

**ISOLASI DAN PENENTUAN AKTIVITAS ANTIMIKROBIA  
ISOLAT *Streptomyces* TERHADAP  
*Staphylococcus aureus* SERTA UJI BIOAUTOGRAFI**

**SKRIPSI**



**Oleh:**

**ARIN YUARI  
K. 100 050 101**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA  
SURAKARTA  
2009**

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Penyakit akibat infeksi merupakan salah satu masalah dalam bidang kesehatan yang terus berkembang. Masalah penyakit akibat infeksi ini terutama terjadi di negara berkembang dimana tingkat pengetahuan dan kesadaran pentingnya kesehatan masih rendah (Gibson, 1996). Sebagian besar penyakit infeksi di Indonesia disebabkan oleh bakteri. Pertumbuhan dan reproduksi bakteri relatif cepat, yaitu antara 20 menit sampai 15 jam secara eksponensial (Anonim, 1993).

*Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri penyebab infeksi. Dalam keadaan normal *S. aureus* terdapat di saluran pernapasan atas, kulit, saluran cerna, dan vagina. Infeksi kulit *S. aureus* termasuk penyakit infeksi yang paling sering, misalnya lebih dari 1,5 juta kasus furunkulosis terjadi di Amerika Serikat setiap tahunnya (Shulman dkk., 1994).

Salah satu upaya untuk meningkatkan kesejahteraan dan kesehatan masyarakat yaitu dengan mengendalikan populasi bakteri yang dapat menimbulkan infeksi atau gangguan kesehatan dengan menggunakan antibiotik. Penggunaan antibiotik untuk mengatasi penyakit infeksi di Indonesia mencapai 90%. Untuk mengimpor bahan baku antibiotik, pemerintah Indonesia harus mengeluarkan dana antara Rp 18,6–Rp 122,4 milyar (Akmal, 1996). Harga salah satu produk antibiotik mencapai Rp 22.000,00 per kaplet (Santini, 2008).

Pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri yang banyak terjadi, memerlukan eksplorasi galur-galur mikroba baru yang dapat menghasilkan antibiotik dengan potensi yang lebih tinggi dalam mematikan bakteri penyebab infeksi seperti

*Streptomyces*. Sampai akhir tahun 1974 kurang lebih 95% antibiotik dihasilkan oleh *Actinomycetes* yang berasal dari genus *Streptomyces*, misalnya streptomisin, tetrasiklin dan kloramfenikol (Goodfellow *et al.*, 1988 dalam Hasim 2003).

Oktalia (2009), telah melakukan isolasi dan skrining primer *Streptomyces* dari tanah rizosfer Familia Poaceae *Imperata cylindrica* L, *Pennisetum purpureum* Schumach dan *Digitaria microbachne* (Presl.) Henr. Hasil penelitian tersebut, mendapatkan 8 isolat *Streptomyces* murni. Masing-masing isolat diujikan pada *S. aureus* dan diketahui terdapat 2 isolat yang berpotensi sebagai antimikrobia terhadap *S. aureus*, yaitu isolat dengan kode strain AL<sub>SK</sub> 5 yang berpotensi kuat (zona radikal 20 mm) dan KB<sub>SK</sub> 11 berpotensi sangat kuat (zona radikal 25 mm) terhadap bakteri gram positif *S. aureus*. Isolat *Streptomyces* AL<sub>SK</sub> 5 diperoleh dari rizosfer rumput alang-alang di daerah Sukoharjo, sedangkan KB<sub>SK</sub> 11 diperoleh dari rizosfer rumput kembangan di daerah Sukoharjo.

Dari hasil tersebut maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi dan penentuan aktivitas antimikrobia dari isolat *Streptomyces* yang telah diperoleh dan uji bioautografinya. Hal ini bertujuan untuk mengetahui senyawa yang mempunyai potensi yang lebih tinggi dalam mematikan penyebab penyakit yang mungkin terkandung dalam isolat *Streptomyces* tersebut.

