

# SKRINING DAN KARAKTERISASI PARSIAL SENYAWA ANTIFUNGI DARI ACTINOMYCETES ASAL LIMBAH PADAT SAGU TERDEKOMPOSISI

Alimuddin Ali

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Makassar  
(Jl. Dg Tata Raya, Parang Tambung, Makassar Sulawesi Selatan)  
(E-mail: muddin\_wbk02@yahoo.com)

## ABSTRACT

*Actinomycetes are one of the most attractive sources of antibiotics and other biologically active substances of high commercial value. Actinomycetes have proved to be capable of biosynthesizing secondary metabolites bearing conspicuous structural diversity, which could be further enlarged by structure modification. The objective of this work was to isolate and characterize of actinomycetes were responsibility to biosynthesis of a compound as antifungal agent and parsial identifying of these substances based on TLC-bioautography. The study was done by some steps activities i.e: Isolation of actinomycete, antifungal assay, extraction and examination of MIC and TLC-bioautography using fungal test. The result of these research revealed that a genera **Streptomyces** spp has majority of actinomycetes was obtained from sources of microbia (decomposing sagoo solid waste). Isolate AS0827 has two a different spots which as antifungal activity based on  $R_f$  values. MIC of antifungal substances was obtained from the actinomycetes about 200  $\mu\text{g/mL}$ . The genera was shown highest of inhibition zone from of all the genera was named isolate AS0827.*

**Key words:** *Actinomycetes, Antifungal activity, TLC-Bioautography, Decomposing sagoo waste*

## PENGANTAR

Actinomycetes merupakan salah satu sumber metabolit bioaktif yang sangat menarik karena mampu mensintesis metabolit sekunder seperti enzim, herbisida, pestisida dan antimikrobia (Parunago *et al.*, 2007). Meski laju penemuan senyawa baru cenderung menurun akibat kajian secara ekstensif pada kelompok Actinomycetes, namun penemuan spesies-spesies baru justru berpotensi besar ditemukan pula metabolit baru (Suzuki *et al.*, 2000). Sejarah penemuan obat-obatan baru menunjukkan adanya fakta bahwa dalam banyak kasus, rangka molekul baru justru ditemukan berasal dari golongan actinomycetes (Badji *et al.*, 2006; Lemriss *et al.*, 2003). Barrakate *et al.* (2002) menyatakan bahwa diperkirakan dua pertiga senyawa antibiotika telah diisolasi dari mikrobia ini sehingga perlu upaya untuk terus dilakukan skrining senyawa bioaktif baru dari kelompok mikrobia tersebut. Mikami *et al.* (2000) menyatakan bahwa senyawa antimikrobia dari actinomycetes tidak hanya dihasilkan oleh golongan yang nonpatogen tetapi juga dihasilkan oleh actinomycetes patogen oportunistik.

Actinomycetes tersebar luas di lingkungan dan memegang peranan penting dalam proses siklus karbon karena kemampuannya tumbuh pada konsentrasi senyawa berkarbon rendah (Rifaat, 2003). Actinomycetes memiliki habitat yang cukup luas antara lain ditemukan pada tanah, kompos, padang rumput, tanah hutan, sedimen, lumpur

(Augustine *et al.*, 2006; Lee dan Hwang, 2002; Xu *et al.*, 1996; Badji *et al.*, 2006)); pada daerah perakaran tanaman (Nishimura *et al.*, 2002); atau di perairan laut (Takizawa *et al.*, 1993).

Limbah padat sagu merupakan salah satu sumber mikrobia yang cukup potensial karena kandungan nutrisi yang cukup tinggi menjadikan limbah sagu (khususnya yang telah terdekomposisi) menjadi habitat tumbuh beragam mikrobia termasuk Actinomycetes (Ali, 2006).

Dalam penelitian ini diperoleh beberapa actinomycetes yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan fungi uji baik dari kelompok uniseluler maupun multiseluler. Identifikasi parsial berdasarkan karakter morfologi menunjukkan bahwa actinomycetes tersebut didominasi oleh genus *Streptomyces*

## BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan penelitian berupa ampas sagu terdekomposisi yang diambil di beberapa lokasi pengolahan sagu di Padang Sappa Kabupaten Luwu Selatan, provinsi Sulawesi Selatan. Sebanyak 200 gram ampas sagu diambil dengan menggunakan sendok yang telah disterilkan terlebih dahulu. Sampel dimasukkan ke dalam kantong plastik dan dimasukkan ke dalam box sampel. Sampel yang telah diambil di 5 (lima) lokasi kemudian digabungkan menjadi satu.

