 2). *Colour grouping* dilakukan pada media *Oatmeal Agar* media khusus yang digunakan untuk melihat karakteristik Actinomycetes (Ambarwati *et al.*, 2012; Pathom-aree *et al.*, 2005 & Sembiring *et al.*, 2000). Ambarwati *et al.* (2009) & Zhao *et al.* (2006) menyatakan *colour*

grouping dilakukan guna mengelompokkan isolat berdasarkan warna miselium udara, miselium vegetatif dan warna pigmen yang terbentuk terdifusi pada media atau tidak.

Kelly (1985) *cit* Sembiring *et al.* (2000) menerangkan bahwa dengan penggunaan media *Oatmeal Agar*, hasilnya dapat dilihat secara langsung oleh mata yang meliputi terbentuknya warna miselium udara, miselium vegetatif yang mengalami pigmentasi serta mengetahui warna pigmen yang berdifusi. Nanjwade *et al.* (2010) menyatakan bahwa morfologi dari Actinomycetes yang tumbuh pada media agar dapat digunakan untuk mengidentifikasi karakteristik Actinomycetes, namun informasi tersebut tidak dapat menempatkan sampai pada spesifik genusnya.

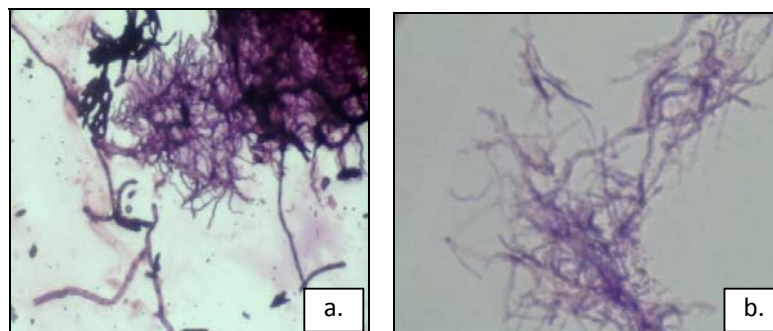
Tabel 2. Hasil Colour Grouping isolat Actinomycetes dari Rizosfer padi (*Oryza sativa* L.)

| Kelompok | Warna miselium udara | Warna miselium vegetatif | Warna pigmen terdifusi | Jumlah isolat | Anggota representatif |
|----------|----------------------|--------------------------|------------------------|---------------|--|
| 1 | Krem | Krem | - | 2 | RPS 35, RPR 54 |
| 2 | Krem | Oranye | - | 1 | RPR 58 |
| 3 | Krem | Kuning muda | - | 3 | RPR 28, RPR 52, RPR 53 |
| 4 | Krem | Putih | - | 1 | RPR 57 |
| 5 | Putih | Putih | - | 9 | RPR 6, RPR 13, RPR 36, RPR38, RPR 39, RPR 42, RPR 45, RPR 47, RPR 60 |
| 6 | Putih | Krem | - | 1 | RPR 25 |
| 7 | Putih | Kuning | - | 1 | RPR 50 |
| 8 | Putih | Coklat | - | 3 | RPR 40, RPR 41, RPR 46 |
| 9 | Putih | Abu-abu | - | 2 | RPR 24, RPR 49 |
| 10 | Kuning | Kuning | - | 3 | RPR 10, RPR 20, RPR 56 |
| 11 | Kuning | Krem | - | 3 | RPR 4, RPR 22, RPR 29 |
| 12 | Abu-abu | Putih keabuan | - | 2 | RPR 2, RPR 26 |
| 13 | Abu-abu | Orange | - | 1 | RPR 19 |
| 14 | Merah muda | Merah muda | - | 2 | RPR 3, RPR 15 |
| 15 | Coklat | Hijau | - | 1 | RPR 27 |
| 16 | Kuning kecoklatan | Coklat | - | 1 | RPR 8 |
| 17 | Kuning keputihan | Kuning | - | 3 | RPR 1, RPR 9, RPR 34 |

Berdasarkan hasil pengamatan *colour grouping*, diperoleh sebanyak 17 kelompok yang masing-masing memiliki penampakan warna yang berbeda-beda mulai dari miselium udara dan miselium vegetatif namun tidak terbentuk warna pigmen yang terdifusi pada media agar. Masing-masing memiliki peran biologis yang berbeda. Miselium vegetatif menyerap nutrisi dari media padat dan setelah

nutrisi dari media kultur menjadi terbatas maka miselium udara berkembang dari permukaan miselium vegetatif.

