

TESIS

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER *ACTINOMYCETES* TANAH
RIZOSFER *PEPEROMIA PELLUCIDA* L. DARI EKOSISTEM KARST
SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA ANTIMIKROBA**

**ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF
ACTINOMYCETES FROM RHIZOSPHERE SOIL OF *PEPEROMIA
PELLUCIDA* L. IN KARST ECOSYSTEM AS PRODUCERS OF
ANTIBACTERIAL COMPOUNDS**

**AKMAL SAPUTRA ARDIONO
N012221007**



**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2024

LEMBAR PENGESAHAN

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER *ACTINOMYCETES* TANAH RIZOSFER *PEPEROMIA PELLUCIDA* L. DARI EKOSISTEM KARST SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA ANTIMIKROBA

Disusun dan diajukan oleh :

AKMAL SAPUTRA ARDIONO
NIM: N012221007

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Magister Farmasi, Fakultas Farmasi,
Universitas Hasanuddin

Pada tanggal
09 Juli 2024

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui :

Pembimbing Utama

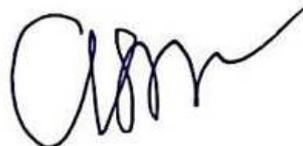
Pembimbing Pendamping


Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19771125-200212 2 003


Abdul Rahim, M.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19771111 200812 1 001

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Farmasi

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin


Muhammad Aswad, M.Si., Ph.D., Apt.
NIP. 19800101 200312 1 004


Prof. Dr. rer. nat. Marianti A. Manggau, Apt.
NIP. 19670349 199208 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Akmal Saputra Ardiono
NIM : N012221007
Program Studi : Farmasi
Jenjang : S2

Dengan ini menyatakan bahwa tesis dengan judul "**Isolasi dan Identifikasi Molekuler *Actinomycetes* Tanah Rizosfer *Peperomia pellucida* L. dari Ekosistem Karst sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba**" adalah hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data atau tulisan dan pikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan saya.

Demikian pernyataan ini saya buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Makassar, 09 Juli 2024

Yang menyatakan



Akmal Saputra Ardiono

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan penulisan Tesis ini dengan judul “Isolasi dan Identifikasi Molekuler *Actinomycetes* Tanah Rizosfer *Peperomia pellucida* L. dari Ekosistem Karst sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba”, yang merupakan salah satu syarat wajib bagi mahasiswa program studi S2 Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar untuk memperoleh gelar magister.

Sudah menjadi kodrat alamiah, sebagai makhluk sosial dalam kehidupannya untuk mencapai tujuan lazimnya dan sepantasnyalah membutuhkan bantuan dari orang lain, maka dari itu penulis dengan rendah hati mengucapkan ucapan terima kasih yang tak terhingga dengan penuh hormat kepada kedua orang tua saya, ibu Kasmawati dan ayah Muhlis, serta keluarga besar saya yang berada dikampung, yang senangtiasa membantu dan memberikan doa serta semangat maupun material dalam segala hal kepada penulis untuk menyelesaikan dan mendapat gelar magister di Universitas Hasanuddin Makassar. Semoga kita semua dalam lindungan dan ridha Allah SWT.

Penulis sangat menyadari bahwa dalam penyusunan Tesis ini masih banyak terdapat kesalahan, kekurangan dan hambatan yang dihadapi, namun dengan segala usaha dan bantuan dari berbagai pihak, sehingga akhirnya Tesis ini Alhamdulillah dapat diselesaikan.

Oleh sebab itu, pada kesempatan ini perkenankanlah penulis untuk menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada :

1. Ibu Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt. selaku pembimbing utama dan Bapak Abdul Rahim, M.Si., Ph.D., Apt. selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu dan tenaganya untuk memberikan arahan, bimbingan serta bantuan dalam melaksanakan penelitian dan penyusunan tesis ini.

2. Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt., Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt., dan Prof. Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. selaku penguji yang telah meluangkan waktunya dalam memberikan saran dan masukan terkait penelitian dan penyusunan tesis ini.
3. Dekan, wakil dekan, seluruh bapak/ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmu dan bimbingan selama menempuh masa studi, serta seluruh civitas akademika atas segala fasilitas dan pelayanan yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh pendidikan hingga penyelesaian tesis ini.
4. Kedua orang tua penulis yaitu ibu Kasmawati dan bapak Muhlis, serta semua keluarga yang telah memberikan dukungan, motivasi serta bantuan pendanaan yang selalu mengiringi langkah penulis dalam menyelesaikan penelitian dan tesis ini.
5. Teman-teman seperjuangan, Maulidiah Alda Sami, Dwi Ambar Wati laluhun, Afifa Hikmah Isra'ini Elly, Nur fadliana, dan wulandasari yusuf yang telah membantu dan memberikan motivasi dalam pelaksanaan penelitian hingga penyusunan tesis ini.
6. Seluruh laboran laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas segala bantuan yang diberikan dalam pelaksanaan penelitian ini serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan.

Semoga kebaikan dan bantuan dari bapak/ibu dosen, staf karyawan dan teman-teman mahasiswa mendapat imbalan yang layak dari Tuhan Yang Maha Esa.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan Tesis ini masih banyak kekurangan dan kelemahan, namun harapan kami semoga Tesis ini bermanfaat bagi pembaca khususnya dalam bidang kefarmasian.

Akhir kata semoga Tuhan Yang Maha Esa Senantiasa melindungi, membimbing dan menyertai disetiap detik yang akan dilewati dalam kehidupan kita semua. Aamiin.

Makassar, 09 Juli 2024

Penulis

ABSTRAK

AKMAL SAPUTRA ARDIONO, *Isolasi dan Identifikasi Molekuler Actinomycetes Tanah Rizosfer Peperomia pellucida L. dari Ekosistem Karst sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba.* (Dibimbing oleh Herlina Rante dan Abdul Rahim)

Penyakit Infeksi merupakan salah satu tantangan global saat ini. Salah satu cara pencegahan yaitu dengan produksi antibiotik. Terdapat berbagai cara untuk memperoleh antibiotik, Salah satunya yaitu isolasi Actinomycetes yang memiliki potensi sebagai penghasil senyawa antimikroba. Penelitian ini menyelidiki agen antimikroba yang dihasilkan oleh Actinomycetes yang berasal dari tanah rizosfer tumbuhan *Peperomia pellucida* L. dari ekosistem Karst Maros, Sulawesi Selatan. Actinomycetes diisolasi dari tanah di sekitaran tumbuhan *P. pellucida*, menghasilkan 22 isolat murni yang kemudian diskruining untuk aktivitas antimikroba terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans* dengan uji antagonis. Hasil skrining menunjukkan bahwa terdapat 2 isolat actinomycetes dengan aktivitas antimikroba paling besar, yaitu isolat dengan kode RKS-0.3-13 dan RKS-0.4-04. Kedua isolat *actinomycetes* tersebut kemudian diproses lebih lanjut dengan fermentasi untuk produksi metabolit sekunder menggunakan media M1 dalam kondisi agitasi selama 16 hari pada kecepatan 150 rpm. Hasil fermentasi kemudian disonikasi dan dipisahkan antara supernatan dengan biomassa. Supernatan diekstraksi menggunakan etil asetat (1:1 v/v). ekstrak etil asetat yang diperoleh diuji aktivitas antimikroba dengan menggunakan *paper disk*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat yang diperoleh mampu menghambat pertumbuhan *E. coli*, *S. aureus* dan *C. albicans* hingga konsentrasi 0.5 mg / 20 µL. Profil senyawa kimia pada ekstrak etil asetat tanaman *P. pellucida* dari ekosistem karst dan non karst, serta ekstrak metabolit sekunder dari kedua isolat actinomycetes menunjukkan adanya perbedaan nilai RF pada bercak noda pada lempeng Kromatografi Lapis Tipis. Identifikasi molekuler dari isolat actinomycetes berdasarkan sekuen gen 16S rRNA menunjukkan bahwa RKS-0.3-13 memiliki kekerabatan dengan *Streptomyces chartreusis* CP108840.1 dengan nilai *similarity* yaitu 99.86% dan RKS-0.4-04 memiliki kekerabatan dengan *Streptomyces neopeptinius* KU324439.1 dengan nilai *similarity* yaitu 99.93%.

Kata Kunci: *Actinomycetes*; Karst; Rizosfer; *Peperomia pellucida*; Sekuen gen 16S rRNA

ABSTRACT

AKMAL SAPUTRA ARDIONO *Isolation and Molecular Identification of Actinomycetes from the Rhizosphere Soil of Peperomia pellucida L. in Karst Ecosystem as Producers of Antimicrobial Compounds.* (Supervised by Herlina Rante and Abdul Rahim).