### Isolasi Actinomycetes

Sebanyak 10 g limbah padat sagu yang telah terdekomposisi dimasukkan ke dalam 90 mL aquades steril lalu dikocok selama 1 jam lalu dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 70° C selama 1 jam, kemudian dibiarkan sampai partikel limbah pada sagu mengendap. Sebanyak 1 mL dari suspensi limbah padat sagu (pengenceran 10<sup>-1</sup>) tersebut dipindahkan ke dalam 9 mL aquades steril, lalu dibuat deretan pengenceran sampai 10<sup>-4</sup>. Sebanyak 0,1 mL dari pengenceran tersebut disebarkan ke dalam medium *Starch Nitrate Agar* (20 g *soluble starch*, 0,5 g NaCl, 1 g KNO<sub>3</sub>, 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,01 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 20 g agar, 1000 mL akuades (pH 7,2–7,4). Selanjutnya cawan diinkubasi pada suhu 30° C selama 2–4 minggu, dan koloni yang menunjukkan actinomycetes dilakukan isolasi ulang untuk mendapatkan koloni tunggal. Koloni yang telah murni selanjutnya diinokulasikan ke dalam media SNA miring untuk digunakan pada penelitian selanjutnya.

### Karakterisasi Actinomycetes

Actinomycetes yang menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap fungi uji dikarakterisasi secara morfologi dan biokimiawi. Secara morfologi dengan pengamatan menggunakan metode *culture slide* (Kawato dan Sinobu, 1979; Shirling dan Gottlieb, 1966; Nishimura *et al.*, 2002) yaitu pengamatan terhadap warna miselium udara, pigmen melanoid, reverse side pigmen terlarut, morfologi rantai spora dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000×. Pengujian biokimiawi dari actinomycetes yang ditemukan dilakukan berdasarkan karakteristik penggunaan sumber C, suhu, pH dan NaCl.

### Uji Pertumbuhan Mikrobial pada Beberapa Media

Untuk menguji kemampuan optimal memproduksi senyawa antifungi, maka isolat terpilih ditumbuhkan ke dalam media antara lain ISP2, ISP4, SNB dan SSB (*Soluble Starch Broth*). pH setiap medium diatur menjadi ± 7,2 sebelum dilakukan sterilisasi. Setiap labu fermentasi diinokulasikan dengan 10 mL ke dalam 100 mL medium produksi, dan diinkubasi pada suhu 28° C selama 8 hari pada shaker berkecepatan 150 rpm. Sebanyak 1 mL cairan fermentasi diambil dan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Sebanyak 20 µL supernatan diteteskan pada kertas cakram (6 mm) dalam media yang telah diinokulasi mikrobial uji. Diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30° C dan diamati diameter zona hambatan yang terbentuk.

### Fermentasi, Ekstraksi dan Uji Aktivitas Antifungi

Isolat terpilih dibuat prekulturan pada labu Erlenmeyer 250 mL yang mengandung 50 mL medium cair SNA dan diinkubasi pada suhu 28° C selama 4 hari. Prekultur (*starter*) dipindahkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL yang mengandung 100 mL medium *Soluble Starch Broth* (Pati terlarut 10 g, gliserol 10g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3g, Yeast Extract 2 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1g, Aquades 1 L). Fermentasi dilakukan pada suhu 28° C selama 8 hari pada kondisi teragitasi pada laju penggojokan 150 rpm. Setelah fermentasi selama 8 hari, media pertumbuhan mikrobial disaring untuk memisahkan biomassa dan cairan fermentasi. Cairan fermentasi disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh diekstraksi 2 kali dengan pelarut etil asetat (1:1 v/v) dalam corong pisah dan dibiarkan selama 20 menit. Ekstrak yang diperoleh dilarutkan kembali dengan etil asetat dan dikeringkan lalu disimpan pada desikator untuk digunakan pada proses selanjutnya. Biomassa yang diperoleh dicuci dengan aquades 2 kali lalu diekstraksi dengan metanol sebanyak 100 mL. Pelet dan metanol dipisahkan dengan cara penyaringan dan diuapkan sampai diperoleh ekstrak kering. Aktivitas antimikrobial ditentukan dengan metode uji hayati (*bioassay method*) berdasarkan metode Badji *et al.* (2006); dan Pandey *et al.*, (2004) terhadap fungi *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium oxysporum* dan *Aspergillus flavus*.

