

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Aktinomisetes

Aktinomisetes atau aktinobakteria merupakan kelompok bakteri gram positif yang memiliki kandungan guanin (G) dan sitosin (C) tinggi pada DNA (Anandan *et al*, 2016). Aktinomisetes adalah mikroorganisme yang pertama kali ditemukan oleh Ferdinand Cohn pada tahun 1875 ketika mengamati organisme berfilamen dari saluran lakrimal. Aktinomisetes dalam bahasa Yunani memiliki arti “jamur cahaya (*ray fungus*)”. Aktinomisetes dapat ditemukan dalam bentuk spora atau bentuk vegetatif dalam berbagai habitat seperti tanah, lingkungan perairan, serasah, kompos dan sisa makanan. Aktinomisetes merupakan golongan prokariot penting yang dapat mensintesis produk metabolisme seperti antibiotik, pigmen, enzim inhibitor dan enzim yang berkaitan dengan bioteknologi (Sowani *et al.*, 2017).

2.1.1 Klasifikasi Aktinomisetes

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Actinobacteria
Class	: Actinobacteria
Orde	: Actinomycetales
Famili	: Actinomycetaceae Mycobacteriaceae Streptomyceae Actinoplanaceae
Genus	: Tropheryma Propionibacterium Micromonospora Salinispora

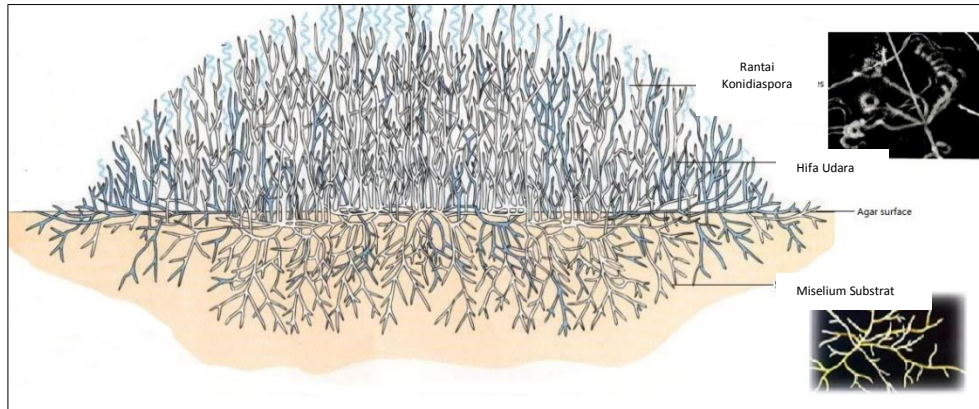
Mycobacterium
Nocardia
Corynebacterium
Gordonia
Streptomyces (Hogg, 2013)

Aktinobakteria mempresentasikan unit taksonomi terbesar di antara 18 garis keturunan yang saat ini diketahui dari domain *Bacteria* (Barka *et al.*, 2016). Filum Actinobacteria dibagi menjadi 6 kelas yaitu, Actinobacteria, Acidimicrobiia, Coriobacteriia, Nitrospirae, Rubrobacteria, dan Thermoleophilia (Anandan *et al.*, 2016). Wahyuni (2014) menyatakan bahwa aktinomisetes dapat dikelompokkan menjadi 13 sub ordo yang terdiri dari 48 famili dengan 219 genus. Genus pada filum aktinobakteria ini memiliki banyak keberagaman berdasarkan morfologi, fisiologi dan kemampuan metabolismenya (Barka *et al.*, 2016).

2.1.2 Morfologi Aktinomisetes

Aktinomisetes merupakan mikroorganisme prokaryot uniseluler yang tidak memiliki dinding sel, tetapi dapat menghasilkan miselium nonseptat yang lebih ramping. Aktinomisetes memiliki DNA yang kaya kandungan Guanin (G) dan Sitosin (C) pada kisaran 57% - 75%. Aktinomisetes berkembang biak melalui pembelahan biner atau dengan memproduksi spora (konidia), dan sporulasi melalui fragmentasi dan segmentasi (Anandan *et al.*, 2016).

Morfologi aktinomisetes terdiri dari miselium, rantai spora dan spora. Berdasarkan perbedaan fungsi dan morfologi, miselium aktinomisetes dapat dibagi menjadi dua, yaitu:



Gambar 2. 1 Koloni aktinomisetes dalam media agar (Terlihat rantai konidiospora, hifa udara dan miselium substrat).
(Sumber: Li, 2016)

