

**POTENSI ACTINOMYCETES DARI RHIZOSFER TUMBUHAN DI EKOSISTEM
KARST GORONTALO SEBAGAI ANTICANDIDA****Riskanarti K. Lihaawa¹, Yuliana Retnowati², Abubakar Sidik Katili³**Prodi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Gorontalo
Jl..Dr. Zainal Umar Sidiki, kecamatan tilongkabila kabupaten Bone Bolango, Gorontalo 96119, Indonesia
Email: riskalihawa21@gmail.comARTICLE
INFO**Article history:**

Received :

23 Desember 2024

Revised :

24 Desember 2024

Accepted :

25 Desember 2024

Kata Kunci: Tanah;
Actinomycetes;
Tumbuhan; Ekosistem
Karst**Keywords:** Soil;
Actinomycetes; Plants;
Karst Ecosystem**Abstrak**

Ekosistem karst merupakan salah satu kawasan marginal ekstrim atau jenis tanah yang mempunyai kesuburan tanah rendah. Tanah di ekosistem karst mempunyai kandungan kalsium (Ca) yang tergolong tinggi yang bisa mempengaruhi ketersediaan fosfor (P). Akan tetapi terdapat aktivitas mikroba yang bisa memberikan kebutuhan hara pada tumbuhan agar tetap hidup salah satunya adalah Actinomycetes. Metode penelitian ini menggunakan metode penelitian kuantitatif, sampel tanah rhizosfer di ambildi tiga lokasi yaitu di bukit Bangga, bukit Panipi sekitaran danau limboto, dan bukit Olohuta dengan metode purposive sampling. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 7 isolat Actinomycetes yang ditemukan berasosiasi dengan 5 jenis tumbuhan pada ekosistem karst. Isolat Actinomycetes menunjukkan karakter morfologi, koloni dan sel hampir seragam di dominasi warna putih. Hasil uji aktivitas anticandida menunjukkan bahwa terdapat 2 isolat (KSL1 dan KS1c) yang menghambat pertumbuhan *Candida albicans*, KSL1 dengan diameter zona hambat 10,5 mm dan KS1c dengan diameter zona hambat 17,5 mm. Identifikasi molekuler berdasarkan sekuens gen 16S Rrna menunjukkan bahwa isolat KSL1 berkerabat dekat dengan *Streptomyces aegyptia* dengan indeks kemiripn 99.64% dan isolat KS1c berkerabat dekat dengan *Istreptomyces sp* dengan indeks kekerabatan 99.57%.

Abstract

Karst ecosystem is one of the extreme marginal areas or types of soil that has low soil fertility. Soil in the karst ecosystem has a relatively high calcium (Ca) content which can affect the availability of phosphorus (P). However, there is microbial activity that can provide nutrient needs for plants to stay alive, one of which is Actinomycetes. This research method uses a quantitative research method, rhizosphere soil samples were taken at three locations, namely Bangga hill, Panipi hill around Lake Limboto, and Olohuta hill with a purposive sampling method. The results of the study showed that there were 7 isolates of Actinomycetes found associated with 5 types of plants in the karst ecosystem. Actinomycetes isolates showed almost uniform morphological, colony and cell characteristics dominated by white. The results of the anticandida activity test showed that there were 2 isolates (KSL1 and KS1c) that inhibited the growth of *Candida albicans*, KSL1 with an inhibition zone diameter of 10.5 mm and KS1c with an inhibition zone diameter of 17.5 mm. Molecular identification based on 16S RRNA gene sequences showed that the KSL1 isolate was closely related to *Streptomyces aegyptia* with a similarity index of 99.64% and the KS1c isolate was closely related to *Istreptomyces sp* with a similarity index of 99.57%.

PENDAHULUAN

Ekosistem karst merupakan salah satu kawasan atau jenis tanah marginal ekstrim yang memiliki kesuburan tanah yang rendah. Tanah di kawasan karst berawal dari batuan gamping yang memiliki kandungan nutrisi yang rendah terkecuali magnesium dan kalsium, hal ini yang menjadi salah satu penyebab tumbuhan di kawasan karst memiliki keunikan dan mampu bertahan hidup. Menurut Puspita D. dkk (2020) bahwa kawasan karst tersusun dari batuan karbonat yang mengalami proses pembentukan cukup lama, sehingga terbentuk lanskap dengan tatanan hidrologi dan morfologi yang unik dan spesifik.

Beberapa mikroorganisme yang bisa bertahan hidup di ekosistem karst salah satunya yaitu Actinomycetes. Actinomycetes adalah kelompok mikroorganisme yang pada umumnya hidup di dalam area tanah serta berperan penting dalam dekomposisi bahan organik serta pembentukan senyawa bioaktif. Selain itu Actinomycetes juga mampu mendegradasi senyawa organik dan menghasilkan senyawa bioaktif seperti antibiotik, enzim dan fitohormon (Fatmawati dkk. 2019). Actinomycetes menghasilkan senyawa antibakteri melalui proses produksi senyawa metabolit sekunder dimana senyawa tersebut dapat dihasilkan oleh Actinomycetes melalui beberapa mekanisme seperti biosintesis, modifikasi enzimatik, dan modifikasi genetik. Actinomycetes menghasilkan senyawa antibakteri melalui proses biosintesis yaitu dengan menghasilkan senyawa antibakteri dari bahan-bahan kimia yang tersedia di lingkungan sekitarnya (Nurmujahidin., 2023).

Actinomycetes tergolong pada salah satu mikroba rhizosfer yang bisa diuji potensinya karena mempunyai nilai ekonomis yang cukup tinggi diantaranya adalah sebagai penghasil antifungi, kemoterapeutik, enzim, antivirus, imunosupresan, antikanker dan antibiotik (Raja & Prabakarana. 2011; Rajasewari et al. 2015; Lima dkk. 2017). Antibiotik yang dihasilkan oleh Actinomycetes tersebut bisa untuk di jadikan suatu obat untuk menghambat pertumbuhan dari suatu fungi, salah satunya ialah *Candida albicans*.