## **B. Perumusan Masalah**

Dengan dasar dan pertimbangan di atas maka dapat dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimana aktivitas senyawa antimikrobia hasil ekstraksi dari isolat *Streptomyces* dengan kode strain KB<sub>SK</sub> 11 dan AL<sub>SK</sub> 5 terhadap *S. aureus* ?

2. Berapa Kadar Bunuh Minimum (KBM) senyawa antimikrobia hasil ekstraksi dari isolat *Streptomyces* dengan kode strain KB<sub>SK</sub> 11 dan AL<sub>SK</sub> 5 terhadap *S. aureus* ?
3. Bercak manakah yang mempunyai aktivitas antimikrobia terhadap *S. aureus*?

### **C. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui aktivitas senyawa antimikrobia hasil ekstraksi dari isolat *Streptomyces* dengan kode strain KB<sub>SK</sub> 11 dan AL<sub>SK</sub> 5 terhadap *S. aureus*.
2. Mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM) senyawa antimikrobia hasil ekstraksi dari isolat *Streptomyces* dengan kode strain KB<sub>SK</sub> 11 dan AL<sub>SK</sub> 5 terhadap *S. aureus*.
3. Mengetahui bercak manakah yang mempunyai aktivitas antimikrobia terhadap *S. aureus*.

### **D. Tinjauan Pustaka**

#### **1. Populasi Mikroorganisme pada Rizosfer**

Rizosfer merupakan daerah pertemuan antara akar dan tanah. Populasi bakteri, jamur, virus, dan *Actinomycetes* lebih banyak terdapat dalam tanah yang termasuk rizosfer daripada tanah non rizosfer. Pertumbuhan populasinya diaktivasi oleh bahan nutrisi yang dilepaskan oleh jaringan tanaman seperti asam amino, vitamin dan zat hara lainnya. Populasi mikroorganisme dalam tanah dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu jumlah dan macam hara, kelembaban, tingkat aerasi, suhu, pH dan pemupukan. Pertumbuhan mikroorganisme pada pH optimal antara 6,5 – 8,0 dan pada suhu optimal antara 25–30<sup>0</sup> C (Rao, 1994).

Tanah pertanian yang subur mengandung 2.500.000 bakteri, 700.000 *Actinomycetes*, 400.000 jamur, 50.000 algae dan 30.000 protozoa per gram tanah. Pada tanah yang kering dan panas atau hangat banyak ditemukan *Actinomycetes* (Budiyanto dan Krisno, 2002). *Actinomycetes* adalah bakteri Gram positif, filamentus, membentuk spora, dan mempunyai kandungan G + C tinggi, yaitu 57-75% (Kuster and Williams, 1964). Di dalam tanah hidup sekitar 100 genus *Actinomycetes*. Ordo Actinomycetales dikelompokkan menjadi 4 familia, yaitu Mycobacteriaceae, Actinomycetaceae, Atreptomycetaceae dan Actinoplanaceae. Genus yang paling banyak dijumpai dari *Actinomycetes* adalah *Streptomyces* (20%), kemudian secara berturut-turut genus *Nocardia* dan *Mikromonospora* (Rao, 1994).

## 2. Tinjauan Khusus *Streptomyces* dan Taksonomi

Klasifikasi *Streptomyces* adalah sebagai berikut:

Divisi : Bacteria

Kelas : Actinobacteria

Bangsa : Actinomycetales

Suku : Streptomycetaceae

Marga : *Streptomyces*

(Anonim, 2008<sup>b</sup>)

Karakter *Streptomyces* yang penting untuk klasifikasi berdasarkan morfologi dan reaksi biokimianya adalah:

- a. Morfologi, meliputi struktur miselium substrat, pembentukan miselium aerial, struktur dan percabangan sporofor, ukuran dan bentuk spora dan ornamen spora.
- b. Kultur, meliputi pertumbuhan pada berbagai media, warna miselium substrat dan aerial, pembentukan pigmen.