Infectious diseases pose a significant global challenge, and one approach to prevention is through antibiotic production. Various methods exist for obtaining antibiotics, one of which involves isolating Actinomycetes, known for their potential as producers of antimicrobial compounds. This research investigated antimicrobial agents produced by Actinomycetes isolated from the rhizosphere soil of *Peperomia pellucida* L. in the Karst ecosystem of Maros, South Sulawesi. Actinomycetes were isolated from the soil surrounding *P. pellucida* plants, resulting in 22 pure isolates, which were then screened for antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans* using antagonistic assays. Screening results revealed two Actinomycetes isolates, coded as RKS-0.3-13 and RKS-0.4-04, exhibiting the greatest antimicrobial activity. These isolates underwent further processing through fermentation for secondary metabolite production using M1 media under agitated conditions for 16 days at 150 rpm. The fermentation products were then sonicated and separated into supernatant and biomass. The supernatant was extracted using ethyl acetate (1:1 v/v), and the resulting ethyl acetate extract was tested for antimicrobial activity using paper disks. Test results indicated that the ethyl acetate extract inhibited the growth of *E. coli*, *S. aureus*, and *C. albicans* at a concentration of 0.5 mg / 20 μ L. Chemical compound profiles of ethyl acetate extracts from *P. pellucida* plants in karst and non-karst ecosystems, as well as secondary metabolite extracts from both Actinomycetes isolates, exhibit differences in RF values in chromatographic spots on Thin Layer Chromatography plates, resulting in varying RF values. Molecular identification of the Actinomycetes isolates based on 16S rRNA gene sequences revealed that RKS-0.3-13 exhibited affinity with *Streptomyces chartreusis* CP108840.1, with a similarity value of 99.86%, while RKS-0.4-04 showed affinity with *Streptomyces neopeptinius* KU324439.1, with a similarity value of 99.93%.

Keywords: Actinomycetes; Karst; Rhizosphere; *Peperomia pellucida*; 16S rRNA gene sequence.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iii
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB II METODE PENELITIAN	6
2.1 Desain Penelitian dan Lokasi Penelitian.....	6
2.2 Alat dan Bahan	6
2.3 Cara Kerja.....	6
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN	15
3.1 Isolasi Actinomycetes	15
3.2 Uji Antagonis Isolat Actinomycetes.....	18
3.3 Fermentasi dan Ekstraksi.	20
3.4 Uji Aktivitas Antimikroba.	23

3.5 Identifikasi Isolat <i>Actinomyces</i>	24
3.6 Profil Kromatogram Lapis Tipis	26
BAB IV PENUTUP	31
4.1 Kesimpulan	31
4.2 Saran	31
DAFTAR PUSTAKA.....	32
LAMPIRAN	36

DAFTAR GAMBAR

Hasil Isolasi <i>Actinomycetes</i>	16
Isolat <i>Actinomycetes</i>	16
Kurva Hubungan antara Zona Hambat dengan Waktu Fermentasi	21
Profil Senyawa Kromatogram	25
Elektroforesis Produk PCR dari Amplifikasi Gen 16S rRNA	28
Pohon Filogenik	29

DAFTAR TABEL

Karakteristik Isolat <i>Actinomycetes</i>	17
Uji Antagonis Isolat <i>Actinomycetes</i>	19
Uji Aktivitas Antimikroba	23
Hasil Kuantifikasi DNA menggunakan Nanodrop.....	27
Hasil <i>Top 10 Hit BLAST</i> terhadap NCBI	28

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi saat ini yang disebabkan oleh patogen penginfeksi masih termasuk dalam sepuluh besar penyakit terbanyak di Indonesia (Kemenkes, 2019). Penyakit infeksi disebabkan oleh bakteri yang merupakan penyebab penting mortalitas dan morbiditas di seluruh wilayah dunia. Resistensi obat yang disebabkan oleh bakteri telah meningkat dalam beberapa dekade terakhir, tetapi tingkat penemuan antibiotik baru terus menurun (Gorlenko *et al.*, 2020).