Candida albicans adalah patogen jamur yang umum terdapat pada manusia yang bisa menyebabkan beberapa penyakit seperti infeksi mukosa superfisial sampai pada infeksi sistemik yang dapat mengancam jiwa (Pfaller & Diekema. 2007; Ganguly & Mitchell. 2011; Calderon. 2012). *Candida albicans* bukan hanya sebagai patogen jamur, akan tetapi *Candida albicans* ini menurut Organisasi Kesehatan Dunia (2022) termasuk pada salah satu jenis jamur yang mematikan atau kategori kritis yang sudah mengakibatkan lebih dari 1,6 juta orang meninggal dunia. Resistensi terhadap obat antijamur bukan hanya menjadi masalah pada jamur golongan kritis, tetapi juga tergolong pada kategori resiko tinggi dan resiko sedang. Oleh karenanya perlu untuk mengeksplorasi suatu bakteri yang bisa dijadikan sebagai antibiotik contohnya seperti Actinomycetes yang terdapat pada ekosistem karst, dimana di Gorontalo sendiri merupakan wilayah dengan banyak terdapat ekosistem karst yang perlu untuk di kaji kembali.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di tiga titik lokasi sampling yaitu di lokasi pertama yang dilakukan sampling tanah rhizosfer terletak di bukit Bangga kecamatan Paguyaman pantai, perbukitan Olohuta kecamatan Kabila bone dan terakhir di bukit Panipi di sekitaran danau Limboto. Isolasi sampel, pemurnian dan pewarnaan gram di laksanakan di Laboratorium Biologi Lipi Cibinong, dan molekuler di lakukan di Laboratorium Genetika Sains Jakarta.

Pengambilan Sampel Tanah Rhizosfer

Penentuan titik sampling menggunakan metode purposiv sampling, jenis tumbuhan yang di ambil tanah rhizosfernya adalah tumbuhan yang lebih dominan tumbuh di lokasi pengambilan sampel. Ukuran plot dibuat persegi dengan panjang 20 x 20 m sebanyak 4 plot. Tanah rizosfer diambil menggunakan spatula kecil pada setiap jenis tumbuhan pancang yang ditemukan di 3 titik sampling masing-masing plot pada kedalaman ± 20 cm. Maulana et al (2022) menyatakan bahwa di kedalaman 10-15 cm untuk memaksimalkan potensi tanah yang memiliki bakteri Actinomycetes. Sampel tanah dari kelima titik sampling di tiap lokasi masing masing dalam satu plot tanaman dengan jenis yang sama dikomposit kemudian disimpan dalam kantong plastik steril yang sudah diberi label sesuai lokasi titik pengambilan sampel (Pas dkk. 2017). Selanjutnya diukur faktor fisikokimia tanah rizosfer di setiap lokasi, yaitu pH, suhu, dan kelembapan tanah.

Penyiapan Medium Tumbuh

Bahan-bahan untuk membuat media SCA (Strach Casein Agar) 10 gram pati, 3 gram Casein, 2 gram KNO₃, 0,05 gram MgSO₄, 7H₂O, 2 gram K₂HPO₄, 10 gram NaCl, 0,02 CaCO₃, 0,01 gram FeSO₄, 7H₂O, 10 gram, dan 1 liter aquadest ditambahkan 25 μ l zat fungsi/nystatin ke dalam media, penambahan zat ini bertujuan untuk mencegah pertumbuhan jamur mikroskopis yang tidak diinginkan saat media digunakan (Microbeholi, 2020).

Isolasi dan Purifikasi Actinomycetes

Sampel akar dipanaskan terlebih dahulu dengan aquades (1:1 v/v) pada suhu 60°C selama 15 menit (Mangamuri et al., 2012; Malek et al., 2014). Suspensi akar diencerkan hingga konsentrasi 1-5 dan 100 μ l di inokulasik ke dalam pati casein agar (SCA) menggunakan pelat datar. 25 μ g/ml sikloheksimid dan 25 μ g/ml nystatin ditambahkan ke dalam campuran. Cawan petri di simpan pada suhu 28 \pm 2°C selama 10-28 hari. Sebagian

dari (CFU) dihasilkan dan diklon dengan morfologi berbeda dan diklasifikasikan sebagai RHA untuk selanjutnya ditransfer ke RHA sebagai isolat.

Seleksi Actinomycetes yang Memiliki Aktivitas Anticandida

Media tumbuh menggunakan Potato Dextrose Agar (PDA), media PDA ditimbang sebanyak 1,053 g dalam tabung erlenmeyer dan dengan 27 mL aquades. Media dipanaskan hingga mendidih pada hotplate. Jika media sudah mendidih diangkat dan kemudian disteri di autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Setelah selesai di sterilkan, media PDA dituangkan seperempat tinggi tabung pada masing-masing tabung reaksi yang sudah di oven kemudian dimiringkan (jangan sampai agar keluar dari tabung) dan dibiarkan sampai media agar padat. Setelah media dalam tabung padat panaskan ose dengan ujung bulat pada bunsen sampai berpijar lalu anginkan dipinggir api. Setelah cukup dingin, masukan ose tersebut kedalam biakan bakteri *Candida albicans* dan masukan pada media agar miring dengan hanya ditempelkan dipermukaan agar yang sudah padat. Kemudian inkubasi sampai bakterinya tumbuh dan dilakukan pertumbuhan media cair.

Seleksi Actinomycetes yang Memiliki Aktivitas Anticandida

Bakteri di identifikasi berdasarkan karakter morfologi dan karakter molekuler. Karakter morfologi secara makroskopis seperti warna koloni, bentuk miselium, dan permukaan koloni adapun karakter makroskopis meliputi bentuk sel dan respon sel terhadap warna, dan untuk ornamen spora menggunakan SEM.

Karakter molekuler melalui beberapa tahapan yaitu ekstraksi DNA, amplifikasi gen 16S rRNA, visualisasi pada agarose gel elektroforesis, sekuensing gen 16S rRNA dan analisis kekerabatan melalui rekonstruksi pohon filogenetik.

Identifikasi Actinomycetes

Menurut (Retnowati, 2017) Karakteristik molekuler isolat Actinomycetes diturunkan dari beberapa tahapan diantaranya ekstraksi DNA, amplifikasi gen 16S rRNA, visualisasi pada agarose gel elektroforesis, sekuensing gen 16S rRNA dan analisis kekerabatan melalui rekonstruksi pohon filogenetik.

Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif, hasil pengamatan Actinomycetes penghasil senyawa antibiotik disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Hasil kemampuan Actinomycetes dalam menghambat aktivitas *Candida albicans* disajikan dalam bentuk tabel dan gambar, dan untuk hubungan kekerabatan Actinomycetes menggunakan tehnik berbasis molekuler yang disajikan dalam bentuk karakterisasi tingkat molekuler berupa DNA Barcoding dan pembuatan pohon filogenetik

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Penelitian untuk mendapatkan Actinomycetes dilaksanakan di ekosistem karst yang ada di Gorontalo dengan tiga titik sampling yaitu di lokasi pertama terletak di bukit Bangga kecamatan Paguyaman Pantai dengan titik koordinat 0°29'47.55"N ;122° 33'6"E, perbukitan Olohuta kecamatan Kabila Bone dengan titik koordinat 0°25'10.05"N; 123°5'53.44"E dan bukit Panipi sekitaran danau limboto dengan titik koordinat 0°32'43.22"N; 122°59'51.80"E.



Gambar 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel

Setiap lokasi sampling memiliki karakter fisiko kimia yang cenderung memiliki pH yaitu 6,3 pada titik 2 dan 6,4 pada titik 1 dengan kelembapan yang berbeda-beda yaitu 2%, 1,5% dan 1% dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Parameter Sampel Tumbuhan

Parameter	Lokasi 1	Lokasi 2	Lokasi 3
pH tanah	6,5	5,5	7,04
Kelembapan (%)	1,2	2,5	3,24

Berdasarkan hasil survey dari tiga titik sampling terdapat 38 sampel rhizosfer tumbuhan, dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Jenis Sampel Tumbuhan

No	Lokasi 1	Lokasi 2	Lokasi 3
1.	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Imperata cylindrical</i>	<i>Andrachne telephioides L.</i>
2.	<i>Morinda citrifolia L.</i>	<i>Casabela tavetia</i>	<i>Jatropha curcas L.</i>
3.	<i>Desmostachya bipinnata L.</i>	<i>Jasminum finesis</i>	<i>Celtis phillipensis</i>
4.	<i>Ara jejawi</i>	<i>Barleria prionitis L.</i>	<i>Phyllanthus niruri L.</i>
5.	<i>Lenjera benjein</i>	<i>Malastoma malabathrum L.</i>	<i>Acalypha indica L.</i>
6.	<i>Murraya paniculata</i>	<i>Ricinus communis</i>	<i>Parcea americana</i>
7.	<i>Barleria prionitis L.</i>	<i>Strabius asper lour</i>	<i>Macaraiga tanarius L.</i>
8.	<i>Justicia gendarussa burm.f.</i>	<i>Porophyllum rudérale cass</i>	<i>Oraganium majorana L.</i>
9.	<i>Ficus Americana</i>	<i>Veronica cymbalaria</i>	<i>Chromolaena odorata</i>
10.	<i>Terminalia catappa L.</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Vallisneria spiralis</i>
11.	<i>Jatropha curcas</i>	<i>Rivina humilis L.</i>	<i>Polypodiophyta</i>
12.	<i>Justicia gendarussa Burm.f.</i>	<i>Pina Lapulacea</i>	<i>Lentana cemara</i>
13.		<i>Chromolaena odorata</i>	<i>Phytolacca americana L.</i>

Deteksi keberadaan Actinomycetes dilakukan dengan cara menumbuhkan Actinomycetes dari masing-masing sampel tanah rhizosfer yang ditemukan di ketiga lokasi tersebut dengan menggunakan medium Starct casein agar (SCA). Hasil menunjukkan bahwa dari 38 jenis tumbuhan yang di dapatkan di ketiga lokasi pengambilan sampel, Actinomycetes hanya berasosiasi dengan 5 jenis tumbuhan yang terdapat di lokasi berbeda-beda. Diantaranya yaitu Lokasi 1 Actinomycetes berasosiasi dengan 1 jenis tumbuhan (*Laucaena leucocephala*), lokasi 2 Actinomycetes berasosiasi dengan dengan 2 jenis tumbuhan (*Imperata cylindrical* dan *Malastoma malabathrum L.*), dan lokasi 3 Actinomycetes berasosiasi dengan 2 jenis tumbuhan (*Polypodiophyta* dan *Mancaraga tanarius*) terlihat pada tabel 3.

Tabel 3. Jenis Tumbuhan yang Berasosiasi Dengan Actinomycetes di Ekosistem Karst Gorontalo

Lokasi	Jenis Tumbuhan	Kode Isolat
Bukit Bangga	<i>Laucaena leucocephala</i>	KSL1
Perbukitan	<i>Imperata cylindrical</i>	KS1c
Panipi	<i>Malastoma malabathrum L.</i>	KSMml-P
		KSMml-Aa
Perbukitan	<i>Polypodiophyta</i>	KRp-K
Olohuta	<i>Mancaraga tanarius</i>	KRp-Hp
		KSMt

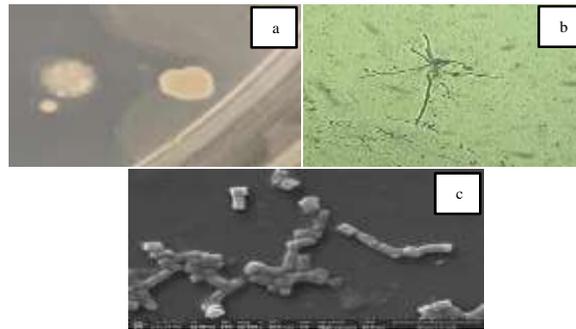
Tabel ini menunjukkan bahwa Actinomycetes tidak berasosiasi dengan semua jenis tanaman, hanya berasosiasi pada *Laucaena leucocephala*, *Imperata cylindrical*, *Malastoma malabathrum L.*, *Mancaraga tanarius* dan *Polypodiophyta*.

Isolat Actinomycetes yang berasosiasi dengan masing-masing jenis tanaman selanjutnya dilakukan pemurnian, sehingga di peroleh 7 isolat yang masing-masing sudah di kodei dengan isolat KSL1 yang berasosiasi di jenis tumbuhan *Laucaena leucocephala*, isolat KS1c yang berasosiasi di jenis tumbuhan *Imperata cylindrical*, isolat KRp-K dan isolat KRp-Hp yang berasosiasi di jenis tumbuhan *Polypodiophyta*, isolat KSMml-P dan isolat KSMml-Aa yang berasosiasi di jenis tumbuhan *Malastoma malabathrum L.*, serta isolat KSMt yang berasosiasi di jenis tumbuhan *Mancaraga tanarius*.

