

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Faktor Lingkungan Rhizosfer Pohon Pinus di Hutan Universitas Brawijaya

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, diperoleh sebanyak 16 isolat *Actinomycetes* yang berhasil diisolasi dari tanah rhizosfer Hutan UB. Data karakteristik morfologi koloni isolat *Actinomycetes* dapat dilihat pada Lampiran 5. Jumlah *Actinomycetes* pada perhitungan TPC (*Total Plate Count*) dari sampel tanah rhizosfer Hutan UB adalah  $1,243 \times 10^4$  cfu/g. Jumlah *Actinomycetes* yang ditemukan di tanah rhizosfer pohon pinus Hutan UB lebih banyak jika dibandingkan dengan yang di temukan oleh Golińska & Hanna (2011) di tanah rhizosfer pohon pinus, Hutan asam Polandia yaitu sebanyak  $6 \times 10^1$  cfu/g.

Tanah hutan UB memiliki nilai pH 4,6 dan tergolong asam (Tabel 4). Faktor utama yang membatasi pertumbuhan *Actinomycetes* di tanah hutan yaitu pH tanah yang terlalu rendah (asam). Menurut Sherameti & Ajit (2010) *Actinomycetes* memiliki sifat intoleran terhadap asam dan memiliki kecenderungan tidak mampu hidup jika berada  $\leq$  pH 5,0, namun Golińska & Hanna (2011) menyatakan *Actinomycetes* tetap dapat diisolasi dari tanah hutan yang memiliki pH asam dengan kisaran pH paling rendah 4,0-4,3. Cornell & Joseph (1981) memperoleh sebanyak 126 isolat *Actinomycetes* dari tanah hutan nasional Cumberland (New South Wales) yang didapatkan dari 3 titik lokasi dengan pH tanah bersifat asam (4,91 ; 4,83; 4,60) dengan jumlah masing-masing  $17,37 \times 10^5$ ;  $50,84 \times 10^4$  dan  $11,71 \times 10^4$  cfu/g dan keseluruhannya termasuk ke dalam kelompok *Streptomyces*. Khan & Williams (1975) memperoleh sebanyak 10 strain *Acidophilic Actinomycetes* yang berhasil diisolasi dari tanah dengan pH asam (3,6-4,2) di Hutan Delamere, Inggris. Niyasom dkk (2015) memperoleh sebanyak 32 isolat *Actinomycetes* dengan kisaran jumlah  $3,9-8,2 \times 10^3$  cfu/g yang diisolasi dari tanah dari Kebun Botani Phatthalung, Thailand dengan kisaran pH tanah antara 4,2-4,6. Apabila dibandingkan dengan jumlah *Actinomycetes* yang diperoleh pada rhizosfer Hutan UB, maka jumlah *Actinomycetes* tergolong rendah. Berdasarkan uraian tersebut, diketahui bahwa kondisi pH berpengaruh terhadap jumlah *Actinomycetes* yang didapatkan. Hal ini karena berkaitan dengan pH tanah rhizosfer Pohon Pinus di Hutan

UB yang bersifat asam dan termasuk dalam lingkungan ekstrem sebab tidak sesuai dengan pH optimum untuk tumbuh.

Nilai rata-rata untuk intensitas cahaya di Hutan UB tergolong sedang yaitu  $779,4 \times 10$  lux (Tabel 4). Hal ini selaras dengan temperatur tanah yang rendah yaitu sekitar  $19,4$  °C dan kelembaban tanah yang cukup  $78,2$  %. Intensitas cahaya yang terukur tergolong sedang dan menandakan bahwa radiasi cahaya matahari tidak mampu mencapai hingga ke dasar karena terhalang oleh pepohonan atau vegetasi yang ada di dalam Hutan. Tingginya lokasi pengambilan tanah menyebabkan temperatur tanah rendah dengan intensitas cahaya yang cukup. Menurut Kanti (2005) temperatur yang cocok bagi pertumbuhan *Actinomyces* adalah pada kisaran  $25-30$  °C. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi temperatur di tanah rhizosfer Hutan UB tergolong rendah dan menyebabkan kondisi lingkungan di tanah rhizosfer Pohon Pinus Hutan UB termasuk ekstrem sebab tidak sesuai dengan temperatur optimum untuk tumbuh.