Salah satu penghasil senyawa antibiotik yaitu *actinomycetes*. *Actinomycetes* terkenal menghasilkan berbagai antibiotik, agen biokontrol, dan bahan kimia pemacu pertumbuhan tanaman (AbdElgawa *et al.*, 2020). *Actinomycetes* adalah bakteri berfilamen seperti jamur anaerob fakultatif Gram-positif yang tetap berada di puncak produsen antibiotik alami. *Actinomycetes* adalah kelompok mikroorganisme heterogen, yang memiliki filamen seperti benang di dalam tanah (Sapkota *et al.*, 2020).

Actinomycetes bertindak sebagai tempat produksi untuk banyak metabolit sekunder terkenal, dengan banyak aplikasi signifikan dalam industri medis, pertanian dan farmasi, misalnya antibiotik, antitumor, agen anti-infeksi dan produk alami baru lainnya (Kumari *et al.*, 2020). *Actinomycetes* juga produktif dalam produksi molekul antimikroba. Salah satu contohnya adalah Kibdelomycin, yang merupakan penghambat kuat sintesis DNA. Molekul ini memiliki aktivitas antimikroba spektrum luas terhadap bakteri aerob, termasuk bakteri resisten antibiotik seperti MRSA (Martinez *et al.*, 2020).

Actinomycetes dapat ditemukan di lingkungan darat dan perairan (Praptiwi *et al.*, 2023). *Actinomycetes* tanah adalah kelompok bakteri yang sangat umum dan sering dipelajari memiliki metabolit

sekunder. Hampir semua antibiotik diproduksi oleh *Actinomycetes* dan memiliki manfaat yang sangat menjanjikan (Dede *et al.*, 2020).

Tanah tetap menjadi habitat terpenting bagi *Actinomycetes* dengan *Streptomyces* yang ada sebagai komponen utama populasinya. Menurut banyak laporan, *Streptomyces* ditemukan sebagai genus yang paling banyak diisolasi di setiap penelitian. *Actinomycetes* terestrial memiliki berbagai potensi antimikroba yang menarik. Mengisolasi *Actinomycetes* yang mampu menghasilkan antibiotik baru dengan aktivitas antibakteri yang tinggi. *Actinomycetes* memainkan peran utama dalam komunitas mikroba rizosfer dalam pergantian bahan organik tanaman yang membandel dan dengan demikian wilayah Rizosfer dianggap sebagai salah satu habitat terbaik untuk isolasi mikroorganisme *actinomycetes* (Anandan *et al.*, 2016).

Rizosfer adalah tanah di sekitar sistem perakaran yang dipengaruhi oleh pertumbuhan sistem perakaran (Xiong *et al.*, 2021). Rizosfer merupakan bagian tanah yang langsung dipengaruhi oleh akar tanaman, akibat pelepasan eksudat seperti gula dan asam organik. Eksudat ini merupakan sumber nutrisi dan vitamin yang digunakan oleh berbagai bakteri untuk merangsang perkembangan komunitas mikroba (Pereira *et al.*, 2019). Mikroorganisme melimpah di rizosfer, karena akar tanaman mengeluarkan eksudat yang mengandung bahan organik seperti asam amino, gula, dan asam organik yang merupakan nutrisi bagi mikroorganisme. Selain itu, komposisi dan pola eksudat akar, jenis tanaman, dan jenis tanah mempengaruhi aktivitas dan populasi mikroba rizosfer (Rante *et al.*, 2020).

Karst merupakan ekosistem unik yang terdiri dari tanah tipis yang melapisi batuan karbonat, seperti dolomit dan batugamping. Ini memiliki sumber daya yang rentan menyediakan banyak habitat spesies dan juga menghasilkan jasa ekosistem dalam siklus karbon. Peran kunci jasa ekosistem di karst didorong oleh mikroorganisme yang memperbaiki sifat tanah (Putri and I Nyoman, 2020).

Karst Maros merupakan kawasan yang berkembang dan menjadi tempat berbagai industri yang memanfaatkan sumber daya alamnya. Sebagai kawasan karst terbesar kedua di dunia (Malonggi *et al.*, 2022). Kawasan karst Maros memiliki kurang lebih 268 gua, 6 diantaranya berada di hulu sungai besar di Sulawesi Selatan. Sebaran mata air dapat dikelompokkan menjadi tiga bagian, yaitu kerapatan mata air tinggi (>5 gua/km²), kerapatan mata air sedang (2-5 gua/km²), dan kerapatan mata air rendah (<2 gua/km²) (Arsyad *et al.*, 2020).