Isolat KSL1

Isolat KSL1 memiliki ciri morfologi antara lain misellium areal berwarna putih dengan bentuk koloni tak teratur dan tepi yang bergerigi, serta bentuk misellium substratnya berwarna putih. Hasil pengamatan mikroskopik

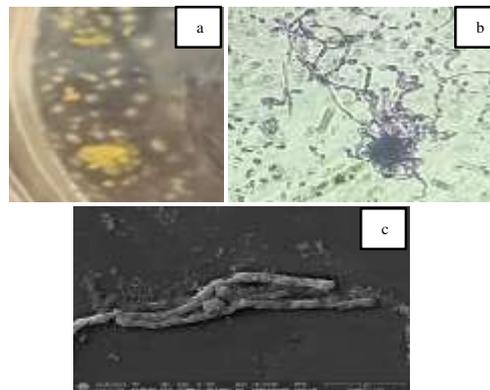
termasuk dalam gram positif dan memiliki akar yang tidak beraturan, ber dasarkan pengamatan bentuk ornamen spora isolat ini berbentuk batang berantai, terlihat pada gambar 2.



Gambar 2. a: Koloni Isolate, b: Hasil Pewarnaan Gram, c: Ornamen Spora

Isolat KSIc

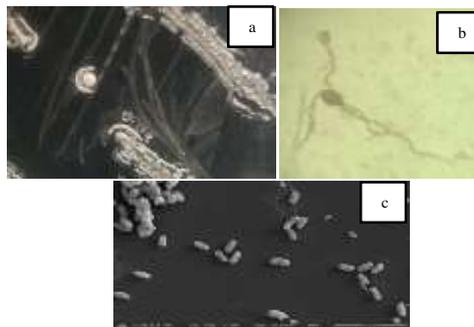
Isolat KSIc yang memiliki ciri morfologi antara lain misellium aerial berwarna kuning dengan bentuk koloni oval dan bentuk tepi yang utuh serta miselium substratnya berwarna kuning. Hasil pengamatan mikroskopik termasuk dalam gram positif dan memiliki akar yang tidak beraturan, berdasarkan pengamatan bentuk ornamen spora isolat ini berbentuk batang berantai, terlihat pada gambar 3.



Gambar 3. a: Koloni Isolate, b: Hasil Pewarnaan Gram, c: Ornamen Spora

Isolat KSMml-P

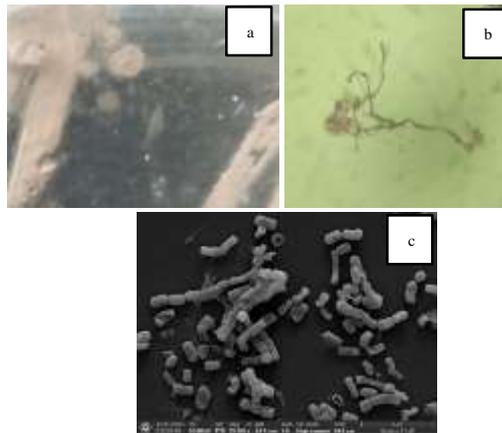
Isolat KSMml-P memiliki ciri morfologi antara lain misellium aerial berwarna putih dengan bentuk koloni oval dan bentuk tepi yang utuh serta miselium substratnya berwarna coklat muda, berdasarkan pengamatan bentuk ornamen spora isolat ini berbentuk batang tidak berantai, terlihat pada gambar 4.



Gambar 4. a: Koloni Isolate, b: Hasil Pewarnaan Gram, c: Ornamen Spora

Isolat KSMml-Aa

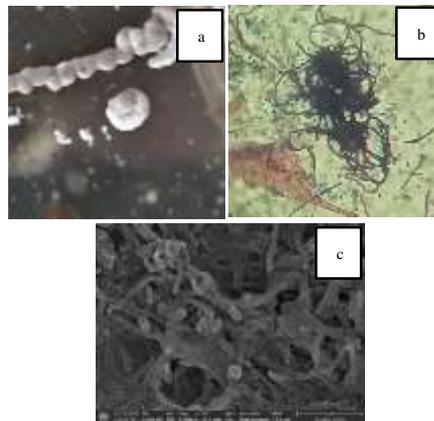
Isolat KSMml-Aa memiliki ciri morfologi antara lain misellium aerial berwarna abu-abu dengan bentuk koloni oval dan bentuk tepi yang utuh serta miselium substratnya berwarna abu-abu. Hasil pengamatan bentuk ornamen spora isolat ini berbentuk batang berantai, terlihat pada gambar 5.



Gambar 5. a: Koloni Isolate, b: Hasil Pewarnaan Gram, c: Ornamen Spora

Isolat KRp-Hp

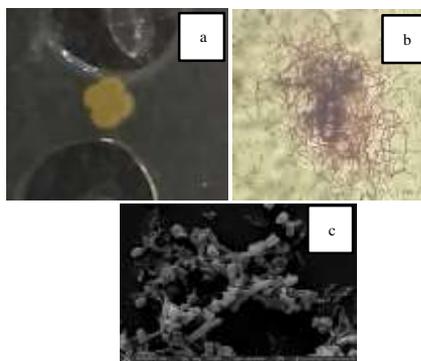
Isolat KRp-Hp memiliki ciri morfologi antara lain misellium aerial berwarna putih dengan bentuk koloni oval dan bentuk tepi yang utuh serta miselium substratnya berwarna hitam. Hasil pengamatan bentuk ornamen spora isolat ini berbentuk batang berantai, terlihat pada gambar 6.



Gambar 6. a: Koloni Isolate, b: Hasil Pewarnaan Gram, c: Ornamen Spora

Isolat KRp-K

Isolat ini memiliki ciri morfologi antara lain misellium aerial berwarna putih dengan bentuk koloni oval dan bentuk tepi yang utuh serta miselium substratnya berwarna kuning. Hasil pengamatan mikroskopik termasuk dalam gram positif dan memiliki akar yang tidak beraturan, berdasarkan pengamatan bentuk ornamen spora isolat ini berbentuk batang berantai, terlihat pada gambar 7.