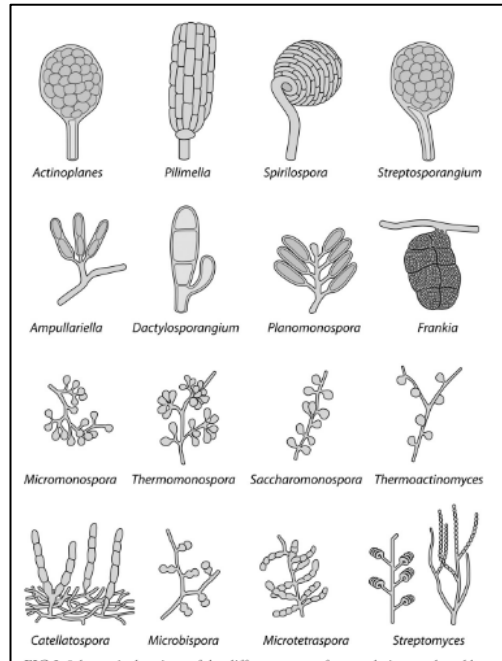
1. Miselium substrat

Miselium substrat juga dikenal sebagai miselium vegetatif atau miselium primer. Miselium substrat tumbuh ke dalam media atau di permukaan media kultur. Fungsi utama dari miselium substrat adalah menyerap nutrisi untuk pertumbuhan aktinobakteria (Li *et al.*, 2016). Secara mikroskopis, miselium substrat berbentuk ramping, transparan dan lebih bercabang jika dibandingkan dengan miselium udaranya. Hifa tunggal dari miselium substrat memiliki ketebalan 0,4 hingga 1,2 μm , tidak berseptat dan bercabang. Beberapa hifa dapat menghasilkan pigmen yang larut air dan larut lemak. Warna pigmen miselium substrat antara lain putih, kuning, oranye, merah, hijau, biru, ungu, coklat, hitam dan warna lainnya (Dhanasekaran & Jiang, 2016).

2. Miselium udara

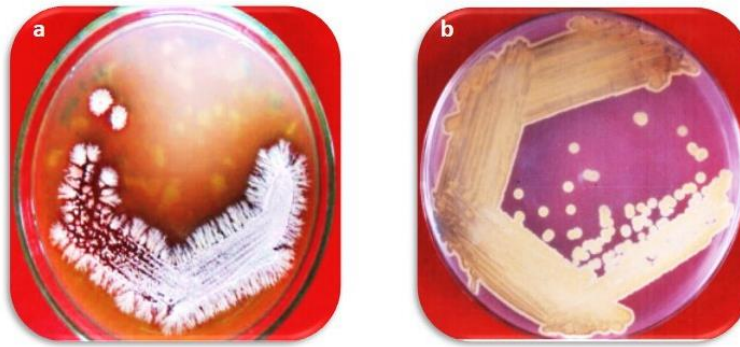
Miselium udara merupakan kumpulan dari hifa-hifa udara koloni aktinomisetes. Miselium udara memiliki ketebalan yang lebih tebal dibandingkan dengan miselium substrat. Karakterisasi hifa dari miselium udara aktinomisetes antara lain kasar, bias dan fase cerah. Miselium udara dan miselium substrat

aktinomisetes susah untuk dibedakan. Miselium udara pada beberapa genus dapat berkembang menjadi tingkatan tertentu pada bagian ujung membentuk rantai spora, sehingga disebut sebagai hifa reproduksi penghasil spora (Li *et al.*, 2016).



Gambar 2. 2 Ilustrasi tipe rantai spora yang dihasilkan oleh aktinomisetes
(Sumber: Barka *et al.*, 2016)

Rantai spora aktinomisetes berdasarkan panjang dan jumlah spora dibagi menjadi bispora dengan dua spora, oligospora dengan beberapa spora, dan polispora yang memiliki banyak spora. Panjang, bentuk, posisi dan warna rantai spora aktinomisetes merupakan dasar untuk klasifikasi (Li *et al.*, 2016). Anggota genus *Actinomadura*, *Saccharopolyspora*, *Sporichthya* dan beberapa *Nocardia* spp. merupakan penghasil rantai spora pendek. *Streptomyces*, *Nocardioiodes*, *Kitasatospora*, *Streptoverticillium* dan beberapa dari *Nocardia* spp. mampu menghasilkan rantai spora panjang yang dapat mencapai 100 spora. Genus *Actinoplanes* dan *Actinosynnema* memiliki spora motil, *Thermoactinomyces* memiliki endospora tahan panas, *Frankia* memiliki vesikel yang berisi spora (Barka *et al.*, 2016).



Gambar 2. 3 Pertumbuhan isolat aktinomisetes pada media *Starch Casein Agar* (a. Miselium udara, b. Miselium substrat).
(Sumber : Li *et al.*, 2016)

Morfologi isolat aktinomisetes menurut Li *et al.* (2016) pada media padat adalah kompak, seperti bulu, berbentuk mengerucut dengan permukaan yang kering pada media kultur dan pada umumnya tertutupi miselium udara.

2.1.3 Habitat Aktinomisetes

Aktinomisetes dapat ditemukan pada lingkungan terestrial (tanah) dan lingkungan akuatik (perairan). Aktinomisetes sebagian besar tersebar di tanah, karena tanah kaya dengan unsur hara, diperkirakan dalam 1 gram tanah terdapat 1 juta aktinomisetes (Wahyuni, 2014). Tanah hutan sekunder, tanah rhizosfer hutan mangrove, lumpur, tanah gurun, sedimen dan serasah merupakan habitat aktinomisetes di lingkungan terestrial. Daerah rhizosfer diketahui merupakan salah satu habitat utama untuk mengisolasi aktinomisetes (Anandan *et al.*, 2016).

Aktinomisetes hidup pada kedalaman 0-20 cm dari permukaan tanah, tumbuh baik pada pH 6,5 - 8,2 dan suhu optimum untuk pertumbuhannya berkisar antara 25°C - 55°C. Aktinomisetes termofilik dapat tumbuh pada suhu optimum 55°C-60°C. *Streptomyces* merupakan contoh dari aktinomisetes termofilik (Anandan *et al.*, 2016). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Putri dan Nurkanto (2016), sebanyak 344 isolat aktinomisetes telah berhasil diisolasi dari

sampel serasah, sedimen dan tanah dari empat lokasi yang berbeda di Pulau Enggano. Sebanyak 242 isolat diperoleh dari hutan sekunder, 79 isolat dari perkebunan, sembilan isolat dari hutan mangrove, dan 14 isolat dari habitat rawa (Putri & Nurkanto, 2016).