Salah satu tumbuhan yang ada pada karst Maros yaitu *Peperomia pellucida*. *P. pellucida* adalah tanaman herbal yang termasuk dalam keluarga Piperaceae. Di banyak negara, telah lama digunakan secara tradisional untuk mengobati berbagai macam penyakit, termasuk diabetes, nyeri otot, pegal-pegal, pilek, konjungtivitis, abses, bisul dan luka kulit, demam, sakit kepala, proteinuria, dan kejang-kejang. *P. pellucida* memiliki potensi dalam pengobatan seperti antihipertensi, antiinflamasi, antipiretik, analgesik, antibakteri, antiamoeba, antioksidan, gastroprotektif, dan aktivitas farmakologis lainnya (Ahmad *et al.*, 2023). Metabolit sekunder yang terkandung pada *P. pellucida* yaitu senyawa flavonoid, tanin, saponin, steroid, monoterpen dan sesquiterpen (Boy *et al.*, 2018).

Pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Ibnouf *et al.* (2022), isolat *actinomyces* yang telah diisolasi dari tanah memiliki aktivitas antimikroba yang rentang terhadap spectrum luas infeksi bakteri dan jamur. Pada penelitian yang dilakukan oleh Elshafie dan Ippolito (2022), telah menghasilkan isolat *actinomyces* yang memiliki aktivitas menjanjikan terhadap produksi metabolit bioaktif penting. Pada penelitian yang dilakukan oleh Fan *et al.* (2019) menyatakan bahwa *actinomyces* relatif melimpah pada ekosistem karst. Pada penelitian yang dilakukan oleh Damayo dan Rolly (2021). Telah diisolasi *Actinomyces* dari ekosistem karst tepatnya pada gua yang berada di Filipina, dan beberapa isolat yang di isolasi memiliki

aktivitas antagonis terhadap bakteri uji. Pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Alves *et al.* (2022) mengisolasi *Enterobacter asburiae* dan *Klebsiella variicola* dari tanah rizosfer tumbuhan *P. pellucida* terbukti menjadi alternatif yang efisien dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman ini. Produksi metabolit sekunder pada *P. pellucida* dapat dioptimalkan dengan isolasi bakteri rizosfer.

Berdasarkan pemaparan diatas maka perlu dilakukan isolasi *Actinomycetes* pada tanah rizosfer tumbuhan *P. pellucida* pada ekosistem karst Maros untuk mendapatkan isolat yang dapat digunakan sebagai kandidat senyawa antibiotik baru.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat isolat *actinomycetes* pada tanah rizosfer tumbuhan suruhan (*Peperomia pellucida* L.) pada ekosistem karst Maros?
2. Bagaimana aktivitas senyawa antimikroba dari isolat *actinomycetes* tanah rizosfer tumbuhan suruhan (*Peperomia pellucida* L.)?
3. Apa spesies dari isolat *actinomycetes* yang memiliki aktivitas antimikroba tertinggi yang di isolasi dari tanah rizosfer tumbuhan suruhan (*Peperomia pellucida* L.) pada ekosistem karst Maros?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui apakah terdapat isolat *actinomycetes* pada tanah rizosfer tumbuhan suruhan (*Peperomia pellucida* L.) pada ekosistem karst Maros?
2. Menentukan aktivitas senyawa antimikroba dari isolat *actinomycetes* tanah rizosfer tumbuhan suruhan (*Peperomia pellucida* L.)
3. Mengetahui spesies dari isolat *actinomycetes* yang memiliki aktivitas antimikroba tertinggi yang di isolasi dari tanah rizosfer tumbuhan suruhan (*Peperomia pellucida* L.) pada ekosistem karst Maros.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pengembangan ilmu pengetahuan khususnya dalam bidang farmasi tentang bagaimana pemanfaatan *actinomycetes* khususnya dari tanah rizosfer tumbuhan *Peperomia pellucida* L. pada ekosistem karst Maros sebagai kandidat senyawa antibiotik baru.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Desain Penelitian dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental laboratorium yang bertujuan untuk memperoleh isolat penghasil senyawa antibiotik yang terdapat pada tanah rizosfer tumbuhan *Peperomia Pellucida* L. pada ekosistem karst Maros. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Farmasi dan laboratorium Fitokimia farmasi Universitas Hasanuddin Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu autoklaf, bunsen, cawan petri, gelas erlenmeyer, gelas piala, gelas ukur, inkubator, jangka sorong, laminar air flow (LAF), lemari pendingin, blender, ose bulat, oven, pengaduk, lampu UV, rak tabung, *orbital shaker*, tabung reaksi, mikropipet, corong pisah, sonikator, kompor, spreader, PCR, chamber dan timbangan analitik.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tanah rizosfer tumbuhan suruhan (*Peperomia pellucida* L.), tumbuhan *P. pellucida*, air suling, alkohol, etil asetat, mikroba uji (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*), lempeng KLT R-18, media Nutrient Agar (NA), media Potato Dextrose Agar (PDA), ISP Medium No. 4 (*Inorganic Salt Starch Agar*), ISP Medium No. 2 (*Yeast Malt Agar*), Media *M1 seed* dan *M1 Fermentation*.