Pewarnaan Gram-Selain pengamatan *colour grouping*, Actinomycetes dapat diidentifikasi dengan pewarnaan Gram. Berdasarkan Goodfellow & Williams (1986) Actinomycetes adalah Gram positif yang mempunyai hifa bercabang yang sering berkembang menjadi miselium dan mempunyai berbentuk batang. Pewarnaan Gram merupakan identifikasi morfologi secara mikroskopis untuk menentukan bentuk sel dan tipe gram (Sari, 2011). Penelitian Arifuzzaman *et al.* (2010) mengamati hasil pewarnaan Gram isolat Actinomycetes dengan minyak imersi (1000X, Olympus), karena Actinomycetes mempunyai koloni yang sangat kecil. Hasil menunjukkan bahwa kedua isolat yaitu RPR 8 dan RPR 42 termasuk Gram positif (Gambar 2). Pratiwi (2008) menjelaskan mengenai struktur sel bakteri, dinding sel bakteri Gram positif mengandung lapisan peptidoglikan yang tebal sehingga mampu membentuk struktur yang kaku, serta terdapat asam teikoat yang mengandung alkohol dan fosfat. Maka pada saat terjadi kompleks kristal ungu-iodin yang masuk ke dalam sel bakteri Gram positif tidak dapat tercuci oleh alkohol karena adanya lapisan peptidoglikan yang kokoh pada dinding sel.



Gambar 1. Hasil pewarnaan gram isolat Actinomycetes
a. RPR 8 **b. RPR 42**

Uji isolat Actinomycetes sebagai penghasil antifungi-Menurut Nedialkova & Nedianova (2005) metode agar blok adalah metode pemberian isolat Actinomycetes dalam sumuran dengan bentuk bulat pada media yang telah diinokulasi fungi. Metode ini adalah metode sederhana untuk mengamati ada atau tidaknya pertumbuhan fungi. Selain cepat, metode ini tidak perlu dilakukan

fermentasi pada antifungi yang akan diujikan. Pada metode ini, diasumsikan dengan adanya nutrisi dari media agar maka akan terjadi pertumbuhan dari isolat Actinomycetes dan fungi uji. Media uji yang digunakan adalah media *Potato Dextrose Agar*. Pemakaian *Potato Dextrose Agar* bukan hanya karena media ini umum digunakan untuk pertumbuhan fungi di laboratorium tetapi karena media tersebut tidak memiliki kandungan fosfat yang tinggi (Susithra *et al.*, 2009 & Liu *et al.*, 2002).

Penelitian Helbert (2010) menyimpulkan bahwa dengan metode agar blok, Actinomycetes yang berada di bagian permukaan agar mempunyai kemampuan untuk menghasilkan antifungi sehingga senyawa yang ada dalam Actinomycetes akan dilepaskan ke dalam agar blok. Dengan demikian, antifungi yang ada di dalam media agar blok dapat terdifusi ke media *Potato Dextrose Agar* yang telah diberi biakan fungi uji.

Berdasarkan hasil penelitian ini, didapat 39 isolat Actinomycetes dari rizosfer padi (*Oryza sativa* L.), hanya terdapat 2 isolat yaitu RPR 8 dan RPR 42 yang mempunyai aktivitas sebagai antifungi (Tabel 3) dan penghambatan pertumbuhan pada *Candida albicans* dapat teramati (Gambar 2). Namun, tidak ada satupun isolat yang dapat menghambat pertumbuhan *Aspergillus fumigatus* (Gambar 3). Hal ini dimungkinkan karena perbedaan ketebalan dari media kultur dan isolat Actinomycetes (banyaknya dan besar kecilnya koloni isolat), antara satu isolat dengan isolat yang lain mempunyai aktivitas yang berbeda. Selain itu, morfologi fungi juga dapat mempengaruhi aktivitas antifungi. Pratiwi (2008) menerangkan bahwa *Candida albicans* adalah fungi uniseluler dan tidak berfilamen, sedangkan *Aspergillus fumigatus* merupakan fungi multiseluler yang memiliki banyak filamen dan spora. Sehingga *Candida albicans* yang memiliki struktur lebih sederhana dapat dihambat pertumbuhannya dengan antifungi. Sedangkan *Aspergillus fumigatus* dapat tumbuh dengan baik karena spora *Aspergillus fumigatus* tahan terhadap antifungi yang diberikan. Faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil ada atau tidaknya aktivitas antifungi dimungkinkan karena perbedaan ketebalan Actinomycetes dan homogenitas Actinomycetes.