Tabel 4. Pengukuran Faktor-faktor lingkungan di Tanah Rhizosfer Hutan UB dan *Total Plate Count*

Faktor-faktor lingkungan	
Ketinggian (m)	1288,6
Intensitas cahaya (lux)	$779,4 \times 10$
Kelembaban tanah (%)	78,2
Temperatur tanah (°C)	19,4
Bahan organik tanah (%)	5,3
pH tanah	4,6
Keliling pohon (cm)	84,56
TPC ( <i>Total Plate Count</i> ) (cfu/g)	$12,43 \times 10^3$

Menurut Kolwzan dkk, (2006) secara umum komposisi bahan organik di dalam tanah adalah  $10$  %. Bahan organik tanah yang diperoleh pada tanah hutan UB yaitu  $5,3$  % berkaitan dengan pH tanah yang terukur tergolong asam (Tabel 4). Tingginya kandungan bahan organik tanah menyebabkan kapasitas menyerap air (*water holding capacity*) tinggi sehingga jumlah mikroorganisme yang diperoleh banyak. Hal ini mampu mendorong pertumbuhan mikroorganisme dalam mendekomposisi bahan organik lebih cepat dan menyebabkan

pH tanah lebih rendah (asam). Nilai pH tanah dan bahan organik tanah sangat berpengaruh terhadap fungsi tanah dan ketersediaan nutrisi tanaman. Nilai pH tanah mempengaruhi kelarutan dan ketersediaan nutrisi tanaman dan dekomposisi bahan organik. Bahan organik tanah (SOM) banyak memiliki fungsi di dalam tanah, termasuk sumber nutrisi, kapasitas menahan air, agregasi tanah dan indikator utama untuk kualitas tanah. Tanah yang memiliki pH asam lebih banyak mengandung mikronutrien seperti Fe, Mn, B, Cu dan Zn, sedangkan ion K, S, Ca dan Mg yang merupakan makronutrien lebih sedikit. Hal ini dikarenakan mikronutrient mudah menempel dan mengikat kuat pada permukaan tanah yang mengandung tinggi ion  $H^+$  (tanah asam) (Mccauley dkk., 2017 ).

Bahan organik tanah merupakan kombinasi dari residu tanaman dan hewan yang mengalami tahap dekomposisi serta residu dari organisme tanah. Bahan organik mulai pertama kali membusuk, melepaskan anion dan kation. Residu dari dedaunan dan batang tanaman umumnya mengandung anion lebih banyak, sehingga pada awal pembusukan menyebabkan pH tanah menjadi meningkat (basa). Kenaikan pH tanah di awal proses tersebut utamanya dikarenakan tingginya residu nitrogen pada tanaman yang biasanya dapat mengurangi ion  $H^+$ , mengurangi toksisitas aluminium (Al) atau mangan (Mg) pada zona akar. Peran mikroorganisme tanah melanjutkan proses dengan memecah bahan organik tanaman menjadi amonium (mineralisasi) yang secara sementara dapat meningkatkan pH tanah. Ammonium dikonversi menjadi nitrat (nitrifikasi) yang menyebabkan pH tanah semakin turun. Jika nitrat semakin banyak hilang karena proses leaching (pencucian) tanah, maka pH akan semakin turun dan dalam jangka panjang, dekomposisi oleh mikroorganisme dapat menurunkan pH tanah (asam) (Mccauley dkk., 2017 ).

Allison (1973) menyatakan bahwa tanah hutan memiliki kecenderungan termasuk ke dalam jenis tanah bertipe podzolik yang secara umum dominan bersifat asam. Tan (2008) menyatakan bahwa hutan yang terletak di ketinggian antara 600-1000 mdpl atau lebih, termasuk ke dalam zona pembentukan tanah podzolisasi *acid brown* (*acid brown forest soil*) dan tanah tersebut terbentuk karena adanya reaksi asam yang kuat saat proses podzolisasi. Hal yang paling utama dalam pembentukan *acid brown forest soil* adalah kondisi temperatur yang dingin dan lembab disertai dengan iklim tropis.