Ekstrak yang diperoleh (maserat) dilakukan pengujian terhadap semua mikrobial uji dengan cara sebagai berikut: Sebanyak 15 µL maserat yang telah diketahui konsentrasinya dimasukkan ke dalam kertas cakram (diameter 6 mm). Selanjutnya setelah semua pelarut menguap, kertas cakram diletakkan pada permukaan media yang telah diinokulasikan dengan mikrobial uji. Semua cawan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28° C, plate diamati adanya aktivitas antifungi yang ditandai oleh adanya zona hambatan pertumbuhan mikrobial di sekitar kertas cakram.

### Pengujian Konsentrasi Penghambatan Minimum (MIC)

Nilai MIC dari senyawa antifungi ditentukan dengan mengacu pada metode pengenceran berseri (Taechowisan *et al.*, 2005). Hasil purifikasi senyawa bioaktif yang diperoleh selanjutnya diencerkan 2 kali lipat sampai diperoleh pengenceran tertinggi (10 pengenceran terakhir). Masing-masing pengenceran diinokulasikan ke dalam kertas cakram lalu diuji pada semua fungi. Konsentrasi terkecil dari senyawa bioaktif yang menghambat pertumbuhan mikrobial uji dinyatakan sebagai nilai MIC.

## Pengujian KLT Bioautografi

Ekstrak kasar ditotolkan pada lempeng KLT (silica gel plat Merck 60 F<sub>254</sub>) yang dikembangkan dengan campuran kloroform-etilasetat-asam asetat (7:3:1,v/v). Bercak dideteksi secara bioautografi (Pandey *et al.*, 2004) di atas media tumbuh fungi yang ditanami mikrobial. Noda aktif divisualisasikan di bawah sinar UV  $\lambda_{254}$  dan  $\lambda_{365}$  nm.

## Penentuan Nilai R<sub>f</sub> Senyawa Antifungi (KLT-Bioautografi)

Ekstrak etilasetat yang diperoleh selanjutnya dispotkan dengan menggunakan pipa kapiler pada lempeng KLT (*silica gel*) dan dikembangkan dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan fase gerak. Setelah pengembangan selesai, lempeng diambil dan dikeringkan. Komponen-komponen yang terpisah pada lempeng KLT dideteksi dengan lampu UV. Lempeng KLT yang lain dibuat dengan

pola kerja yang sama untuk menentukan nilai R<sub>f</sub> yang memiliki daya hambat secara bioautografi dengan cara menempatkan KLT di atas medium agar yang mengandung *C. albicans*. Adanya zona hambatan di sekitar bercak menunjukkan karakter golongan senyawa antifungi tersebut lalu ditentukan nilai R<sub>f</sub>-nya.

## HASIL

### Isolat Actinomycetes

Hasil isolasi menunjukkan bahwa ada 30 isolat yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan fungi uji. Beberapa isolat mampu menghambat semua fungi uji sedangkan isolat lainnya hanya menghambat sebagian. Hal yang sama ditunjukkan oleh luas zona hambatan antara satu isolat dengan isolat lainnya juga bervariasi, dan isolat dengan kode AS0827 mampu menghambat semua fungi uji

**Tabel 1.** Rata-Rata diameter zona hambatan (antifungi) ekstrak kasar etil asetat dari semua isolat.

No.	Kode Isolat	Diameter Zona Hambatan (mm)			
		<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. flavus</i>	<i>F. oxysporum</i>
1	AS0801	14,78	11,88	16,25	10,75
2	AS0802	15,78	11,38	14,75	11,38
3	AS0803	15,53	11,50	14,538	11,63
4	AS0804	14	11	11,5	7,64
5	AS0806	11,36	10,50	6,88	7,25
6	AS0807	13,35	11,25	10,25	7
7	AS0808	16,78	10	21,50	11,63
8	AS0809	15,80	9,63	11,88	6,75
9	AS0812	15,63	11,50	13	9,63
10	AS0814	19,99	7,63	24,13	15,88
11	AS0815	17,38	11,25	13,75	8,13
12	AS0816	17,25	12,13	22,25	16,5
13	AS0817	17,88	9,13	20,50	16,51
14	AS0818	16,13	10,25	19,25	11,88
15	AS0820	10,25	7	12,25	7
16	AS0822	6,88	6,7	6,75	15,5
17	AS0823	9,50	-	6,50	9,38
18	AS0825	11,25	7,13	8,25	6,88
19	AS0826	11,25	-	7,75	6,75
20	AS0827	18,88	11,90	26,66	22,87
21	AS0833	10,25	-	9,25	-
22	AS0848	-	-	-	-
23	AS0852	10,75	-	-	-
24	AS0853	10,71	-	10,15	9,63
25	AS0878	7,88	-	-	-
26	AS0882	7,75	-	-	-
27	AS084	11,13	-	11,25	9,38
28	AS0885	-	-	-	9,09
29	AS0887	9,07	-	-	-
30	AS0889	8,09	6,88	-	-