39 isolat dan adanya aktivitas antifungi dari 2 isolat terhadap *Candida albicans* yaitu isolat RPR 8 dan RPR 42. Sedangkan tidak satupun isolat memiliki aktivitas antifungi terhadap *Aspergillus fumigatus*.

Saran

Perlu dilakukan standarisasi fungsi uji agar diameter zona hambat dapat dihitung dan perlu dilakukan fermentasi pada isolat RPR 8 dan RPR 42 untuk uji bioautografi guna menentukan senyawa aktif antifungi yang dihasilkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

DIKTI selaku penyumbang dana dalam penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- Aly , M. M., Al-Aidroos, B. A. & Alfassi, F. A., 2011, Production of non polyenic antifungal agent from *Streptomyces* sp BM54, isolated from marine shripms, *Crown Journal of Medicine*, 1 (1), 01-08.
- Ambarwati & Gama, T. A., 2009, Isolasi Actinomycetes Dari Tanah Sawah Sebagai Penghasil Antibiotik, *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*, 10 (2), 101-111.
- Ambarwati, Soegihardjo, C. J. & Sembiring, L., 2010, Isolasi dan Identifikasi Streptomycetes dari Rizosfer Jagung (*Zea mays* L.) yang Berpotensi sebagai Penghasil Antibiotika, *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Hayati*, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta.
- Ambarwati, Sembiring L, & Soegihardjo, C. J., 2012, Antibiotic produced by Streptomycetes associated with Rhizosphere of purple nut sedge (*Cyperus rotundus* L.) in Surakarta, Indonesia, *African Journal of Microbiology Research*, 6 (1), 52-56.
- Arifuzzaman, M., Khatun, M. R., & Rahman, H., 2010, Isolation and Screening of Actinomycetes from Sundarbans soil for Antibacterial Activity, *African Journal of Biotechnology*, 9 (29), 4615-4619.
- Budiyanto, K., 2002, *Mikrobiologi Terapan*, Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.
- Da Silva, N. M. V., Pereira, T. M., Filho, S. A. & Matsuura, T., 2011, Taxonomic Characterization and Antimicrobial Activity of Actinomycetes Associated with Foliose Lichens from the Amazonian Ecosystems, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5 (5), 910-918.