Gambar 7. a: Koloni Isolate, b: Hasil Pewarnaan Gram, c: Ornamen Spora

Isolat KSmt

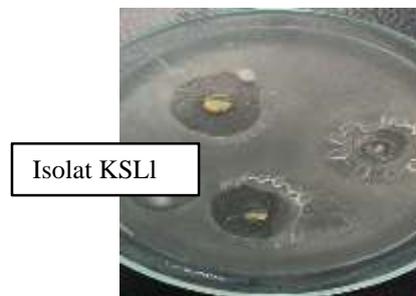
Isolat KSmt memiliki ciri morfologi antara lain misellium aerial berwarna putih dengan bentuk koloni oval dan bentuk tepi yang utuh serta miselium substratnya berwarna putih, berdasarkan pengamatan bentuk ornamen spora isolat ini berbentuk batang berantai, terlihat pada gambar 8.



Gambar 8. a: Koloni Isolate, b: Hasil Pewarnaan Gram, c: Ornamen Spora

Deskripsi Aktivitas Anticandida

Isolat Actinomycetes yang diperoleh tersebut kemudian dilakukan pengujian aktivitas anticandida dengan menggunakan medium Mouller hinton agar (MHA). Kemampuan aktivitas anticandida ditunjukkan dengan terdapat zona bening yang terbentuk disekitaran koloni (Gambar 4.9). Hasil pengukuran zona bening yang disekitar koloni isolat Actinomycetes menunjukkan perbesaran kemampuan aktivitas anticandida dengan diameter yang bervariasi pada masing-masing isolat Actinomycetes yaitu 10,5 mm dan 17,3 mm, dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Zona Bening yang Terbentuk Disekitar Isolat Actinomycetes, Zona Bening Menunjukkan Aktivitas Anticandida Masing-Masing Isolat

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa tidak semua isolat Actinomycetes menunjukkan aktivitas anticandida, hanya ditemukan di 2 isolat Actinomycetes yaitu kode KSLI yang berasosiasi pada rhizosfer tumbuhan *Leucaena leucocephala* dan KSIC yang berasosiasi pada rhizosfer tumbuhan *Imperata cylindrical*. dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Aktivitas Anticandida Isolat Actinomycetes dari Rhizosfer Tumbuhan di Ekosistem Karst

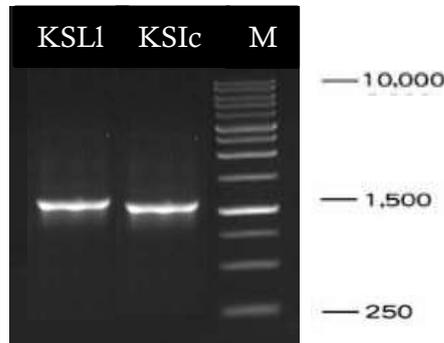
No	Kode Isolat <i>Actinomycetes</i>	Aktivitas Anticandida	Diameter (mm)
1.	KSLI	+	10,5
2.	KSIC	+	17,5
3.	KRp-K	-	0
4.	KRp-Hp	-	0
5.	KSMml-P	-	0
6.	KSMml-Aa	-	0
7..	KSMt	-	0

Hasil penelitian menunjukkan bahwa untuk isolat Actinomycetes yang memiliki potensi anticandida, dari 7 isolat diperoleh hanya 2 isolat Actinomycetes yang memiliki potensi anticandida, yaitu isolat KSIC yang berasosiasi dengan jenis tumbuhan *Imperata cylindrical* dan isolat KSLI yang berasosiasi dengan jenis tumbuhan *Leucaena leucocephala*.

Hubungan Kekeberatan Actinomycetes Isolat KSLI dan KSIC Penghasil Senyawa Antibiotik

Hubungan kekerabatan isolat KSLI dan isolat KSIC di analisis berdasarkan karakter molekuler sequence gen 16S rRNA dan dilakukan rekonstruksi pohon filogenetik. Analisis molekuler dilalui dengan beberapa tahapan, yaitu ekstraksi DNA, amplifikasi gen 16s rRNA, sequencing, dan rekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan pada metode jarak (Distance based) yaitu Naihgtbor Joining Tree dengan Boostrep 1000 x dalam software MEGA 11.

Hasil ekstraksi genom DNA kedua isolat dilakukan pengukuran kemurnian secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 dan 280 dan diperoleh kemurnian DNA masing-masing 2,01 dan 1,90. Hasil tersebut menunjukkan bahwa DNA genom mencapai kemurnian dan memenuhi syarat untuk digunakan pada tahap amplifikasi gen. Amplifikasi gen 16S rRNA menggunakan primer 27F dan 1492R dan sebanyak 35 siklus berhasil diperoleh panjang pita DNA 1500bp, dapat dilihat pada gambar 10.



Gambar 10. Elektrogram Gen 16r rNA Isolat KSL1 dan Isolat KSIc Actinomycetes dengan Primer 27F dan 149R

Gen 16rRNA dilakukan sekuens berdasarkan metode B-directional dan diperoleh hasil sekuens gen 16rRNA dengan panjang basa pada isolat KSL1 1387bp dan panjang basa pada isolat KSIc 1387bp.

Hasil Blast Isolat KSL1 dan KSIc

Hasil blast terhadap NCBI pada isolat KSL1 dan KSIc diperoleh bakteri dari genus Streptomyces. Hasil isolat KSL1 dan KSIc menunjukkan score dengan nilai 100% dengan query cover mencapai 99-100% dengan percentage identity berada pada kisaran yang beragam, yaitu isolat KSL1 berada pada kisaran 99.50% - 99.64%. Adapun untuk isolat KSIc menunjukkan score dengan nilai 99.35% - 99.64% dan e-value yang masing-masing menunjukkan nilai 0.0. Hal tersebut menyatakan bahwa adanya kemiripan sekuens dengan spesies yang dibandingkan, sejalan dengan pernyataan Wehantouw., dkk (2017) bahwa presentase indeks kemiripan sekuens yang terdapat pada nilai lebih dari 99% menunjukkan bahwasanya spesies yang dibandingkan merupakan spesies yang sama.