Keterangan:

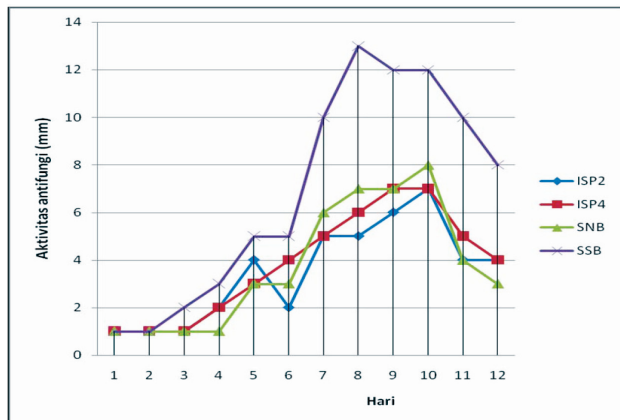
(-) : tidak ada zona hambatan

Diameter < 10 mm : kategori hambatan rendah

Diameter > 10 mm : kategori hambatan sedang

Diameter > 20 mm : kategori hambatan tinggi

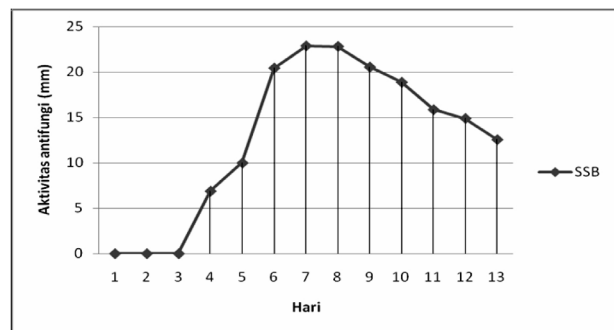
dengan zona hambatan yang tergolong tinggi. Selanjutnya isolat tersebut digunakan pada percobaan selanjutnya dalam karakterisasi parsial senyawa antifungi.



**Gambar 1.** Produksi senyawa antifungi pada beberapa media tumbuh.

Pada Gambar 1 terlihat bahwa isolat terpilih (AS0827) mampu menghasilkan senyawa antifungi pada pengamatan hari ke-8 sampai dengan hari ke-9 dan menurun dengan bertambahnya waktu inkubasi. Media pertumbuhan dan produksi senyawa antifungi yang paling baik adalah media SSB. Media ISP2 merupakan media yang paling kurang optimal di antara semua jenis media yang digunakan untuk produksi senyawa antifungi dari isolat terpilih.

Produksi senyawa antifungi selanjutnya dilakukan pada media SSB berdasarkan uji optimasi beberapa media. Penentuan waktu produksi metabolit dilakukan dengan cara yang sama yaitu melakukan sampling setiap 1 hari (24 jam) masa inkubasi sampai hari ke-13 masa inkubasi. Hubungan antara aktivitas antifungi dengan waktu sampling ditunjukkan pada Gambar 2 berikut.

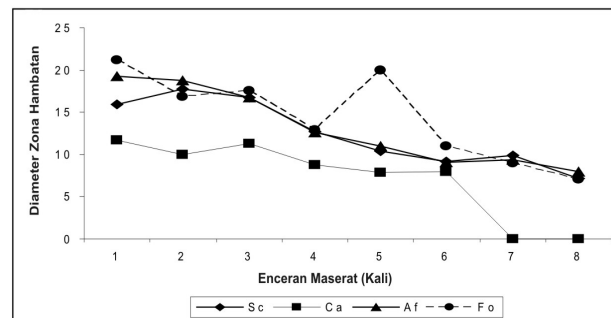


**Gambar 2.** Diamater zona hambatan (aktivitas antifungi) berdasarkan waktu inkubasi pada media SSB.

Selanjutnya produksi senyawa antifungi dilakukan dengan menggunakan media SSB dan masa inkubasi selama 8 hari sebagai rata-rata waktu terbaik untuk proses ekstraksi. Maserat yang diperoleh dilakukan pengujian aktivitas antifungi serta untuk penentuan konsentrasi terendah (MIC) yang mampu menghambat pertumbuhan fungi uji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat terpilih masih mampu menghambat pertumbuhan fungi uji sampai 8 kali encerkan. Ini menunjukkan bahwa isolat tersebut menghasilkan senyawa antifungi yang tergolong kuat dengan kategori spektrum lebar. Uji nilai MIC ditunjukkan pada Tabel 2, dan hubungan antara zona hambatan dengan encerkan maserat dapat dilihat pada Gambar 3.