- Goodfellow, M. & Williams, E., 1986, New Strategies for the Selective Isolation of Industrially Important Bacteri, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 4.
- Helbert, 2010, Potensi Isolat *Streptomyces* dari Rhizosfer Rumput Teki (*Cyperus rotundus* L.) & Jagung (*Zea mays* L.) Sebagai Penghasil Antifungal, *Skripsi*, Fakultas Farmasi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Kar, A., 2008, *Pharmaceutical Microbiology*, New Delhi, New Age International Publishers.
- Khamna, S., Yokota, A., & Lumyong, S., 2008, Actinomycetes Isolated from Medicinal Plant Rhizosphere Soils: Diversity and Screening of Antifungal Compounds, indole-3-acetic acid and siderophore Production, *World Microbiology Biotechnology*, 25, 649-655.
- Khamna, S., Yokota, A., & Lumyong, S., 2009, Antifungal Activity of *Streptomyces* spp. Isolated from Rhizosphere of Thai medicinal plant, *International Journal of Integrative Biology*, 6 (3), 143 – 147.
- Labeda, D. P., 1990, Isolation of Actinomycetes for Biotechnology Application, *Isolation of Biotechnological Organism from Nature*, New York, McGraw-Hill Publishing Company.
- Liu, Y., Tortora, G., Ryan, M. E., Lee, H – M., & Golub, L. M., 2002, Potato Dextrose Agar Antifungal Susceptibility testing for Yeasts and Molds: Evaluation of Phosphate Effect on Antifungal Activity of CMT – 3, *Antimicrobial Agent & Chemotherapy*, 46 (5), 1455 – 1461.
- Mirza, S. A., Phelan, M., Rimland, D., Graviss, E., Hamill, R., Brandt, M. E., *et al*, 2003, The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, *Clinical Infection Diseases*, 36, 789-794.
- Nedialkova, D. & Naidenova, M., 2005, Screening the Antimicrobial Activity of Actinomycetes Strains Isolated from Antarctica, *Journal of Culture Collection*, 4, 29-35.
- Nurkanto, A., Listyaningsih, F., Julistiono., & Agusta, A., 2010, Eksplorasi Keanekaragaman Aktinomycetes Tanah Ternate Sebagai Sumber Antibiotik, *Jurnal Biologi Indonesia*, 6 (3), 325-339.
- Oskay, M., 2009, Antifungal & antibacterial compounds from *Streptomyces* strains, *African Journal of Biotechnology*, 8 (13), 3007-3017.

- Pathom-aree, W., Stach, J. E. M., Ward, A. C., Horikoshi, K., Bull, A. T. & Goodfellow, M., 2006, Diversity of Actinomycetes isolated from Challenger Deep Sediment (10,898 m) from Mariana Trench, *Extremophiles*, 10, 181-189.
- Pelczar, M. J. & Chan, E. C. S., 2007, *Dasar - dasar Mikrobiologi*, Jilid 1, diterjemahkan oleh Hadioetomo, R.S., Imas, T., Tjitrosomo, S. S. & Angka, S. L., Jakarta, Universitas Indonesia Press.
- Pratiwi, S. T., 2008, *Mikrobiologi Farmasi*, Jakarta, Penerbit Erlangga.
- Rao S., 1994, *Mikrobiologi Tanah*, Malang, UMM Press.
- Sari, D. W., 2011, Ekstraksi Antijamur dari Isolat actinomycetes dan Jamur serta Penghambatannya terhadap Jamur Fitopatogen Tanaman Kopi *Rosselinia bunodes* dan *Phellinus lamaoensis*, *Tesis*, Fakultas Teknologi Hasil Pertanian Pasca Sarjana Universitas Brawijaya.
- Sembiring, L., Ward, A. C. & Goodfellow, M., 2000, Selective Isolation and Characterisation of Members of the *Streptomyces violaceusniger* clade associated with the roots of *Paraserianthes falcataria*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 353-366.
- Susilowati, D., N., Hastuti, R., D., & Yuniarti, E., 2007, Isolasi dan Karakterisasi Aktinomisetes Penghasil Antibakteri Enteropatogen *Escherchia coli* K1.1, *Pseudomonas pseudomallei* 02 05, dan *Listeria monocytogenes* 5407, *Jurnal AgroBiogen*, 3 (1), 15-23.
- Susithra, M. P., Thenmozhi, M., & Kannabiran, K., 2009, Anticandidal Activity of *Streptomyces Paraguyensis* Isolated from Marine Sediment Samples Collected at the Puducherry Coast, Bay of Bengal, India, *Pharmacologyonline*, 2, 527 – 537.
- Waluyo, L., 2009, *Mikrobiologi Lingkungan*, Malang, UMM Press.
- Zenova, G. M., Manucharova, N. A., & Zvyagintsev, D. G., 2011, Extremophilic and Extremotolerant Actinomycetes in Different Soil Types, *Eurasian Soil Science*, April, Vol 44(4), <http://link.springer.com/article/10.1134%2FS1064229311040132?LI=true> (diakses tanggal 25 November 2012).
- Zhao, H., Parry, R. L., Ellis, D. L., Griffith, G. W. & Goodacre, R., 2006, The rapid differentiation of *Streptomyces* isolate using Fourier transform infrared spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 40, 213-218.