Skor merupakan total nilai yang terdapat dari pensejajaran antara sekuens masukan (input sequence/query) dengan sekuens data base. Query cover merupakan presentase yang menggambarkan besar/panjang kesesuaian sekuens masukan jika dibandingkan dengan sekuens DNA target. Selanjutnya, percentage identity merupakan suatu presentage yang menunjukkan seberapa sesuai antara sekuens DNA masukan dengan sekuens DNA target. E-value yang menunjukkan nilai 0.0 yang berarti tidak ada kemungkinan bahwa kejadian pensejajaran tersebut terjadi secara kebetulan. E value yang baik adalah mendekati nol (0).

Sekuens gen 16S rRNA dilakukan rekonstruksi pohon filogenetik guna untuk menentukan hubungan kekerabatan isolate KSL1 dengan KSIc sekuens yang tersedia pada gen bank NCBI. Isolat KSL1 dan isolat KSIc berkerabat dekat dengan tingkat kekerabatan 100%. Isolat KSL1 dapat berkerabat dengan genus Streptomyces aeqiptia dengan tingkat kekerabatan 99,64% sedangkan isolat KSIc berkerabat dekat dengan Streptomyces sp dengan tingkat kekerabatan 99,57%, terlihat pada gambar 11.



Gambar 11. Pohon Filogenetik Sekuens ISL1 dan IS1c Menggunakan Algoritma Neighbor Joining Hasil Sekuensing Dengan Bootstrap 1000 ×. Pengukuran Jarak Genetic

Pembahasan

Actinomycetes adalah bakteri Gram positif yang berbentuk filamentus dan mampu membentuk spora. Biasanya bakteri kelompok ini mengalami pembelahan kompleks dan dapat menghasilkan beragam senyawa bioaktif dibandingkan dengan kelompok bakteri yang lain (Dewi, 2014). Keanekaragaman Actinomycetes sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungannya seperti faktor kimia, fisika dan biologi diantaranya pH tanah, kelembaban, suhu, serta senyawa kimia tanah (George et al. 2012).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pH tanah di lokasi karst di bukit Bangga dengan titik koordinat 0°29'47.55"N ;122° 33'6"E, Perbukitan danau limboto dengan titik koordinat 0°32'43.22"N;122°59'51.80"E, dan perbukitan Olohuta dengan titik koordinat 0°25'10.05"N; 123°5'53.44"E cenderung memiliki kisaran pH 6,5, 5,5 dan 7,04 (netral). Hal ini mendukung untuk pertumbuhan Actinomycetes yang dapat hidup pada kisaran pH netral cenderung basah, sesuai dengan pernyataan Mayasari (2020) terdapat pH minimum, pH optimum, dan pH maksimum dalam pertumbuhan bakteri yang dimana rentang pH bagi pertumbuhan bakteri antara 4-9 dengan pH optimal 6,5 - 7,5. Hal ini sesuai dengan penelitian Gustiana, Rozirwan dan Ulqodry (2021) pH dapat mempengaruhi kerja enzim dan permeabilitas sel, yang kemudian akan berdampak pada metabolisme sekaligus terhadap pertumbuhan bakteri. Actinomycetes memiliki rentang hidup pada pH netral cenderung basa. Rentang pH yang paling sesuai untuk populasi Actinomycetes berkisar antara 6,5 sampai 8,0. Sari et al. (2012) menyatakan bahwa populasi Actinomycetes di tanah asam (pH 5.14-6.16) masih dapat tumbuh, tetapi tidak optimal. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Lee et al., (2014), semakin asam maka kandungan Actinomycetes akan menurun. Faktor fisikokimia lain yang bisa mempengaruhi pertumbuhan Actinomycetes adalah kelembapan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada lokasi bukit bangga, perbukitan danau limboto dan bukit olohuta kisaran memiliki kelembapan 1,2%, 2,5% dan 3,24%.

Spesifikasi fisikokimia masing-masing rizosfer hampir seragam. Akan tetapi hal lain yang sangat mempengaruhi kepadatan mikroba di rizosfer adalah eksudat yang dihasilkan oleh masing-masing jenis tumbuhan. Eksudat merupakan asam-asam organik yang dihasilkan oleh sistem perakaran yang diekskresikan ke lingkungan. Kuantitas dan kualitas eksudat akar ditentukan oleh jenis tanaman, umur tanaman, dan faktor eksternal seperti faktor biotik dan cekaman lingkungan (Li et al. 2014). Eksudat akar mengandung berbagai senyawa antara lain asam amino, asam organik, gula, fenol, tanin, alkaloid dan berbagai metabolit sekunder lainnya (Walker et al. 2003). Melimpahnya eksudat akar yang banyak terdapat karbon organik yang biasa dijadikan alat komunikasi untuk mengundang berbagai mikroba tanah untuk mengkoloni daerah tersebut (Zhuang et al. 2013). Namun tidak semua eksudat yang dihasilkan oleh sistem perakaran mendukung pertumbuhan mikroba rizosfer. Kemampuan sel dalam mengekskresikan eksudat memiliki korelasi spesifik dengan jenis mikroba di lingkungan rizosfer yang mempengaruhi kepadatan populasi, distribusi dan keragaman mikroba, diantaranya Actinomycetes (Katili dan Retnowati, 2017).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari ketiga lokasi yang sudah dilakukan survey dan sudah berhasil teridentifikasi di dapatkan ada 38 jenis tumbuhan pada ekosistem karst, hal ini menunjukkan bahwa terdapat aktivitas bakteri seperti Actinomycetes pada tanah yang berasosiasi dengan akar tumbuhan. Hasil isolasi dan purifikasi dari 38 jenis tumbuhan tersebut Actinomycetes hanya berasosiasi dengan 5 jenis tumbuhan yang terdapat di masing-masing lokasi yakni lokasi 1 bukit Bangga terdapat 1 jenis tumbuhan yaitu *Laucaena leucocephala*, lokasi 2 perbukitan danau Limboto terdapat 2 jenis tumbuhan yakni Imperata cylindrical dan *Malastoma malabathrum* L. dan terakhir lokasi 3 perbukitan Olohuta terdapat 2 jenis tumbuhan yakni *Polypodiophyta* dan *Mancaraga tanarius*. Pada umumnya, akar tanaman adalah salah satu sumber potensi yang sangat baik dari strain Actinomycetes langka dan bisa menghasilkan metabolit sekunder baru (Matsumoto & Takashi, 2017).