Lingkungan perairan juga merupakan habitat yang banyak ditemukan aktinobakteria, beberapa biasanya diperoleh dari lingkungan terestrial sekitar yang tersapu air. Beberapa tipe aktinobakteria yang dapat ditemukan di air tawar antara lain *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, dan aktinomisetes penghasil endospora yaitu *Thermoactinomyces*. Aktinobakteria dapat ditemukan pada habitat yang dapat memecah selulosa, kitin dan lignin. Aktinobakteria bisa menjadi aktif pada ekosistem air tawar karena adanya substrat dan kondisi pertumbuhan yang sesuai. Lingkungan laut juga merupakan salah satu habitat aktinobakteria yang diketahui dapat menghasilkan berbagai tipe senyawa bioaktif jika dibandingkan dengan aktinomisetes terestrial. Aktinobakteria yang dapat ditemukan di laut antara lain dari genus *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium marinum*, *Williamsia maris* dan *Verrucosispora* (Anandan *et al.*, 2016).

Tambak atau kolam budidaya ikan merupakan salah satu habitat dari aktinomisetes. Menurut penelitian Velmurugan *et al* (2015), ditemukan aktinomisetes dari sampel sedimen tambak budidaya ikan di tenggara pesisir Tamilnadu, India. Châu *et al* (2016) dalam penelitiannya, menemukan aktinomisetes genus *Streptomyces* sp. dari sedimen kolam budidaya udang.

Wijayanti dkk (2018) juga menemukan aktinomisetes yang diisolasi dari tambak dan sedimen rawa di Indralaya, yang teridentifikasi sebagai *Streptomyces* sp.

2.1.4 Isolasi dan Identifikasi Aktinomisetes

Isolasi bakteri kelompok aktinomisetes terbagi dalam dua cara yakni *pre treatment sample* dan isolasi bakteri. *Pre treatment* sangat penting untuk mengisolasi aktinomisetes karena pertumbuhannya lebih lambat dibanding dengan bakteri lain dan jamur. *Pre treatment* digunakan untuk mendapatkan aktinomisetes target dengan menghambat atau mengeliminasi mikroorganisme yang tidak diinginkan. Spora aktinomisetes lebih resisten terhadap pengeringan dibandingkan kebanyakan bakteri. *Pretreatment* yang dilakukan pada tanah dengan pemanasan kering 120°C selama 1 jam digunakan untuk mengisolasi *Microbispora* dan *Streptosporangium*, 100°C selama 15 menit untuk mengisolasi *Actinomadura* spp., 120°C. Suspensi air atau tanah yang dipanaskan pada 45°C atau 50°C selama 10 menit dapat digunakan untuk mengisolasi *Streptomyces* spp dan jika dipanaskan pada 60°C selama 30 menit untuk mendapatkan *Micromonospora* spp. (Jiang *et al*, 2016). *Pre treatment* sampel tanah rhizosfer mangrove dapat dilakukan dengan cara panas kering pada suhu 70°C selama 15 menit (Janaki & Ganesan, 2016). *Pre treatment* yang diberikan pada tiap penelitian berbeda-beda sesuai dengan asal sampel yang diisolasi (Kumar dan Jadeja, 2016).

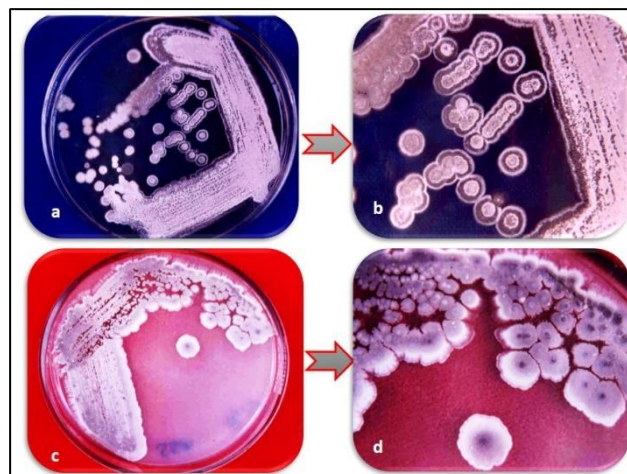
Cara isolasi aktinomisetes selain dengan *pre treatment*, dapat pula dilakukan dengan isolasi bakteri. Isolasi bakteri dilakukan dengan menumbuhkan sampel pada medium pertumbuhan yang mempertimbangkan faktor pertumbuhan bakteri (pH, salinitas, suhu dan nutrisi) dengan menambahkan antibiotik dan antijamur

tertentu (Retnowati, 2017). Media yang dapat digunakan untuk mengisolasi aktinomisetes berbeda-beda tergantung pada habitatnya. Aktinomisetes termofilik dapat diisolasi menggunakan media Czapek, Glycerol asparagine, Oatmeal. Isolasi aktinomisetes halofilik dan alaklofilik dapat menggunakan media Starch-casein, glycerol asparagine, media T3, dan media Horikoshi (Jiang *et al*, 2016).

Media lain yang dapat digunakan untuk mengisolasi bakteri sakarolitik laut dan aktinomisetes adalah media *Starch M Protein Agar*. Komposisi media ini terdiri dari *M-Protein powder* (1,000 g/L), *Starch* (10,000 g/L), *Sea water* (37,000 g/L), *Agar* (15,000 g/L) dengan pH akhir pada 25°C sebesar $7,2 \pm 0,2$. *Starch* digunakan sebagai sumber karbohidrat kompleks, M-protein powder sebagai sumber nitrogen, garam dari *sea water* sebagai sumber penghasil ion kompleks agar media sesuai untuk mikroba flora laut dan juga sebagai penyangga media (Himedia, 2018).