#### 4.2. Potensi Isolat *Actinomycetes* Dalam Menghasilkan Antibiotik

Sebanyak 16 isolat *Actinomycetes* dari tanah Hutan UB (*UB Forest*) yang telah diperoleh diskrining awal untuk mendapatkan isolat yang potensial menghasilkan antibiotik (Gambar 5). Masing-masing isolat yaitu ACT1.1; ACT1.2; ACT1.3; ACT1.4; ACT1.5; ACT1.6; ACT2.1; ACT2.2; ACT2.3; ACT2.4; ACT3.1; ACT3.2; ACT3.3; ACT4.1; ACT5.1 dan ACT5.2 diuji aktivitas antibakterinya terhadap tiga bakteri patogen uji yaitu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan MRSA. Adanya aktivitas antibakteri dengan terbentuknya diameter zona hambat menunjukkan isolat tersebut memiliki potensi untuk menghasilkan antibiotik.

Berdasarkan hasil skrining awal, diperoleh tiga isolat yang memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi terhadap patogen MRSA. Isolat yang terpilih adalah ACT1.6, ACT 3.3 dan ACT 5.2. Zona hambat yang dibentuk oleh isolat ACT1.6 terhadap bakteri patogen uji *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan MRSA secara berurutan adalah  $11,07 \pm 0,5$  mm;  $6,10 \pm 0,17$  mm dan  $15,66 \pm 3,2$  mm. Zona hambat yang dibentuk oleh isolat ACT3.3 terhadap bakteri patogen uji *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan MRSA secara berurutan adalah  $0 \pm 0$  mm;  $8,43 \pm 0,6$  mm dan  $15,83 \pm 0,7$  mm. Zona hambat yang dibentuk oleh isolat ACT5.2 terhadap bakteri patogen uji *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan MRSA secara berurutan adalah  $0 \pm 0$  mm;  $7,06 \pm 2,2$  mm dan  $16,03 \pm 0,6$  mm. Berdasarkan hasil uji daya hambat tersebut, isolat ACT1.6, ACT3.3 dan ACT5.2 memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi terhadap bakteri patogen MRSA ( $P < 0,05$ ). Isolat ACT5.2 menunjukkan aktivitas antibakteri tertinggi terhadap bakteri patogen uji MRSA ( $16,03 \pm 0,6$  mm) namun tidak berbeda dengan isolat ACT1.6 ( $15,66 \pm 3,2$ ) dan ACT3.3 ( $15,83 \pm 0,7$  mm) ( $P < 0,05$ ). Terdapat interaksi antara isolat dan patogen ( $P < 0,05$ ) sehingga keduanya berpengaruh terhadap zona hambat yang dihasilkan. Perbedaan zona hambat yang dibentuk oleh masing-masing isolat menandakan adanya perbedaan produksi metabolit yang dihasilkan oleh masing-masing isolat. Adanya aktivitas antibakteri terhadap MRSA menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut memiliki potensi dalam menghambat bakteri patogen MRSA.

Berdasarkan hasil skrining awal (Gambar 5), masing-masing isolat memiliki kespesifikannya terhadap bakteri patogen uji. Isolat ACT1.1, ACT1.2, ACT1.3, ACT1.4, ACT1.5 dan ACT1.6 dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif *E.coli*. Isolat ACT1.6, ACT2.1, ACT3.2, ACT3.3, ACT4.1, ACT5.1 dan ACT5.2 dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif *S. aureus*. Isolat ACT1.4, ACT1.5, ACT1.6, ACT2.1, ACT2.2, ACT2.3, ACT3.3 dan ACT5.2 dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif MRSA. Isolat ACT1.4, ACT1.5 dan ACT1.6 memiliki spektrum luas karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Isolat ACT2.1, ACT3.3 dan ACT5.2 memiliki spektrum sempit karena hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif. Isolat ACT1.1, ACT1.2 dan ACT1.3 memiliki spektrum sempit karena hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif.