Hasil pengujian aktivitas anticandida dari isolat Actinomycetes yang diperoleh dari sampel tanah rizosfer dari 5 jenis tumbuhan di tiga lokasi menunjukkan bahwa mampu menghambat pertumbuhan bakteri *C.albicans*. Hal tersebut dibuktikan dengan terdapat zona bening atau zona hambat di sekitaran koloni. Menurut De Simeis, Serra (2021) Actinomycetes adalah sumber sejumlah besar antibiotik alami dan semisintetik dan merupakan produsen metabolit sekunder yang struktur kimianya telah mengilhami penemuan antibiotik sintesis sepenuhnya baru.

Hasil menunjukkan dari 5 jenis tumbuhan di dapatkan 7 isolat Actinomycetes, dan dari 7 isolat tersebut hanya 2 isolat yang mampu menghambat aktivitas anticandida. Kedua isolat tersebut dapat menghambat aktivitas *C. albicans* yang dibuktikan dengan adanya zona bening dengan diameter yang berbeda-beda, pada isolat KSL1 dapat menghambat aktivitas *Candida albicans* dengan diameter 10,5 mm dan pada isolat KSIc juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Candida albicans* dengan diameter 17,3 mm. Dari kedua isolat tersebut yang memiliki zona hambat yang tinggi yakni isolat KSIc hal ini dikarenakan adanya perbedaan enzim yang terkandung di setiap bakteri, sesuai dengan pernyataan Imron (2016) laju pertumbuhan spesifik untuk setiap bakteri berbeda-beda dikarenakan kandungan enzim pada masing-masing bakteri berbeda hingga mempengaruhi proses metabolisme bakteri dalam menghasilkan metabolit sekunder. Iqlima (2017) meloparkan bahwa pada penelitiannya mendapatkan adanya perbedaan zona bening pada tiap-tiap waktu disebabkan oleh senyawa antimikroba yang dihasilkan ketika menuju fase kematian berbeda berdasarkan kurva pertumbuhan. Tinggi

rendahnya hasil penghambatan yang diperoleh bergantung pada kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan senyawa antibakteri. zona bening tidak dapat terbentuk pada saat bakteri menuju fase kematian dikarenakan bakteri kurang optimal dalam menghasilkan metabolit sekunder berupa senyawa antibakteri (Iqlima et al., 2017). Adapun menurut Maida & Lestari (2019) antibiotik merupakan senyawa kimia yang berawal dari bakteri atau jamur yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme.

Identifikasi karakter morfologi menunjukkan bahwa isolat KSLI memiliki misellium areal yang berwarna putih dengan bentuk koloni tak teratur dan tepi yang bergerigi, serta bentuk misellium substratnya berwarna putih, isolat KSIC memiliki karakter morfologi dengan misellium aerial yang berwarna kuning dengan bentuk koloni oval dan berbentuk tepi yang utuh serta misellium substratnya berwarna putih. Pada isolat Actinomycetes perbedaan warna pada masing-masing isolat terjadi karena adanya pigmen rantai spora yang dimiliki oleh bakteri Actinomycetes yang dimana hal tersebut yang menyebabkan keanekaragaman warna pada isolat (Buedenbender et al., 2017).

Pewarnaan gram dilakukan guna untuk menggolongkan bakteri dalam dua kelompok yaitu gram positif dan gram negatif. Hasil identifikasi mikroskopik menunjukkan bahwa bentuk sel dan respon sel terhadap pewarnaan gram pada isolat KSLI dan isolat KSIC menunjukkan karakter genus Streptomyces. Anggota genus Streptomyces mempunyai ciri bentuk batang bercabang, warna ungu dan termasuk pada kelompok gram positif (Ambarwati, et al., 2010).

Pengujian ornamen rantai spora dilakukan guna untuk melihat bentuk karakter atau bentuk spora dari masing-masing isolat dengan menggunakan SEM (Scanning Electron Microscopy). Hasil SEM menunjukkan bahwa isolat KSLI dan isolat KSIC memiliki karakter dan bentuk spora yang sama dengan Actinomycetes yaitu dari genus Streptomyces yaitu berbentuk batang pendek dan berantai. Hal ini sejalan dengan penelitian (Ambarwati dkk., 2010) ciri anggota genus Streptomyces dapat diketahui dari bentuk spora dan morfologi serta ornamen permukaan rantai spora yang berbentuk rantai pendek. Hasil penelitiannya menunjukkan isolat unggul yang ditemukan termasuk anggota genus Streptomyces. Menurut Retnowati et al (2024) pada penelitiannya juga menunjukkan bentuk dan morfologi spora pada genus Streptomyces adalah berbentuk batang pendek dan berantai. Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat KSLI dan KSIC memiliki tingkat kekerabatan yang sangat dekat dengan indeks 100% dan termasuk pada genus Streptomyces sp. Hal tersebut diartikan bahwa kedua isolat yakni KSLI dan KSIC termasuk pada kelompok Actinomycetes. banyak penelitian yang menyatakan bahwa Streptomyces sp memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa antibiotik yang mampu untuk menghambat mikroorganisme antagonis salah satunya ialah jamur. Streptomyces sp sering kali digunakan sebagai agen anti jamur karena memiliki metabolit primer maupun sekunder yang mampu untuk membunuh jamur patogen (Sari et al., 2012). Isolat KSLI berkerabat dengan Streptomyces aegyptia dengan nilai kekerabatan 99,64%, sedangkan isolat KSIC berkerabat dengan Streptomyces sp dengan tingkat kekerabatan 99,57%.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolat Actinomycetes yang terdapat di 3 lokasi pengambilan sampel dari 38 jenis tumbuhan Actinomycetes hanya berasosiasi di 5 jenis tumbuhan dan dihasilkan 7 isolat Actinomycetes dengan memiliki koloni berbeda-beda, tampilan warna morfologi koloni beragam yaitu kuning, abu-abu, hitam dan putih, dan hasil pengecatan gram berwarna ungu yang berarti gram positif;
2. Dari 7 isolat Actinomycetes, hanya 2 isolat (KSLI & KSIC) yang mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans* dengan diameter yang masing-masing 10,5 mm dan 17,3 mm. Zona hambat tertinggi dimiliki oleh isolat KSIC yang berasosiasi di jenis tumbuhan *Imperata cylindrical*;
3. Berdasarkan hasil identifikasi secara molekuler diketahui bahwa 2 isolat yang mampu menghambat aktivitas *Candida albicans* yaitu isolat KSLI dan isolat KSIC berkerabat dekat dengan tingkat kekerabatan 100%, isolat KSLI sangat berkerabat dekat dengan genus Streptomyces aegyptia dengan tingkat kekerabatan 99,64%, dan isolat KSIC berkerabatan dekat dengan Streptomyces sp dengan tingkat kekerabatan 99,57%.