**Tabel 2.** Rata-Rata diameter zona hambatan (antifungi) dari semua isolat AS0827 pada Uji MIC (Pengenceran 8 kali lipat)

Enceran (kali)	Diameter Zona Hambatan (mm)			
	<i>S.cerevisiae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. flavus</i>	<i>F. oxysporum</i>
1	15,88	11,66	19,23	21,12
2	17,75	10,02	18,76	16,87
3	16,71	11,25	16,77	17,56
4	12,68	8,78	12,65	12,87
5	10,35	7,90	11,02	19,77
6	9,17	6,98	9,09	10,99
7	9,88	-	9,34	8,99
8	7,11	-	7,98	7,03

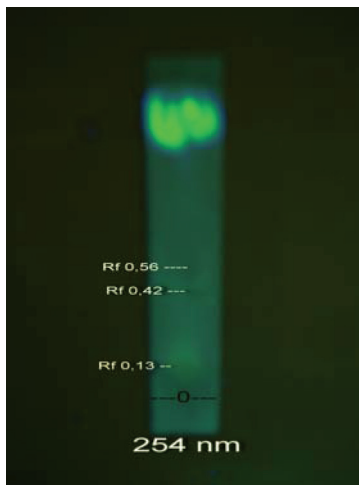
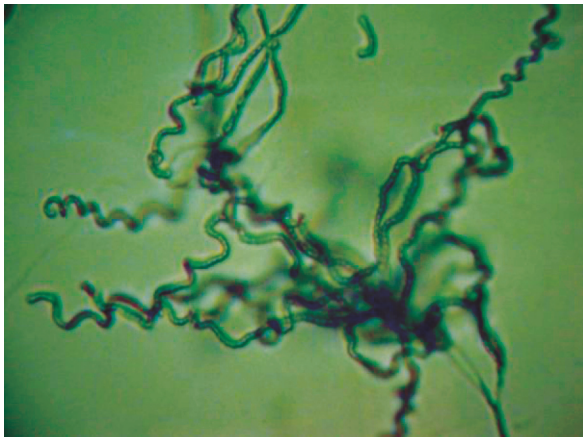


**Gambar 3.** Hubungan antara diameter zona hambatan dengan encerkan maserat

Karakterisasi secara parsial senyawa antifungi dari isolat terpilih dengan menggunakan TLC-Bioautografi menunjukkan adanya tiga noda (*spot*) dengan nilai Rf yang berbeda. Dua dari bercak tersebut menunjukkan aktivitas antifungi sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 4.

**Tabel 3.** Karakteristik isolat AS0827 pada berbagai media tumbuh

Media	Warna Koloni	Pertumbuhan	Miselium udara	Miselium Substrat
ISP2	Coklat	Lebat/Subur	Coklat	Abu-abu
ISP3	Krem tua	Moderat	Abu-abu	Krem muda
ISP4	Abu-abu	Moderat	Merah jambu	Krem
ISP5	Coklat muda	Moderat	Abu-abu	Putih-buram
SNA	Coklat	Lebat/Subur	Coklat muda	Abu-abu
Bennett	Abu-abu	Lebat/Subur	Putih abu-abu	Krem
Nutrient Agar	Abu-Abu	Kurang	Krem	Putih
Gzapek's Agar	Krem	Moderat	Krem muda	Kekuningan
TSA	Coklat	Lebat/Subur	Abu-abu	Krem

**Gambar 4.** Visualisasi Kromatogram KLT pada UV<sub>254</sub> nm [Eluen gerak (Kloroform:etilasetat:asam asetat, 7:3:1 v/v)]**Gambar 5.** Morfologi rantai spora isolat AS0827 berdasarkan hasil pengamatan secara mikroskopik (perbesaran 400x)

## PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil isolasi Actinomycetes sebanyak 47 isolat. Sebanyak 30 isolat yang dipilih, selanjutnya diuji potensinya untuk menghasilkan senyawa antifungi. Ke-30 isolat