2.3 Cara Kerja

1. Pengambilan Sampel

Sampel tanah rizosfer diambil dari lokasi kawasa karst yang berada di Maros, Sulawesi Selatan pada titik koordinat S 4° 58' 14.557", E 119° 40' 2.463". Tanah diambil di sekitar akar tumbuhan suruhan (*Peperomia pellucida* L.) sekitar 1-5 cm dari permukaan tanah. Kemudian dimasukkan kedalam wadah steril

yang telah di siapkan dan ditutup rapat agar tidak terkontaminasi dengan mikroorganismenya lainnya.

Sampel tumbuhan *P. pellucida* diambil dari lokasi kawasa karst yang berada di Maros, Sulawesi Selatan. Tumbuhan diambil secukupnya untuk di buat ekstrak simplisia. Dan diambil tumbuhan yang berasal dari daerah non-karst untuk dibuat simplisia.

2. Penyiapan Media

a. Penyiapan ISP Medium No. 4 (*Inorganic Salt Starch Agar*)

Serbuk ISP medium No. 4 ditimbang sebanyak 3.7 gram kemudian dilarutkan dalam labu erlenmeyer menggunakan 100 ml aquadest. Kemudian media dipanaskan pada *waterbath* hingga larut, lalu diukur pH media dan kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

b. Penyiapan ISP Medium No. 2 (*Yeast Malt Agar*)

Serbuk ISP Medium No. 2 ditimbang sebanyak 3.8 gram kemudian dilarutkan dalam labu erlenmeyer menggunakan 100 ml aquadest. Kemudian media dipanaskan pada *waterbath* hingga larut, lalu diukur pH media dan kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

c. Penyiapan Media NA (Nutrient Agar)

Serbuk media Nutrient Agar ditimbang sebanyak 2 gram kemudian dilarutkan dalam labu erlenmeyer menggunakan 100 ml aquadest. Kemudian media dipanaskan pada *waterbath* hingga larut, kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

d. Penyiapan Medium PDA (Potato Dextrose Agar)

Serbuk media PDA ditimbang sebanyak 3.9 gram kemudian dilarutkan dalam labu erlenmeyer menggunakan 100 ml aquadest. Kemudian media dipanaskan pada *waterbath* hingga larut, kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

e. **Penyiapan Media *M1 Seed***

Media *M1 Seed* dibuat dengan cara menimbang *soluble starch* 1.2 gram, ekstrak ragi 0.48 gram dan pepton 0.24 gram. Media yang telah ditimbang kemudian dilarutkan dalam labu Erlenmeyer menggunakan aquadest sebanyak 120 ml. Kemudian media dipanaskan pada *waterbath* hingga larut, kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

f. **Penyiapan Media *M1 Fermentation***

Media *M1 Fermentation* dibuat dengan cara menimbang *soluble starch* 12 gram, ekstrak ragi 4.8 gram, pepton 2.4 gram, CaCO₃ 1.2 gram, Fe(SO₄)₃.nH₂O 0,48 gram, dan KBr 0.12 gram. Media yang telah ditimbang kemudian dilarutkan dalam labu Erlenmeyer menggunakan aquadest sebanyak 1.2 liter. Kemudian media dipanaskan pada *waterbath* hingga larut, kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

3. Penyiapan Mikroba uji

Mikroba uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diinokulasikan dalam media NA miring sedangkan *Candida albicans* diinokulasikan pada media PDA miring secara aseptis. Selanjutnya mikroba uji yang telah diinokulasi pada media miring diinkubasi pada *Incubator* selama 1x24 jam pada suhu 37°C (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*) dan pada suhu ruang 25°C selama 3x24 jam (*Candida albicans*). Mikroba uji yang telah diremajakan kemudian dibuat suspensi dengan mengambil masing-masing 1 ose lalu dimasukkan kedalam masing-masing tabung reaksi yang berisi NaCl fisiologis 0.9% steril hingga kekeruhan suspensi sama dengan Standar Mc Farland 0,5.