- c. Biokomia, meliputi penggunaan sumber karbon, aktivitas diastatik, kemampuan proteolitik (diukur dari pencairan gelatin, serum tanah, casein dan koagulasi serta peptonisasi susu), penggunaan senyawa N, pembentukan oksidase (tirosinase dan laktase) dan reduktase (reduksi nitrat, reduksi sulfat)
- d. Sensitivitas terhadap antibiotik dan terhadap faga
- e. Reaksi serologi
- f. Komposisi kimia

*Streptomyces* mempunyai kemampuan memproduksi senyawa antimikrobia yang bermanfaat, seperti streptomisin dihasilkan dari *Streptomyces griseus* untuk menyembuhkan tuberkulosis yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces violaceusniger* (Sembiring *et al.*, 2000) berperan antagonistik terhadap beberapa fungi patogen tanaman (Trejo *et al.*, 1998; Al Tai *et al.*, 1999). Selain itu *Streptomyces* isolat rizosfer menunjukkan penghambatan terhadap jamur patogen (Upton, 1994; Atalan *et al.*, 2000). Sampai akhir tahun 1974 kurang lebih 95%, antibiotik dihasilkan *Actinomycetes* berasal dari genus *Streptomyces*, misalnya streptomisin, tetrasiklin dan kloramfenikol (Goodfellow *et al.*, 1988 dalam Hasim 2003).

### **3. Tumbuhan Tingkat Tinggi**

#### **a. Alang-alang (*Imperata cylindrica* L)**

Tumbuhan dari Familia Poaceae ini memiliki nama ilmiah *Imperata cylindrica* L. Di beberapa daerah di Indonesia dikenal dengan nama ilalang atau jukur uerih. Alang-alang tumbuh liar di lahan terbuka atau sedikit terlindung, seperti ladang atau perkebunan. Tempat tumbuhnya dari 1-2700 meter di atas permukaan laut.

Bagian yang digunakan sebagai obat adalah akarnya. Alang-alang mengandung kersik dan damar (Moenandir, 1993).



**Gambar 1. Rumput Alang-alang (*Imperata cylindrica* L)**

**b. Rumput Gajah (*Pennisetum purpureum* Schumach)**

Rumput gajah berasal dari Afrika tropik dan hidup selama beberapa musim, berumpun banyak dan mempunyai akar rimpang yang menjalar. Tinggi buluhnya dapat mencapai 3 m lebih. Rumput gajah ditemukan tumbuh liar pada hutan-hutan sekunder, ladang atau sepanjang tepi kali. Tumbuhannya sering bergerombol, tinggi tempat dari permukaan laut yaitu dari mulai sekitar pantai sampai pada ketinggian 1.500 m. Perwakannya hampir serupa dengan budidaya, hanya lebih pendek dan daunnya juga lebih sempit. Varietas ini lebih tahan terhadap kekeringan jika dibandingkan dengan rumput gajah budidaya (Sastrapradja dan Afriastini, 1980).



**Gambar 2. Rumput Gajah (*Pennisetum purpureum* Schumach)**

**c. Rumput Kembangan (*Digitaria microbachne* (Presl.) Henr)**

Rumput kembangan banyak terdapat di areal persawahan yang tanaman padinya sudah dipanen atau diantara tanaman palawija dan kebun. Rumput ini tumbuh di tanah kering berpasir. Di tempat-tempat terlindung rumput kembangan sukar tumbuh, sehingga sukar sekali ditemui. Hidupnya bercampur dengan jenis rerumputan lain atau terna yang tingginya hampir sebanding. Rumput kembangan buluhnya lemah dan jumlahnya sedikit, sehingga tidak membentuk rumpun yang tumbuhnya tegak. Tinggi masing-masing buluhnya sampai 75 cm. Perbanyakkan rumput kembangan melalui biji yang tersimpan dalam buliran dan bagian buluhnya (Sastrapradja dan Afriastini, 1980).