**Tabel 4.** Karakteristik fisiologik isolat AS0827

Uji	Hasil
Asimilasi Sumber C:	
Dextrose	+
D (+) Glucose	+
L (+) Arabinose	+
$\alpha$ Lactose	+
Xylan	+
Xylose	-
Sucrose	+
D-Mannitol	+
Maltose	-
Glyserol	+
Hidrolisis:	
Gelatine	+
Casein	+
Starch	+
Tween 80	+
Chitin	+
Tumbuh pada:	
NaCl	0–8%
pH	5–10 (Optimum 7)
Suhu	20–37° C (Optimum 25)
Kristal Violet (0,0001%)	-
Produksi pigmen melanoid	-
Produksi H <sub>2</sub> S	-

Actinomycetes yang diperoleh menunjukkan kemampuan menghasilkan senyawa antifungi. Secara keseluruhan genus *Streptomyces* spp. menunjukkan jumlah yang paling banyak dari seluruh isolat. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh peneliti sebelumnya bahwa genus *Streptomyces* spp. merupakan genus paling dominan dari semua sumber Actinomycetes seperti Lemriss *et al.* (2003) menemukan 49% dari 54 isolat adalah *Streptomyces* spp. dan mampu menghambat pertumbuhan fungi. Lee dan Hwang, 2002 mendapatkan 50% dari 1510 Actinomycetes yang diisolasi dari berbagai lokasi di Korea adalah *Streptomyces* spp. Augustine *et al.* (2006) mendapatkan 312 Actinomycetes yang didominasi kelompok *Streptomyces* spp. dan 22% dari total isolat mampu menghambat aktivitas fungi. Hal ini dimungkinkan karena *Streptomyces* memiliki kemampuan tumbuh yang cepat dan memiliki keragaman

senyawa bioaktif sehingga mampu melakukan adaptasi dan kompetisi di lingkungan atau habitatnya. Genus lainnya yang diperoleh di antaranya diduga *Nocardia* sp.

Dari seluruh isolat yang diuji kemampuannya dalam menghasilkan senyawa antifungi (ditandai dengan pembentukan zona hambatan), terlihat bahwa hampir semua isolat menghambat *S. cerevisiae* kecuali dua isolat (AS0848 dan AS0885). Bahkan isolat AS0848 sama sekali tidak menunjukkan penghambatan pada semua fungi uji. Berdasarkan diameter zona hambatan terlihat bahwa kategori hambatan tergolong sedang, yang ditandai dengan diameter hambatan >10 mm. Beberapa isolat bahkan memiliki zona hambatan tergolong kategori tinggi, yaitu >20 mm. Ini menunjukkan bahwa isolat tersebut cukup berpotensi untuk dikaji lebih lanjut mengenai senyawa aktif yang dihasilkan serta mekanisme penghambatannya. Walau demikian zona hambatan yang tinggi ini tidak berkorelasi lurus dengan adanya senyawa tunggal yang beraktivitas tinggi. Ini disebabkan karena dalam ekstrak yang diuji masih banyak senyawa-senyawa lainnya yang dapat saja bersinergi (lebih dari satu senyawa membentuk kesatuan aktivitas) untuk menghasilkan aktivitas biologis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada satu pun isolat yang menunjukkan aktivitas antifungi dari ekstrak metanol (data tidak ditampilkan). Ini diduga disebabkan oleh pelarut yang digunakan pada ekstraksi dengan etil asetat mampu menarik semua senyawa yang memiliki aktivitas antifungal. Ini menunjukkan bahwa senyawa antifungi yang larut dalam metanol ada yang berasal dari dalam sel (intraseluler). Namun demikian senyawa antifungi tersebut hanya menghambat beberapa fungi uji.

Hasil pengujian pertumbuhan dan produksi senyawa antifungi dari beberapa media yang digunakan menunjukkan bahwa media SSB merupakan media yang paling baik digunakan untuk optimasi produksi senyawa antifungi. Pada Gambar 1 terlihat bahwa pada hari ketujuh dan kesembilan, produksi senyawa antifungi mencapai optimum dan menurun dengan bertambahnya waktu inkubasi. Media SSB mengandung sejumlah sumber C yang beragam antara lain pati dan gliserol serta kandungan nitrogen anorganik maupun organik (seperti *yeast* dan *malt extract*). Ketersediaan nutrisi ini memegang peranan dalam proses pertumbuhan dan produksi senyawa antifungi. Hal ini dilaporkan oleh Augustine *et al.*, 2005 bahwa *yeast* dan *malt extract* serta *dextosa* merupakan komponen media yang dapat menstimulasi secara maksimum produksi antifungi pada Actinomycetes. Meski demikian Badji *et al.* (2006) melaporkan bahwa medium ISP2 justru optimum digunakan dalam produksi senyawa antifungi oleh *Actinomadura* sp. AC104.