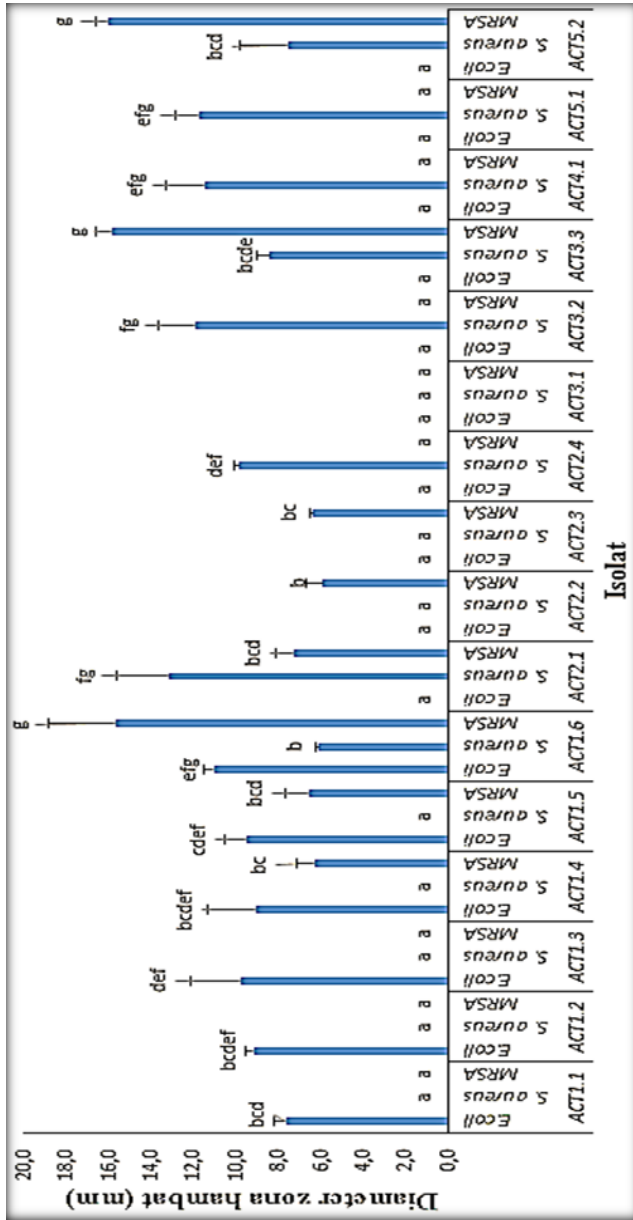
Rhizosfer merupakan daerah tanah yang berdekatan dengan akar tanaman. Rhizosfer adalah lingkungan yang kompleks dan sangat mendukung bagi perkembangan dan pertumbuhan beragam komunitas mikroorganisme. Komposisi mikrobioma pada rhizosfer ini dinamis dan dikendalikan oleh beberapa faktor biotik dan abiotik diantaranya adalah parameter lingkungan, sifat fisikokimia tanah, aktivitas biologis tanaman, sinyal kimia dari tanaman dan mikroorganisme yang melekat pada sistem akar (Haldar & Sangharmitra, 2015). Metabolit sekunder tanaman (SPME) berperan penting dalam kelangsungan hidup tanaman di lingkungan dan membangun hubungan ekologis antara tanaman dan organisme lainnya salah satunya adalah adanya hubungan antara tanaman dan mikroorganisme melalui SPME yang berasal dari eksudat akar atau sisa-sisa dekomposisi oleh tanaman (Musilova dkk., 2016).

Rhizodeposit adalah senyawa yang dilepaskan oleh akar tanaman (Eshel, & Tom 2013). Senyawa rhizodeposit adalah produk dari metabolisme primer maupun sekunder yang dibagi menjadi dua yaitu senyawa dengan berat molekul tinggi ( $HM_w$ ) dan senyawa dengan berat molekul rendah ( $LM_w$ ) yang mendominasi eksudat. Metabolit sekunder tanaman (SPME) seperti flavonoid, fenolat, terpenoid dan alkaloid termasuk dalam senyawa dengan berat molekul tinggi, selain itu enzim, regulator pertumbuhan dan vitamin juga termasuk di dalamnya (Bertin dkk., 2003; Singer dkk., 2003). Metabolit sekunder tanaman (SPME) tidak hanya sebagai sumber karbon dan sumber energi, namun juga mengandung aktivitas antimikroba (Koh dkk., 2013). Bakteri maupun

mikroorganisme lain yang menempati daerah rhizosfer umumnya dapat menggunakan senyawa antimikroba tersebut sebagai sumber karbon dan energi selama tidak rentan dan tidak mencapai tingkat hambat pertumbuhan bagi mikroba (Bernier, & Surette, 2013).