**Gambar 3. Rumput Kembangan (*Digitaria microbachne* (Presl.) Henr)**

**4. Antibiotik**

Antibiotik adalah senyawa yang dalam konsentrasi tertentu mampu menghambat bahkan membunuh proses kehidupan suatu mikroorganisme (Jawetz *et al.*, 1986; Zahner dan Mass, 1972; Atlas dan Bartha, 1993). Antibiotik berbeda dalam sifat fisika kimia, farmakologi, spektrum antibakteri atau mekanisme kegiatannya (Siwandi, 1992).



Faktor-faktor yang mempengaruhi penghambatan mikroorganisme oleh antibiotik adalah kepadatan populasi mikroorganisme, kepekaan terhadap bahan antimikrobia, lamanya bahan antimikrobia diaplikasikan pada mikroorganisme, konsentrasi bahan antimikrobia, suhu dan kandungan bahan organik (Lay, 1994). Antibiotik mengganggu bagian-bagian yang peka di dalam dinding sel.

Mekanisme kerja dari antibiotik adalah sebagai berikut:

a. Merusak dinding sel

Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukan atau mengubahnya. Contoh: penisilin.

b. Perubahan permeabilitas sel

Kerusakan pada membran sitoplasma akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel. Contoh: polimiksin.

c. Perubahan molekul protein dan asam nukleat

Hidupnya suatu sel bergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiah. Terjadinya denaturasi protein dan asam nukleat oleh suhu tinggi dan konsentrasi pekat beberapa zat kimia dapat merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali. Contoh: fenolat dan persenyawaan fenolat.

d. Penghambatan kerja enzim

Penghambatan pada kerja enzim dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme atau matinya sel. Contoh: sulfonamid

e. Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein

Gangguan DNA, RNA dan protein dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel. Contoh: tetrasiklin (Pelczar, 1988).

## 5. *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi *S. aureus* adalah sebagai berikut:

Divisi : Protozoa

Kelas : Schizomycetes

Bangsa: Eubacteriales

Suku : Micrococcaceae

Marga : Staphylococcus

Jenis : *Staphylococcus aureus*

(Anonim, 2000)

*S. aureus* dapat menimbulkan infeksi pada setiap jaringan atau alat tubuh manusia dan menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda yang khas, yaitu peradangan, nekrosis dan pembentukan abses. *S. aureus* dapat menyebabkan penyakit bisul, postula, pemfigus neonatorum, hordeolum, mastitis, pneumonia, karbunkel, infeksi luka dan luka bakar, osteomielitis akut, abses perinefrik, keracunan makanan, dan enteritis (Gibson, 1996).

*S. aureus* berbentuk sferis, bila menggerombol dalam susunan yang tidak teratur, mungkin sisinya agak rata karena tertekan. Diameter *S. aureus* antara 0,8 - 1,0 mikro. Bakteri ini tidak bergerak, tidak berspora dan Gram positif (Warsa, 1994).

Diantara semua bakteri yang tidak membentuk spora, *S. aureus* termasuk jenis bakteri yang paling kuat daya tahannya. Pada MH agar miring dapat tetap hidup sampai berbulan-bulan, baik dalam lemari es maupun pada suhu kamar. Dalam keadaan kering pada benang, kertas, kain dan dalam nanah dapat tetap selama 6-14 minggu (Jawetz *et al.*, 1991).

*S. aureus* menghasilkan 3 macam metabolit, yaitu metabolit yang bersifat nontoksin, eksotoksin, dan enterotoksin. Metabolit nontoksin terdiri dari antigen permukaan, koagulasi, hialuronidase, fibrinolisin, gelatinase, protease, lipase, tributrinase, fosfatase dan katalase. Metabolit eksotoksin terdiri dari alfa hemolisin, beta hemolisin, delta hemolisin, leukosidin, sitotoksin dan toksin eskfoliatif. Metabolit enterotoksin dibuat jika bakteri ditanam dalam perbenihan semisolid dengan konsentrasi CO<sub>2</sub> 3%. Toksin ini terdiri dari protein yang bersifat nonhemolitik, nonparalitik, termostabil, dalam air mendidih tahan selama 30 menit dan tahan terhadap pepsin dan tripsin menyebabkan keracunan makanan, antara 2-6 jam dengan gejala yang timbul secara mendadak, seperti mual, muntah-muntah dan diare (Jawetz *et al.*, 1991).