Identifikasi isolat aktinomisetes dapat dilakukan melalui beberapa metode, antara lain:

1. Identifikasi koloni



Gambar 2. 4 Penampakan isolat aktinomisetes pada *Starch Casein Agar plate* (b.d morfologi koloni individu)
(Sumber : Li *et al.*, 2016)

Koloni aktinomisetes dikenali dari pengamatan secara makroskopis yakni berdasarkan bentuk koloni yang penampakannya mencengkeram media agar dan mempunyai warna koloni yang berbeda-beda. Identifikasi morfologi makroskopis meliputi: bentuk koloni, warna koloni, karakteristik permukaan koloni, pertumbuhan koloni, elevasi koloni, dan tepi koloni (Pujiati, 2014).

2. Identifikasi morfologi

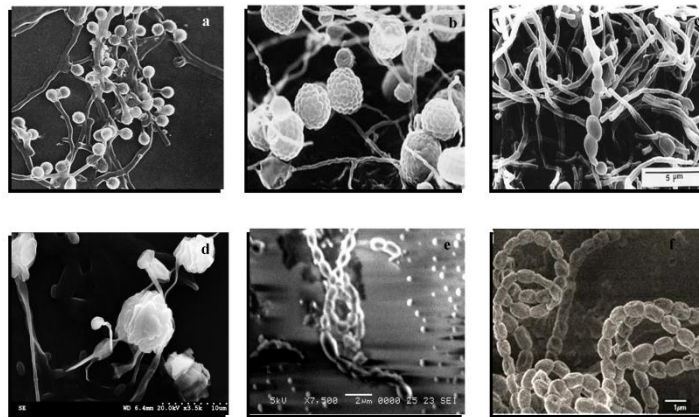
Identifikasi morfologi isolat aktinomisetes didasarkan pada pengamatan dengan menggunakan mikroskop. Identifikasi morfologi mikroskopis dilakukan pewarnaan untuk menentukan bentuk sel dan gram apakah isolat tersebut serta menggunakan slide kultur untuk melihat konidia dan hifanya (Pujiati, 2014).

3. *Color grouping*

Identifikasi secara *color grouping* merupakan metode untuk mengelompokkan isolat aktinomisetes berdasarkan warna pigmen. Karakter morfologi berupa warna miselium aerial dan pembentukan pigmen terdifusi dicatat sebagai dasar pengelompokan (Retnowati, 2017).

4. Identifikasi SEM

Identifikasi menggunakan *Scanning Electron Microscope* dapat digunakan untuk mengamati morfologi rantai spora, spora, permukaan spora dan struktur spora secara lebih detail (Anandan *et al.*, 2016).



Gambar 2.5 Hasil foto *Scanning Electron Microscopy* beberapa isolat aktinomisetes (a. *Micromonospora* sp.; b. *Streptosporangium* sp.; c. *Saccharopolyspora* sp.; d. *Actinosynnema* sp. e. *S. noursei*; f. *Streptomyces* sp.)⁷
(Sumber : Anandan *et al.*, 2016)

5. Identifikasi gen 16S rRNA

Identifikasi molekuler ini dilakukan terhadap isolat aktinomisetes dengan PCR yang selanjutnya hasil identifikasi DNA akan dianalisa berdasarkan kesamaan gen 16S rRNA dengan aktinomisetes terdekat yang ada dalam database GenBank (Ratnakomala dkk, 2016).

2.1.5 Metabolit Sekunder Aktinomisetes

Metabolit merupakan produk hasil dari metabolisme. Metabolit terdiri dari metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer adalah senyawa atau molekul yang merupakan produk akhir atau produk antara dalam proses metabolisme makhluk hidup, yang memiliki fungsi penting bagi kelangsungan hidup organisme (Masda, 2018).

Metabolit sekunder dibuat dan disimpan secara ekstraseluler. Metabolit sekunder disintesis pada akhir siklus pertumbuhan sel, yaitu pada fase stasioner saat populasi sel tetap, karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati (Masda, 2018). Aktinomisetes, khususnya *Streptomyces* memproduksi metabolit sekunder pada fase eksponensial, stasioner dan kematian. Hal ini terjadi

ketika terjadi kekurangan nutrisi dan kondisi lingkungan pertumbuhan terbatas, dapat menyebabkan terbentuknya metabolit sekunder. Metabolit sekunder dapat ditemukan pada berbagai organisme yang dapat menghasilkan metabolit dan memiliki kemampuan biologis seperti sebagai agen transpor, hormon, toksin, pigmen, pestisida, immunosupresan, agen antikanker, agen antibakteri, immunomodulator, antagonis dan reseptor antagonis (Harir *et al*, 2018).

Metabolit sekunder yang dihasilkan antara spesies aktinomisetes satu dengan lainnya berbeda-beda tergantung dengan kondisi lingkungan hidup dan nutrisi, serta jalur biosintesis yang ditempuh. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *Streptomyces* antara lain antibiotik yang berbeda-beda berdasarkan jalur biosintesisnya, melalui jalur biosintesis *Polyketide Synthase* (PKS) antara lain antibiotik golongan *macrolides* (Erythromycin, Rapamycin, Rifamycin B), Actinorhodin, Tetracenomycin, Doxorubicin dan Polyhydroxy Phenol (Harir *et al*, 2018).