REFERENSI

- Ambarwati, Soegihardjo, C. J., & Langkah Sembiring. (2010). Isolasi dan identifikasi streptomyces dari rizosfer jagung (*Zea mays* L.) yang berpotensi sebagai penghasil antibiotika isolation and identification of Streptomyces from rhizosphere of corn (*Zea mays* L.) that is potential to be antibiotic producer. 15(1), 1-7.
- Buedenbender, L., Carroll, A. R., Ekins, M., & Kurtböke, D. I. (2017). Taxonomic and metabolite diversity of Actinomycetes associated with three Australian ascidians. Diversity, 9(4). <https://doi.org/10.3390/d9040053>

- De simeis, d., & serra, s. (2021). Actinomycetes; a never-ending source of bioactive compounds an overview on antibiotics production. In antibiotics (vol. 10, issue 5). Mdpi ag. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050483>
- Fatmawati, u., meryandini, a., asih nawangsih, a., & tri wahyudi, a. (2019). Screening and characterization of actinomycetes isolated from soybean rhizosphere for promoting plant growth. Biodiversitas, 20(10), 2970-2977. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d201027>
- Imron, M.F., dan Purwati, I.F., 2016, Uji Kemampuan Bakteri Azotobacter S8 dan Bacillus Subtilis untuk membersihkan Trivalent Chorium (Cr³⁺) pada limbah cair, J. Teknik ITS., 5 (1):4-10
- Iqlima, D., Ardiningsih P., Wibowo M.A.2017. Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit B2D Dari Batang Tanaman Yakon (*Smallanthus Sonchifolius* (POEPP. & Endl.) H. rob.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* dan *Salmonella Thypimurium*. Jurnal Kimia Khatulistiwa, 7(1), 36-43.
- Katili., A., S. And Retnowati., Y. 2017. Isolation Of Actinomycetes From Mangrove Ecosystem In Torosiaje, Gorontalo, Indonesia. Biodiversitas. 18(2):826-833.
- Lima, S.M., Melo, J.G., Militao, G.C., Lima, G.M., do Carmo, A.L.M., Aquiar, J.S., Araujo, R.M., Braz-Filho, R., Marchand, P., Araujo, J.M., & Silva, T.G. 2017. Characterization of the biochemical, physiological, and medicinal properties of *Streptomyces hygrosopicus* ACTMS-9H isolated from the Amazon/Brazil. Appl Microbiol. Biotechnol. 101:711-723.
- Maida, Sakteri Gram Positif 2019). Aktivitas Antibakteri Amoksisilin Terhadap Bakteri Gram Positif Dan Bakteri Gram Negatif. Jurnal Pijar Mipa, 14(3), 189-191. <https://doi.org/10.29303/jpm.v14i3.1029>
- Mangamuri UK, Muvva V. Poda S, Kamma S. 2012. Isolasi, Identifikasi dan Karakterisasi Molekuler Actinomycetes Langka dari Ekosistem Mangrove Nizampatnam. Mikrobiol Melayu J 8 (2): 83-91
- Matsumoto, a., & takahashi, y. (2017). Endophytic Actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. In journal of antibiotics (vol. 70. issue 5, pp. 514-519). <https://doi.org/10.1038/ja.2017.20> Nature publishing group.
- Maulana Rayhan, Meiskha Bahar, Nunuk Nugrohawati. 2022. Efektivitas Isolat Actinomycetes dari Sampel Tanah Kebun Raya Bogor dalam Menghambat Pertumbuhan *Salmonella typhi* Secara In Vitro. Prosiding Seminar Nasional Riset Kedokteran (SENSORIK). 147-155
- Microbeholic 2020. Starch Casein agar (SCA)-Definisi, Komposisi Cara Pembuatan dan Interpretasi Hasil.
- Nurmujahidin, giyanto, g., & dadang. (2023). Biological control of bacterial gr rot disease caused by burkholderia glumac using Actinomycetes. Jum fitopatologi indonesia, 19(2), 63-73. <https://doi.org/10.14692/jfi.19.2.73>
- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Microbiol Clin Rev. 2007;20:133-63, <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>
- Pas Aris Aksarah, Didy Sopandie, Trikoesoemaningtyas, Dwi Andreas Santosa.2017. Eksplorasi Konsorsium Mikrob Filosfer dan Rizosfer Asal Berbagai Ekosistem Di Kabupaten Sigi Provinsi Sulawesi Tengah. Jurnal Agrotech. 8(1) 8-17
- Puspita D. Notosoedarmo S, Fauzi Mr. Studi Etnobotoni Di Kawasan Kars Bukit Bulan Untuk Mendukung Studi Arkeologi. Jpsl.
- Raja, A. & Prabakara, P. 2011 Actinomycetes and drug an overview. American J. of Drug Disc & Development. 1(2):75-84
- Rajeswari, P., Jose, P.A., Amiya, R., & Jebakumar, S.R.D. 2015. Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity. Front Microbiol, 5/753.01-11.
- Retnowati Y., L. Sembiring, S. Moeljopawiro, T.S. Djohan, S.S. Soetarto. 2017. Diversity of Antibiotic-producing Actinomycetes in Mangrove Forest of Torosiaje, Gorontalo. Diversity 18(4): 1453-146.
- Sari NM, Kawuri R, Khalimi K. 2012. *Streptomyces* sp. Sebagai Biofungisida Patogen *Fusarium oxysporum* (Schlecht) f.sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder. Et Hans. Penyebab Penyakit Layu pada Tanaman Toman (*Solanum lycopersicum*L). Agrotrop: Journal on Agriculture Science. 2(2): 161-169.