Beberapa penelitian telah mempelajari bahwa spesies Pohon Pinus dilaporkan memiliki minyak esensial, flavonoid dan kandungan alkaloid yang terbatas jumlahnya (Oleszek dkk., 2002; Dob dkk., 2005; Gerson dkk., 2009). Kandungan yang terdapat pada Pohon Pinus dibentuk oleh metabolit sekunder tanaman, yang diketahui bersifat sebagai antimikrobia yang mampu digunakan untuk mengatasi dan mengontrol kerusakan makanan (*food spoilage*) dan bakteri patogen (Burt, 2004; Bajpai dkk., 2008). Selain itu, dalam penggunaannya sebagai obat, minyak esensial yang dihasilkan dari strobilus pohon pinus mampu digunakan untuk mengobati infeksi pernafasan (Dob dkk., 2007). *Pinus halepensis* diketahui memiliki komponen metabolit sekunder yaitu terpenoid dan fenolat yang memengaruhi simbiosis akar dan kualitas tanah dengan cara mengganggu penguraian, mineralisasi dan humifikasi sehingga menghambat pembentukan biji beberapa spesies tumbuhan non pinus. Hal ini merupakan alelopati alami (Kainulainen & Holopainen, 2002).





Gambar 5. Diameter zona hambat isolat *Actinomyces* terhadap beberapa bakteri patogen



Fenolat merupakan molekul yang terbentuk dari metabolit sekunder pada beberapa spesies tumbuhan yang memiliki aktivitas farmakologis. Fenolat berpeluang kuat memiliki aktivitas antimikrobia terhadap beberapa bakteri (Ghasemzadeh & Neda, 2011). Fenolat pada tumbuhan termasuk asam fenolat, flavonoid, dan tanin (Dai & Mumper, 2010). Asam fenolat yang ditemukan pada tumbuhan dilaporkan aktif mampu menghambat virus, bakteri dan jamur serta digolongkan ke dalam kelompok bakteriostatik (Cowan 1999). Bakteriostatik adalah antimikroba yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan namun tidak sampai membunuh bakteri (Ryan & George, 2004). Aktivitas antimikrobia asam fenolat paling banyak dilaporkan menarget pada mikroorganisme patogen seperti *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Listeria monocytogenes*. Secara umum, asam fenolat ditemukan aktif sebagai bakterisida maupun bakteriostatik (Wen dkk., 2003).

Kelompok lain dari fenolat yaitu flavonoid juga memiliki kemampuan aktivitas antibakteri dan penekanan terhadap virulensi bakteri. Mekanisme reaksi flavonoid terhadap virulensi bakteri adalah melalui penghambatan beberapa faktor seperti reseptor sinyal kuorum, enzim dan toksin (Cushnie & Lamb, 2011). Flavonoid mampu merusak membran sel mikrobia (Tsuchiya dkk.,1996). Beberapa flavonoid telah diuji terhadap bakteri patogen termasuk *E.coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Streptococcus*, *Campilobacter*, *Clostridium* dan *Lactococcus*.

Adanya aktivitas antibakteri yang ditunjukkan oleh masing-masing isolat yang diperoleh dari tanah rhizosfer Pohon Pinus, diduga dipengaruhi oleh senyawa-senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh pohon tersebut. Marhefka (2015) menyatakan bahwa tanaman pinus yang menghasilkan minyak esensial seperti senyawa  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, 3-carene, limonene, dan terpineol yang memiliki aktivitas antimikrobia. Senyawa  $\alpha$ -pinene diketahui dapat menghambat bakteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Enterococcus faecalis* dan *Bacillus cereus*. Senyawa  $\beta$ -pinene diketahui menghambat *Listeria monocytogenes* sedangkan senyawa terpineol mampu menghambat *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*,