2.2 Antibiotik

Antibiotik merupakan metabolit yang dihasilkan oleh mikroorganisme tertentu, yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme tertentu lainnya (Hogg, 2013). Antibiotik merupakan senyawa yang dihasilkan melalui proses metabolisme alami mikroorganisme yang dapat menghambat atau menghancurkan mikroorganisme lain (Parija, 2012).

Berdasarkan Hogg (2013), antibiotik harus memiliki ciri-ciri sebagai berikut:

1. Larut dalam cairan tubuh

Antibiotik, seperti agen kemoterapeutik lainnya, perlu larut dalam cairan tubuh untuk mengeluarkan efeknya dengan cara penetrasi pada jaringan tubuh.

2. Dapat diabsorpsi oleh usus halus

Jika diberikan melalui oral, tidak boleh diinaktivasi oleh lingkungan asam lambung, dan harus bisa diabsorpsi oleh usus halus.

3. Tidak memberikan efek yang signifikan pada mikroflora penghuni tetap sel inang.

4. Patogen target tidak mudah membentuk resistensi terhadap antibiotik.

5. Tidak memberikan dampak negatif dalam efek pengobatan lain.

6. Efek samping yang ditimbulkan seperti reaksi alergi harus seminimal mungkin.

7. Stabil dan memiliki masa simpan yang baik tanpa membutuhkan penyimpanan khusus.

Berdasarkan aktivitas spektrumnya, Parija (2012) mengelompokkan antibiotik menjadi:

1. Spektrum luas (*Broad-Spectrum/Extended-Spectrum*)

Antibiotik spektrum luas merupakan antibiotik yang memiliki jangkauan luas pada beberapa mikroba. Contohnya, tetrasiklin yang aktif terhadap berbagai bakteri gram positif dan gram negatif, riketsia, mikoplasma dan protozoa.

2. Spektrum sempit (*Narrow-Spectrum*)

Antibiotik spektrum sempit merupakan antibiotik yang efektif terhadap satu atau sebagian kecil mikroba. Contohnya Vancomycin yang aktif terhadap bakteri

gram positif tertentu (seperti *Staphylococci* dan *Enterococci*), atau Griseofulvin yang hanya digunakan untuk infeksi jamur kulit.

Obat antimikroba dapat menjadi bakterisidal atau bakteriostatik. Obat bakterisidal membunuh bakteri, sedangkan obat bakteriostatik menghambat pertumbuhan bakteri tetapi tidak membunuhnya. Obat bakterisidal sangat berguna pada situasi yang mengancam nyawa, endokarditis, pasien dengan nilai polimorfonuklear (PMN) dibawah $500/\mu\text{L}$, dan kondisi dimana obat bakteriostatik tidak dapat menyembuhkan. Sedangkan obat bakteriostatik tergantung pada mekanisme pertahanan tubuh inang seperti fagosit untuk membunuh bakteri (Parija, 2012).

Mekanisme kerja antibiotik adalah sebagai berikut:

1. Menghambat sintesis dinding sel

Antibiotik golongan β -laktam merupakan golongan utama yang dapat menghambat sintesis dinding sel bakteri. Hal ini dikarenakan adanya kandungan cincin β -laktam pada strukturnya. Faktor yang penting dalam penguatan komponen peptidoglikan pada dinding sel adalah rantai ikatan silang melalui transpeptidasi. β -laktam mengganggu proses transpeptidasi dengan mengikat enzim transpeptidase, membentuk ikatan kovalen dengan residu serin pada situs aktif enzim. Dinding sel masih dapat tetap terbentuk tetapi secara perlahan melemah dan tidak berikatan dengan peptidoglikan. Dalam keadaan hipotonis, air memasuki sel menyebabkan pembengkakan sel kemudian lisis (Hogg, 2013). Penisilin, cephalosporin dan vancomycin adalah antibiotik yang dapat mengganggu sintesis dinding sel bakteri (Parija, 2012).

2. Menghambat sintesis protein

Bakteri memiliki unit ribosomal 30S dan 50S, sedangkan sel mamalia memiliki ribosom 80S. aminoglikosida dan tetrakilin berperan pada subunit ribosom 30S, sedangkan eritromisin, kloramfenikol dan clindamycins berperan pada subunit ribosom 50S. Antibiotik golongan aminoglikosida menghambat sintesis protein dengan cara mengikat subunit 30S ribosom, sehingga menghalangi kompleks inisiasi, menyebabkan tidak terbentuknya ikatan peptida atau polisom. Golongan tetrasiklin menghambat sintesis protein bakteri dengan menghalangi pengikatan t-RNA aminoasil terhadap subunit 30S ribosom (Parija, 2012).

3. Menghambat sintesis asam nukleat

Sulfonamid, trimethoprim, quinolon dan rifampisin adalah contoh obat yang bekerja dengan menghambat sintesis asam nukleat (Parija, 2012). Rifampisin merupakan antibiotik yang bekerja dengan menghambat RNA polimerase bakteri, menghambat produksi mRNA (Hogg, 2013).

4. Mengubah fungsi membran sel

Polimyxin adalah kelas antibiotik yang memiliki peran dalam mengubah fosfolipid membran sitoplasma dan menyebabkan kebocoran isi sel (Hogg, 2013). Polymixin mengikat membran sel dan mengubah strukturnya menyebabkan membran sel menjadi permeabel, sehingga meningkatkan penyerapan air ke dalam sel yang dapat mematikan sel bakteri (Parija, 2012).