Untuk mengetahui waktu sampling paling bagus dalam produksi senyawa antifungi, maka dipilih isolat (AS0827) yang memiliki aktivitas antifungal terbesar untuk dilanjutkan dalam percobaan berikutnya. Data pada Gambar 2 menunjukkan bahwa waktu optimal isolat menghasilkan senyawa antifungi paling optimal pada waktu inkubasi 7 sampai 9 hari. Badji *et al.* (2006) melaporkan bahwa isolat *Actinomadura* sp. AC104 memproduksi senyawa antifungi pada hari ke-6 dan 7 masa inkubasi dengan menggunakan media ISP2. Hal ini ditunjukkan oleh zona hambatan yang paling tinggi dari semua waktu inkubasi. Tingginya produksi metabolit ini berkaitan dengan fase-fase pertumbuhan isolat. Waktu inkubasi sebelum hari ke-4 masih dalam tahapan awal fase eksponensial, yaitu fase pertumbuhan dipercepat dari fase pertumbuhan mikrobial. Pada fase ini senyawa metabolit sekunder masih sangat sedikit diproduksi karena pada umumnya senyawa yang tergolong sebagai senyawa antimikrobia diproduksi jika kompetisi untuk mendapatkan nutrisi sudah kritis. Masa inkubasi hari ke-7 dan 8, mikrobial sudah memasuki fase stasioner. Fase ini merupakan masa mikrobial tidak menunjukkan pertumbuhan yang berarti, bahkan berhenti sama sekali. Hal ini berhubungan dengan nutrisi yang semakin habis sehingga terjadi persaingan antara mikrobial, akibatnya pada fase ini mikrobial memproduksi senyawa antimikrobia (metabolit sekunder) untuk mencegah kompetisi ruang dan nutrisi. Meskipun demikian, dilaporkan adanya masa inkubasi sampai 14 hari untuk produksi antifungi dari beberapa isolat Actinomycetes (Rifaat, 2003).

Pengujian MIC dilakukan dengan memilih isolat yang memiliki zona hambatan besar dari fraksi etilasetat. Pengujian dilakukan dengan cara mengencerkan masekrat sampai 8 kali lipat dari konsentrasi awal. Hasil pengujian menunjukkan bahwa semua isolat masih menunjukkan aktivitas hambatan masih cukup tinggi. Meski demikian simpulan ini masih bersifat sementara karena belum dilakukan pemurnian. Zona hambatan kemungkinan mengalami kecenderungan lebih besar atau sebaliknya jika dilakukan pemurnian (dugaan sementara). Data tersebut di atas secara umum mengalami penurunan zona hambatan dengan menurunnya konsentrasi, namun pada pengujian *Fusarium oxysporum* justru menunjukkan kenaikan diameter zona hambatan. Hal ini terlihat pada isolat AS0822, AS0827, AS0831 dan AS0841 yang justru mengalami kenaikan diameter zona hambatan dengan menurunnya konsentrasi masekrat.

Hasil pengujian KLT Bioautografi menunjukkan adanya 3 bercak pada  $\lambda_{254}$  nm. Ketiga bercak tersebut memiliki nilai  $R_f$  masing-masing 0,56; 0,42 dan 0,13 berdasarkan eluen gerak (Kloroform:etilasetat:asam asetat, 7:3:1 v/v). Dua bercak dengan nilai  $R_f$  0,56 dan 0,13 menunjukkan aktivitas

antifungi (Gambar 4): Kedua bercak yang ditunjukkan pada hasil KLT memiliki aktivitas antifungal. Ini menunjukkan bahwa ada dua senyawa dengan sifat yang berbeda memiliki sifat antifungi. Kedua senyawa tersebut memiliki nilai  $R_f$  yang berbeda, meski demikian belum dapat diduga jenis kedua kelompok senyawa tersebut. Tampak bahwa ada dua zona hambatan dari dua fungi uji yang menunjukkan bercak pada dua nilai  $R_f$  yang berbeda.