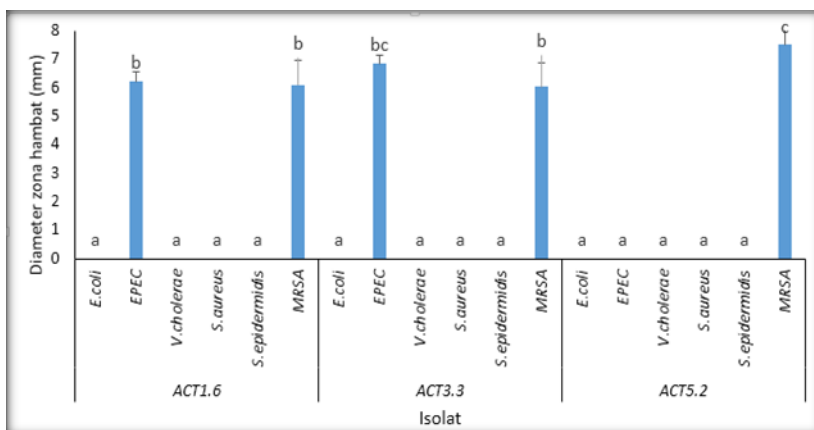
*Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* dan *Listeria monocytogenes* (Metsämuuronen & Heli, 2014).

#### **4.3. Daya Hambat *Extracellular Metabolites* (ECM) Isolat *Actinomycetes***

Berdasarkan hasil skrining awal, diperoleh tiga isolat *Actinomycetes* ACT1.6, ACT3.3 dan ACT5.2 memiliki potensi tertinggi dalam menghambat bakteri patogen MRSA. Isolat ACT1.6 berada di fase stasioner pada jam ke-96, isolat ACT3.3 berada di fase stasioner pada jam ke-120 dan isolat ACT5.2 berada di fase stasioner pada jam ke-72. Ketiga isolat yang telah berada pada fase stasionernya diuji daya hambatnya menggunakan *Extracellular Metabolites* (ECM) terhadap bakteri patogen uji *Escherichia coli*, *EPEC*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* dan MRSA. Hasil yang diperoleh (Gambar 6) menunjukkan aktivitas antimikrobia yang berbeda pada tiap isolat terhadap keenam bakteri patogen. Isolat ACT1.6 mampu menghambat bakteri patogen EPEC dan MRSA dengan zona hambat berturut-turut  $6,2 \pm 0,3$  mm dan  $6,1 \pm 0,8$  mm. Isolat ACT3.3 mampu menghambat bakteri patogen EPEC dan MRSA dengan zona hambat berturut-turut  $6,8 \pm 0,3$  mm dan  $6,03 \pm 0,8$  mm. Isolat ACT5.2 hanya mampu menghambat bakteri patogen MRSA dengan zona hambat  $7,5 \pm 1,1$  mm. Berdasarkan hasil uji daya hambat tersebut, isolat ACT1.6, ACT3.3 dan ACT5.2 memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen MRSA. Isolat ACT5.2 menunjukkan aktivitas antibakteri tertinggi terhadap bakteri patogen MRSA ( $7,5 \pm 1,1$  mm). Isolat ACT1.6 menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap MRSA dengan zona hambat  $6,1 \pm 0,8$  yang tidak berbeda dengan isolat ACT3.3 ( $6,03 \pm 0,8$ ) ( $P < 0,05$ ). Terdapat interaksi antara isolat dan patogen ( $P < 0,05$ ) sehingga keduanya berpengaruh terhadap zona hambat yang dihasilkan. Adanya aktivitas antibakteri terhadap MRSA menunjukkan bahwa metabolit dari ketiga isolat (isolat ACT1.6, ACT3.3 dan ACT5.2) tersebut dapat dimanfaatkan untuk mengatasi infeksi oleh MRSA.

Metabolit isolat ACT1.6, ACT3.3 dan ACT5.2, ketiganya tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *E.coli*, *S. aureus* dan *S. epidermidis* yang masing-masing merupakan mikroflora normal pencernaan dan kulit. Metabolit ketiga isolat dapat dimanfaatkan untuk mengatasi infeksi pencernaan dan infeksi pada daerah kulit sebab tidak membunuh mikroflora normal (antibiotik bersifat sinergis dengan

mikroflora). Metabolit ketiga isolat tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *V.cholerae*, sehingga metabolitnya tidak dapat dimanfaatkan untuk mengatasi infeksi oleh *Vibrio cholerae*. Metabolit isolat ACT1.6 dan ACT3.3 menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap EPEC, sehingga metabolit kedua isolat dapat dimanfaatkan untuk mengatasi infeksi oleh EPEC. Masing-masing isolat memiliki kespesifikannya terhadap bakteri patogen uji. Metabolit isolat ACT1.6, dan ACT1.3, dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif EPEC dan menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif MRSA, sehingga kedua isolat memiliki spektrum luas. Metabolit isolat ACT5.2 hanya dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif MRSA, sehingga memiliki spektrum sempit.