Kemampuan aktinomisetes sebagai penghasil senyawa antibakteri telah dilaporkan dalam beberapa penelitian, diantaranya hasil penelitian Ratnakomala dkk pada tahun 2016, ditemukan 29 isolat aktinomisetes dari 3 titik sampling sedimen mangrove pesisir pantai Pulau Enggano di Provinsi Bengkulu, dari 29

isolat tersebut diketahui 1 isolat dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji Gram negatif *Escherichia coli*, sedangkan 6 isolat lainnya menghambat bakteri Gram positif *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* (Ratnakomala dkk., 2016).

2.3 Metode Uji Aktivitas Antagonis

Aktivitas antagonis merupakan peristiwa yang menyebabkan tertekannya aktivitas salah satu mikroorganisme jika dua atau lebih mikroorganisme ditempatkan pada tempat yang sama. Metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi aktivitas antagonis aktinomisetes terhadap mikroorganisme lain adalah metode dilusi dan difusi.

2.3.1 Metode Dilusi

Metode dilusi dilakukan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) agen antimikroba. KHM ditentukan sebagai konsentrasi terkecil agen antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan organisme. Estimasi KHM berguna untuk mengatur dosis antibiotik secara akurat dan menguji pola sensitivitas bakteri yang lambat tumbuh seperti *M.tuberculosis* (Parija, 2012).

Berdasarkan Masda (2018), terdapat dua teknik dilusi yang dapat digunakan, yaitu:

1. Dilusi cair

Dilusi cair dilakukan dengan membuat seri pengenceran. Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran isolat uji yang diduga memiliki kemampuan sebagai antimikroba pada medium cair, kemudian ditambahkan bakteri uji dan diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu. Larutan isolat uji yang telah diinkubasi pada kadar terkecil yang masih terlihat jernih menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri uji, sehingga konsentrasi tersebut

ditetapkan sebagai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum). Larutan uji yang ditetapkan sebagai KHM selanjutnya dikultur ulang pada nutrisi agar tanpa penambahan mikroba uji ataupun isolat uji dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum).

2. Dilusi Agar

Metode dilusi agar dilakukan dengan menambahkan seri pengenceran konsentrasi antibiotik dalam agar. Mikroorganisme yang akan diuji kemudian diinokulasikan dan diinkubasi semalaman pada suhu 37°C. Konsentrasi antibiotik terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM).

2.3.2 Metode Difusi

Berdasarkan Pratiwi (2008), terdapat 3 metode difusi, yaitu:

1. Metode *disc diffusion* (tes Kirby & Bauer)

Digunakan untuk menentukan aktivitas agen antimikroba dengan meletakkan kertas filter cakram pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih di sekitar kertas cakram mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar..

2. *Ditch-plate technique* (Metode parit)

Pada metode ini sampel uji berupa agen antimikroba yang diletakkan pada parit yang dibuat dengan cara memotong media agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur dan mikroba uji (maksimum 6 macam) digoreskan ke arah parit yang berisi agen antimikroba.

3. *Cup-plate technique* (Metode lubang atau cawan)

Metode ini serupa dengan metode *disc diffusion*, yaitu dibuat pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antimikroba yang akan diuji.

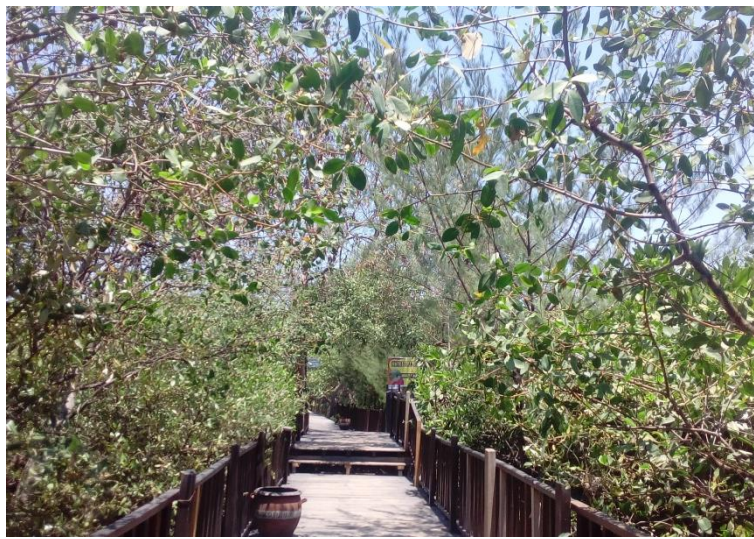
2.4 Kawasan Ekowisata Hutan Mangrove Wonorejo Surabaya

Hutan mangrove merupakan vegetasi pantai tropis dan sub-tropis yang didominasi oleh beberapa spesies mangrove yang tumbuh dan berkembang pada daerah pasang surut, lumpur dan berpasir. Hutan mangrove merupakan tipe hutan tropika yang khas tumbuh di sepanjang pantai atau muara sungai yang dipengaruhi oleh pasang surut air laut, mangrove banyak ditemukan di pantai-pantai teluk yang dangkal, estuaria, delta dan pantai yang terlindung (Rahim, 2017).

Kawasan Ekowisata Hutan Mangrove Wonorejo merupakan salah satu objek wisata yang terletak di Kelurahan Wonorejo, Kecamatan Rungkut, Kota Surabaya. Kawasan ekowisata dengan luas 871 hektar ini dikelola oleh Dinas Ketahanan Pangan dan Pertanian Surabaya. Ekowisata Mangrove Wonorejo termasuk dalam kawasan hutan mangrove Pamurbaya atau Pantai Timur Surabaya yang pertama kali diprakarsai oleh Camat Rungkut, Lurah Wonorejo beserta FKPM serta disahkan dengan Surat Keputusan Lurah Wonorejo nomor: 556/157/436.11.15.5/2009 (Putra, 2016).