Hasil pengujian karakteristik dari isolat AS0827 menunjukkan bahwa isolat tersebut menghasilkan pengelompokan warna (*color grouping*) yang berbeda-beda pada media uji (Tabel 3). Rantai spora isolat menunjukkan bentuk *retinaculiaperti* (RA) seperti tampak pada Gambar 5. Isolat AS0827 belum dapat diidentifikasi sampai tingkat spesies karena masih kurangnya parameter pengujian yang dilakukan (Tabel 4).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut: Genus *Streptomyces spp* merupakan genus yang paling dominan dari Actinomycetes yang ditemukan yang dapat diisolasi dari sumber ampas sagu terdekomposisi. Secara morfologi dan biokimiawi genus *Streptomyces spp.* paling banyak dari semua genus Actinomycetes yang memiliki kemampuan menghasilkan senyawa antifungi yang dapat diisolasi dari sumber tersebut (ampas sagu terdekomposisi). Isolat AS0827 memiliki dua bercak berbeda yang bersifat sebagai antifungi tersebut berdasarkan nilai  $R_f$ -nya. Nilai MIC dari senyawa antifungi yang diperoleh sebesar 200 µg/mL. Genus yang menghasilkan zona hambatan tertinggi dari semua Actinomycetes yang diperoleh adalah *Streptomyces spp.* yang diberi kode isolat AS0827.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terlaksana atas bantuan Hibah Penelitian dari Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional, dengan Nomor Kontrak:030/SP2H/PP/DP2M/III/2008.

## KEPUSTAKAAN

- Ali A, 2006. Keanekaragaman Mikrobial Penghasil  $\alpha$ -Amilase Ekstraselluler Asal Limbah Ampas Sagu, *Jurnal BIOMA*, Vol. 1(3): 43–51.
- Augustine SK, Bhavsar SP, dan Kapadnis BP, 2006. A Non-Polyene Antifungal Antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU23. *Journal Bioscience* 30(2): 201–11.
- Augustine SK, Bhavsar SP, Kapadnis BP, 2005. Production of Growth Dependent Metabolite Active Against Dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK 39. *Indian J Med. Res.*, 121: 164–70.
- Badji B, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A dan Sabaou N, 2006. Antimicrobial Compounds Produced by *Actinomadura sp* AC104 Isolated from an Algerian Sahara Soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(4): 373–82.
- Barakate M, Ouhdouch Y, Oufdou KH, Beaulieu C, 2002. Characterization of Rhizospheric soil *Streptomyces* from Moroccan Habitats and Their Antimicrobial Activities. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 18: 49–54.
- Kawato M, Shonobu R, 1979. A Simple Technique for the Microscopical Observation, *Memoirs of the Osaka University Liberal Arts and Education*, 114.
- Lee JP, Hwang BY, 2002. Diversity of Antifungal Actinomycetes in Various Vegetative Soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(5): 407–17.
- Lemriss S, Laurent F, Couble A, Casoli E, Lancelin JM, Bonaccio DS, Rifai S, Fassouane A, dan Boiron P, 2003. Screening of Nonpolyenic Antifungal Metabolites Produced by Clinical Isolates of Actinomycetes. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(11): 669–74.
- Mikami Y, Komaki H, Imai T, Yazawa K, Nemoto A, Tanaka Y, Graefe U, 2000. A New Antifungal Macrolide Compound, Brasilinolide B, Produced by *Nocardia brasiliensis*. *Journal of Antibiotics*, 53: 70–4.
- 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: 390–7.
- Pandey B, Ghimire P, Agrawal VP, 2004. Studies on the Antibacterial Activity of the Actinomycetes Isolated from the Khumbu Region of Nepal. *Brazilian Journal of Microbiology*. 67(4).
- Parunago MM, Maceda EBG, Villano MAF, 2007. Screening of Antibiotic-Producing Actinomycetes from Marine, Brackish and Terrestrial Sediments of Samal Island, Phillipines. *Journal of Research in Science, Computing and Engineering* 4(3): 29–38.
- Rifaat MH, 2003. The Biodiversity of Actinomycetes in the River Nile Exhibiting Antifungal Activity. *Journal of Mediterranean Ecology* 4(3–4): 5–7.
- Shirling EB, Gottlieb D, 1966. Methods for Characterization of *Streptomyces* Species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16(3): 313–40.
- Suzuki SI, Okuda T, dan Komatsubara S, 2000. Selective Isolation and Distribution of *Actinobispora* strain in soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 708–15.
- Xu LH, Li QR, dan Jiang CL, 1996. Diversity of Soil Actinomycetes in Yunnan, China. *Appl. Environ Microbiol.*, 62: 244–8.
- Taechowisan T, Lu C, Shen Y, 2005. Secondary Metabolites from Endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc 130 and Their Antifungal Activity. *Microbiology* (151): 1691–6.
- Takizawa M, Colwell RR, Hill RT, 1993. Isolation and Diversity of Actinomycetes in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 997–1002.