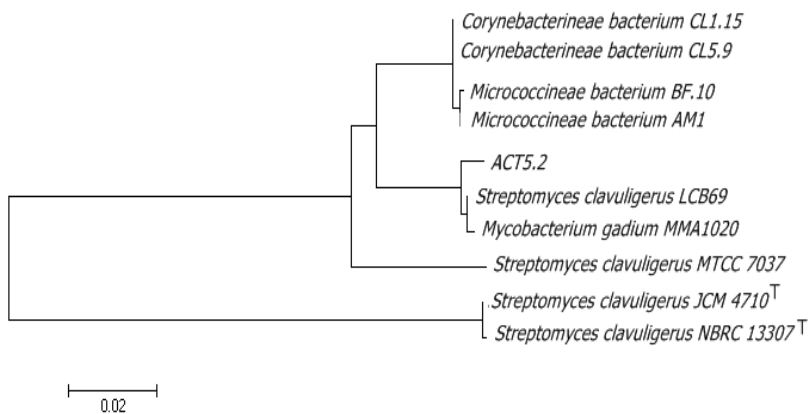


Gambar 6. Diameter zona hambat *extracellular metabolite* isolat *Actinomyces* terhadap bakteri patogen

#### 4.4. Spesies Bakteri Penghasil Antibiotik (Anti-MRSA)

Tiga isolat *Actinomyces* terbaik yang memiliki kemampuan menghambat bakteri patogen MRSA yaitu ACT1.6, ACT3.3 dan ACT5.2 diidentifikasi secara molekular berdasarkan sekuen 16S rDNA. *Whole genome* dari ketiga isolat diisolasi menggunakan *i-genomic Soil DNA Extraction Mini Kit* dari *iNtRON Biotechnology, Inc*. Proses sekuensing dilakukan di Laboratorium 1<sup>st</sup> BASE Pt. Genetika Science.

Hasil Sekuensing 16S rDNA menunjukkan kromatogram sekuen yang sangat baik hanya pada isolat *Actinomycetes* ACT5.2. Dua isolat *Actinomycetes* lainnya yaitu ACT1.6 dan ACT3.3 memiliki hasil sekuensing yang tidak baik. Hal ini dikarenakan banyaknya puncak pita (*peak*) yang saling menumpuk (*overlapping*) pada kromatogram sekuen kedua isolat (ACT1.6 dan ACT3.3). Puncak pita (*peak*) yang menumpuk diduga disebabkan oleh rendahnya nilai kemurnian DNA yang diperoleh dari hasil isolasi DNA. Hasil sekuen isolat ACT5.2 dikonstruksi pohon filogeni. Kontruksi pohon filogeni dilakukan menggunakan program MEGA 6.0 dengan algoritma *neighbor-joining* dan analisis bootstrap 1000 (pengulangan sebanyak 1000 kali). Berdasarkan pohon filogeni (Gambar 7) isolat ACT5.2 memiliki hubungan kekerabatan paling dekat dengan *Streptomyces clavuligerus* LCB69 dan *Mycobacterium gadium* MMA1020 dengan similaritas sebesar 99,99%. Menurut Drancourt dkk (2000) identifikasi bakteri dalam tingkatan spesies memiliki syarat yaitu harus memiliki similaritas sekuen 16S rDNA lebih dari 97 %. Apabila similiaritas sekuen 16S rDNA lebih dari 99 % maka dapat dianggap sama pada tingkatan strain.