## **6. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan dan uji senyawa kimia secara kualitatif dan kuantitatif. Senyawa yang diuji dapat berupa senyawa tunggal maupun campuran dari produk pabrik, hasil sintesis, isolasi dari hewan percobaan, tanaman maupun mikroorganisme.

Kromatografi lapis tipis dikenal istilah fase diam dan fase gerak.

### **a. Fase diam**

Fase diam adalah suatu lapisan yang dibuat dari bahan-bahan berbutir-butir halus yang ditempatkan pada lempengan. Sifat-sifat umum dari penyerap KLT adalah ukuran partikel dan homogenitasnya. Ukuran partikel yang biasa digunakan adalah 1-25 mikron. Adapun macam-macam fase diam adalah silika gel, alumina, selulosa, resin, kieselguhrs, magnesium silikat (Sastrohamidjojo, 2002).

## b. Fase gerak

Fase gerak adalah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Fase ini bergerak di dalam fase diam karena adanya gaya kapiler. Macam-macam fase gerak antara lain heksana, toluen, eter, kloroform, aseton, etil asetat, asetonitril, etanol, metanol air (Sastrohamidjojo, 2002).

Dalam KLT dilakukan tahapan pengembangan atau elusi (Sastrohamidjojo, 2002). Pengembangan ialah proses pemisahan campuran cuplikan akibat pelarut pengembang merambat naik dalam lapisan fase diam. Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan  $R_f$  atau  $h R_f$ . Harga  $R_f$  antara 0-1. Berdasarkan parameter tersebut KLT dapat digunakan untuk perhitungan kualitatif dalam pengujian sampel (Sumarno, 2001).

$$R_f = \frac{\text{Jarak migrasi komponen}}{\text{Jarak migrasi fase gerak}}$$

(Mulja dan Suharman, 1995)

## 7. Uji Bioautografi

Bioautografi dibagi menjadi dua metode, yaitu:

### a. Bioautografi Langsung

Bioautografi langsung dilakukan dengan cara menyemprotkan *plate* KLT dengan suspensi bakteri atau dengan menyentuhkan *plate* KLT pada permukaan media agar. Setelah inkubasi selama waktu tertentu maka letak zat aktif antimikrobia ditandai dengan adanya zona jernih dengan latar belakang jernih.

### b. Bioautografi *Overlay*

Bioautografi *overlay* dilakukan dengan cara menuangkan media agar bakteri di atas permukaan *plate* KLT. Media pada permukaan *plate* KLT ditunggu sampai

padat, kemudian diinkubasi. Penampakan zona hambatan dilakukan dengan penyemprotan menggunakan larutan tetrazolium klorida, maka letak zat aktif antimikrobia ditandai dengan adanya zona jernih dengan latar belakang ungu (Rehalison, 1994).

### **E. Landasan Teori**

Okalia (2009), telah dilakukan isolasi dan skrining primer *Streptomyces* dari tanah rizosfer Familia Poaceae *Imperata cylindrica* L, *Pennisetum purpureum* Schumach dan *Digitaria microbachne* (Presl.) Henr. Hasil penelitian tersebut, mendapatkan 8 isolat *Streptomyces* murni. Diketahui ada 2 isolat yang berpotensi sebagai antimikrobia terhadap *S. aureus*, yaitu isolat dengan kode strain AL<sub>SK</sub> 5 yang berpotensi kuat (zona radikal 20 mm) dan KB<sub>SK</sub> 11 berpotensi sangat kuat (zona radikal 25 mm) terhadap bakteri gram positif *S. aureus*.

### **F. Hipotesis**

Senyawa hasil ekstraksi dari isolat *Streptomyces* yang diperoleh dari tanah rizosfer Familia Poaceae *Imperata cylindrica* L, *Pennisetum purpureum* Schumach dan *Digitaria microbachne* (Presl.) Henr. mempunyai aktivitas sebagai antibiotik terhadap *S. aureus*.