Hutan mangrove Wonorejo memiliki kondisi lahan yang cocok untuk hidup dan berkembangnya beraneka ragam flora dan fauna (Umam dkk., 2015). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wijaya (2018) di Kawasan Ekowisata Hutan Mangrove Wonorejo, vegetasi mangrove yang ditemukan di lokasi

penelitian teridentifikasi sebanyak 9 spesies yang termasuk ke dalam 6 famili. Spesies mangrove tersebut antara lain *Nypa fruticans*, *Sonneratia alba*, *Rhizophora mucronata*, *Excoecaria agallocha*, *Sonneratia caseolaris*, *Avicennia alba*, *Avicennia marina*, *Avicenna lanata* dan *Aegiceras floridum* . Selain flora dan fauna, mikroorganisme seperti jamur dan bakteri merupakan penyusun ekosistem di kawasan ekowisata Hutan Mangrove Wonorejo.(Wijaya & Huda, 2018).



Gambar 2. 6 Kawasan Ekowisata Hutan Mangrove Wonorejo, Surabaya.
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2019)

Selain daerah konservasi hutan mangrove, di sekitar Kawasan Ekowisata Hutan Mangrove Wonorejo juga terdapat ekosistem tambak. Tambak adalah badan air yang memiliki ukuran 1 m² hingga 2 ha yang bersifat permanen atau musiman yang terbentuk secara alami atau buatan manusia. Kolam biasanya digunakan dalam penyebutan tambak dengan air tawar, sedangkan tambak untuk air payau atau air asin. Secara umum tambak di Kota Surabaya berbatasan langsung dengan kawasan mangrove sehingga disekitar pematang tambak terdapat tanaman mangrove. Tanaman mangrove yang berada di sekitar tambak secara tidak langsung berguna untuk kelangsungan kehidupan tambak karena dapat

digunakan sebagai pakan dan pupuk alami tambak (Tim Kehati DLH Surabaya, 2017). Menurut Wijaya dkk (2019), masyarakat pesisir Pantai Timur Surabaya (Pamurbaya) masih memanfaatkan kawasan mangrove untuk budidaya udang dan bandeng menggunakan sistem tambak tradisional. Berdasarkan hasil pengukuran kualitas air pada tambak *silvofishery* Wonorejo Surabaya oleh Wijaya dkk (2019) didapatkan kisaran salinitas 20-29 ‰, pH 7,2 – 8,3 dan suhu 28-32,6°C.

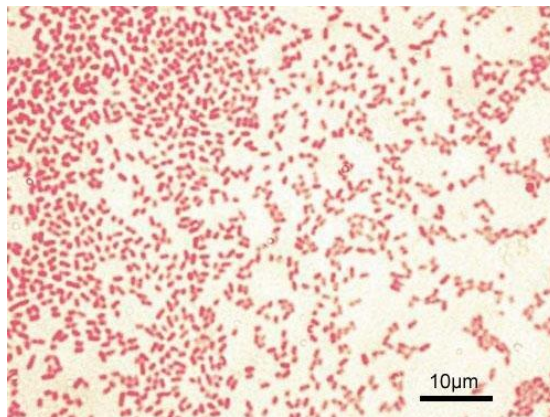
Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Khiftiyah *et al.* (2018), isolasi mikroba dari tanah mangrove di Wonorejo, Surabaya diperoleh tiga isolat bakteri dan enam isolat kapang. Isolat bakteri CMC1 (batang, Gram-negatif) dan PIKOV1513 ditemukan dapat menghasilkan enzim amilolitik, sedangkan isolat bakteri NA1 (batang, Gram-negatif) dan PDA20131 ditemukan dapat menghasilkan enzim proteolitik (Khiftiyah dkk., 2018). Isolat khamir dari rhizosfer mangrove Wonorejo dan Gunung Anyar memiliki potensi dalam menghasilkan IAA (*Indol Acetic Acid*) (Maya & Alami, 2019). Selain isolat bakteri dan khamir, isolat aktinomisetes dari kawasan rhizosfer mangrove Wonorejo Surabaya menunjukkan aktivitasnya sebagai antibakteri. Dari 9 isolat aktinomisetes, tujuh isolat memiliki potensi sebagai antibakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Fatiqin, 2011).

2.5 Tinjauan tentang *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae, yang dikenal juga sebagai *Friedlander's bacillus*, pertama kali diisolasi oleh Friedlander pada 1883 dari kasus fatal pneumonia. Bakteri ini dapat menyebabkan beberapa penyakit pada manusia seperti pneumonia, infeksi saluran kemih, infeksi nosokomial dan bakterimia atau sepsis (Parija, 2012).

2.5.1 Klasifikasi dan Morfologi *Klebsiella pneumoniae*

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Order	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Klebsiella</i>
Spesies	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Parija, 2012)



Gambar 2. 7 *Klebsiella pneumoniae* pada Pewarnaan Gram
(Sumber: researchgate.net)

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri gram negatif, pendek, berbentuk batang, memiliki ukuran $1-2 \times 0,5-0,8 \mu\text{m}$. Bakteri ini pada umumnya non motil dan tidak menghasilkan spora. *Klebsiella pneumoniae* berdiri sendiri atau berpasangan. Strain yang diisolasi memiliki kapsul polisakarida yang terlihat jelas. Akumulasi dari polisakarida ekstraseluler memberikan penampakan mukoid pada koloni *Klebsiella* (Parija, 2012).