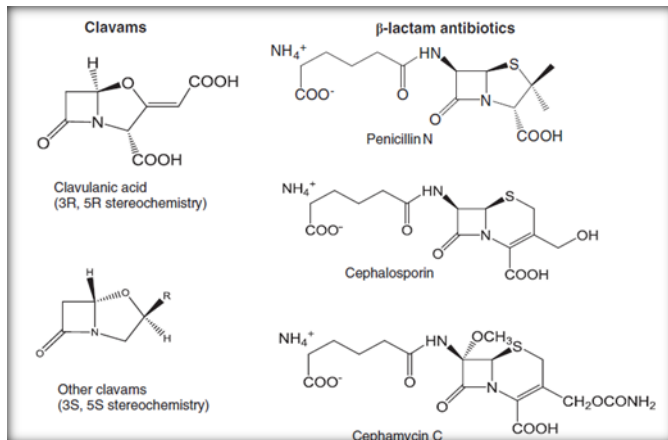
Gambar 7. Pohon filogeni isolat ACT5.2 dengan isolat acuan berdasarkan algoritma *Neighbor-Joining*

*Streptomyces clavuligerus* pertama kali ditemukan memproduksi antibiotik  $\beta$ -laktam, namun Brown dkk (1976) menemukan bahwa spesies tersebut mampu memproduksi asam klavunalat (CA). Asam klavunalat (CA) secara efektif mampu menghambat aktivitas  $\beta$ -laktamase dari kelas A dan D seperti kinerja antibiotik sefalosporin dan penisilin yang telah banyak digunakan secara klinis untuk pengobatan penyakit yang disebabkan oleh bakteri yang resisten terhadap antibiotik  $\beta$ -laktam (Draws & Bonomo, 2010). Beberapa bakteri patogen memproduksi enzim  $\beta$ -laktamase yaitu enzim yang mampu mengkatalis hidrolisis molekul yang mengandung cincin  $\beta$ -laktam sehingga mampu memblokir antibakteri dan membuatnya menjadi resisten terhadap antibiotik yang diberikan (Neto dkk., 2005).

Asam klavunalat (CA) merupakan penghambat potensial untuk berbagai macam enzim  $\beta$ -laktamase dari berbagai patogen. Asam klavunalat (CA) biasa dikombinasi dengan antibiotik  $\beta$ -laktam untuk mengatasi patogen yang memproduksi enzim  $\beta$ -laktamase (enzim yang mampu mencegah aktivitas antibiotik  $\beta$ -laktam) dan mencegah terjadinya infeksi. Hal ini dikarenakan pada mekanismenya dalam penghambatan terhadap enzim  $\beta$ -laktamase, terdapat kesamaan antara struktur CA dengan substrat alami dari enzim  $\beta$ -laktamase yaitu antibiotik  $\beta$ -laktam, yang nantinya akan dihasilkan CA yang mengikat  $\beta$ -laktam pada gugus serin-hidroksil (bagian sisi enzim yang aktif) sehingga menyebabkan enzim  $\beta$ -laktamase menjadi terhambat (Reading & Cole, 1977; Georgopapadakou, 2004). Telah diketahui sebelumnya bahwa *Streptomyces clavuligerus* menghasilkan antibiotik  $\beta$ -laktam yaitu Cepharmycin C, Penicillin dan Cephalosporin (Gambar 8). *Streptomyces clavuligerus* tersebut menghasilkan CA yang juga memiliki kemampuan seperti antibiotik  $\beta$ -laktam sehingga spesies tersebut memiliki keduanya (penghasil  $\beta$ -laktam dan CA) yang bersifat sebagai antibiotik dan molekul yang melindungi antibiotik dari degradasi oleh enzim  $\beta$ -laktamase (Jensen & Paradkar, 1999).

Penelitian yang dilakukan oleh Brown dkk (1976) menemukan bahwa metabolit *cell-free* dari *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 (ATCC 27064) menghambat pertumbuhan *Klebsiella aerogenes*, yaitu bakteri patogen yang menghasilkan enzim  $\beta$ -laktamase. Graninger dkk, (1989) menemukan bahwa penggunaan klavunalat untuk menghambat bakteri patogen MRSA (*Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*)

lebih efektif jika dikombinasikan dengan benzylpenicilin dan amoxycillin.



(Jensen & Paradkar, 1999)

Gambar 8. Metabolit β-laktam yang dihasilkan oleh *Streptomyces clavuligerus*