2.5.2 Isolasi dan Identifikasi *Klebsiella pneumoniae*

Isolasi *Klebsiella pneumoniae* dapat dilakukan dengan mengambil sampel klinis yang berupa darah, urin, sputum, cairan pleura, dan luka dari daerah yang memungkinkan. Identifikasi kultur *Klebsiella pneumoniae* dapat diketahui melalui sifatnya pada tiap media kultur. *Klebsiella pneumoniae* dapat memfermentasikan

laktosa, bersifat urease positif dan indol negatif. Bakteri ini tidak menghasilkan hidrogen sulfida (H_2S), dan pada uji VP – MR memberikan hasil positif. Koloni *Klebsiella pneumoniae* dapat tumbuh pada media biasa seperti nutrisi agar dan MacConkey agar pada suhu $37^\circ C$, dengan ciri koloni berukuran besar, cembung dan mukoid. Koloni bakteri ini pada media MacConkey agar menghasilkan koloni berwarna merah (Parija, 2012).

2.5.3 Faktor Virulensi *Klebsiella pneumoniae*

Anggota *Klebsiellaceae* telah diklasifikasikan menjadi lebih dari 80 serotip berdasarkan antigen K kapsuler dan antigen O somatik. Semua serotipe memiliki virulensi yang sama. *Klebsiellaceae* terdiri dari bakteri invasif yang memiliki banyak faktor virulensi, seperti:

1. Kapsul

Kapsul merupakan faktor virulensi utama. Kapsul mencegah bakteri dari fagositosis oleh granulosit polimorfonuklear (PMN). Kapsul juga mencegah kematian bakteri yang disebabkan oleh faktor-faktor bakterisidal serum dengan menghambat aktivasi atau mengambil komponen komplemen, terutama C3b.

2. Adhesin

Beberapa adhesin merupakan faktor virulensi lainnya. Adhesin tersebut membantu bakteri untuk menempel pada sel inang, sehingga sangat penting untuk memulai proses terjadinya penyakit.

3. LPS

LPS (Lipopolisakarida) merupakan faktor lain yang dapat mencegah kerusakan membran dan kematian bakteri. LPS bakteri dapat mengaktivasi komplemen, sehingga menyebabkan deposisi selektif dari C3b ke situs molekul

LPS yang jauh dari membran sel bakteri. Hal ini dapat menghambat pembentukan membran kompleks (C5b-C9), yang bertanggung jawab untuk kematian sel bakteri (Parija, 2012).

Strain ESBL (*Extended Spectrum Beta Lactamase*) *Klebsiella* merupakan bakteri yang memiliki virulensi tinggi, antigen kapsul tipe K55 dan memiliki kemampuan luar biasa untuk menyebar (Parija, 2012).

2.5.4 Resistensi *Klebsiella pneumoniae* terhadap Antibiotik

Resistensi bakteri terhadap antibiotik adalah kondisi dimana bakteri yang sebelumnya rentan terhadap antibiotik berkembang menjadi resisten terhadap antibiotik yang sama dan tidak rentan lagi. Terdapat mekanisme berbeda dari mikroorganisme yang dapat menyebabkan resistensi antibiotik, antara lain memproduksi enzim, memproduksi enzim cadangan, mensintesis target yang dimodifikasi, mengubah permeabilitas dinding sel, mengubah jalur metabolisme dan *Efflux pump*. Bakteri memproduksi enzim yang dapat mengainaktivasi antibiotik. Contohnya, *Staphylococcus* resisten penisilin menghasilkan enzim β -laktamase yang dapat menghancurkan penisilin dan cephalosporin dengan memotong cincin β -laktam pada antibiotik. Bakteri gram negatif resisten pada aminoglikosida, diperantarai oleh plasmid, menghasilkan enzim yang dapat mengadenilasi, fosforilasi, atau asetilasi untuk menghancurkan antibiotik (Parija, 2012).

β -laktamase yang dihasilkan oleh berbagai bakteri gram negatif memiliki spesifitas yang berbeda, beberapa aktif terhadap cephalosporin, lainnya terhadap penisilin. Asam klavunalik dan sulbaktam adalah analog penisilin yang mengikat kuat β -laktamase dan mengainaktivasinya. Kombinasi penisilin inhibitor (contoh

asam klavunalik dan amoksisilin) dapat mengatasi resistensi yang disebabkan oleh enzim β -laktamase, tetapi tidak semua β -laktamase. *Extended-spectrum β -lactamases* (ESBLs) dihasilkan oleh beberapa bakteri enterik, seperti *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, dan *Proteus*. ESBL menjadikan bakteri resisten terhadap semua penisilin, cephalosporin dan monobaktam (Levinson, 2014).

Klebsiella pneumoniae merupakan salah satu bakteri patogen yang diketahui resisten terhadap beberapa jenis antibiotik. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Lubis *et al.*, pada tahun 2016, diketahui bahwa *Klebsiella pneumoniae* mengalami resisten terhadap antibiotik golongan beta laktam, Ceftriakson (66,67%). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Eltario dkk. (2018), *Klebsiella* sp. mengalami resistensi terhadap antibiotik Ampicilin (90,5%), Erithromicin (71,4%), Ceftriaxone (66,7%), Cefoperazone (61,9%) dan Cefotaxime (61,9%).