4. Penyiapan Sampel

Sampel tanah yang sudah dikumpulkan kemudian dibawa ke laboratorium isolasi *actinomycetes*. Sampel kemudian digerus

hingga halus dan dan homogen kemudian di ayak dan ditimbang 1 gram, selanjutnya di panaskan selama 30 menit pada suhu 70°C. sampel kemudian dimasukkan kedalam botol pengencer dan dicukupkan dengan air suling steril hingga 10 ml (pengenceran 10^{-1}) dan dihomogenkan kemudian diambil 1 ml lalu dimasukan kedalam botol pengencer dan dicukupkan kembali dengan air suling steril hingga 10 ml (pengenceran 10^{-2}), dilakukan hal serupa hingga pengenceran 10^{-5}

5. Isolasi *Actinomyces*

Sampel tanah yang telah diencerkan secara berseri sebelum ditanamkan pada media ISP Medium No.4 dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 7 hari. Setelah pembentukan koloni, mereka disubkultur dan dimurnikan dalam cawan petri yang berisi ISP Medium No.2, diinkubasi pada suhu 28°C selama 7 hari, kemudian disimpan di lemari es sebagai stok (Ibnouf *et al.*, 2022).

6. Pengujian Aktivitas Antimikroba dengan Uji Antagonis

Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan cara semua isolat *actinomyces* ditumbuhkan kembali kedalam media ISP Medium No.2, Kemudian *actinomyces* yang berumur 7 hari dipotong menggunakan *stainless steel cork borer* lalu ditempatkan pada cawan petri yang berisi mikroba uji, lalu diinkubasi selama 1 x 24 jam. Setelah itu, dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat menggunakan jangka sorong.

7. Fermentasi, Ekstraksi, Uji Aktivitas dan Uji KLT

a. Fermentasi

Isolat yang memiliki aktivitas paling baik pada pengujian antagonis dilanjutkan dengan fermentasi. Pertama-tama dibuat *starter* pada masing-masing isolat menggunakan media *M1 Seed* sebanyak 120ml. selanjutnya media yang digunakan untuk fermentasi yaitu media *M1 Fermentation*, Starter yang telah dibuat sebelumnya dimasukkan kedalam erlenmeyer yang berisi *M1 Fermentation* sebanyak 10% dari volume media

fermentasi. Fermentasi dilakukan dalam kondisi agitasi dengan kecepatan 150 rpm.

b. Ekstraksi senyawa metabolite

Media fermentasi yang telah difermentasi selama 16 hari kemudian disonikasi untuk memecah sel. Cairan supernatan diekstraksi dengan pelarut etil asetat (1:1 v/v) dalam corong pisah sebanyak dua kali. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan lalu di simpan dalam desikator untuk digunakan pada uji aktivitas antimikroba.

c. Pengujian aktivitas antimikroba

Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar. Ekstrak etil asetat yang telah di peroleh kemudian dibuat variasi konsentrasi uji 10%, 5% dan 2.5% dengan menggunakan pelarut etil asetat. Ekstrak ditimbang sebanyak 2 mg kemudian dilarutkan menggunakan etil asetat 1 ml (Konsentrasi 10%). Konsentrasi 10% kemudian dipipet sebanyak 0,5 ml lalu dicukupkan menggunakan etil asetat hingga 1 ml (konsentrasi 5%). Konsentrasi 5% dipipet sebanyak 0,5 ml kemudian dicukupkan dengan etil asetat hingga 1 ml (Konsentrasi 2.5%). Kemudian kontrol negatif berupa paper disk yang berisi etil asetat sedangkan kontrol positif berupa peper disk berisi antibiotik (Cloramfenikol, Ketoconazole). Larutan konsentrasi yang sudah dibuat masing-masing dipipet sebanyak 20 µl lalu ditetaskan pada paper disk kosong. Setelah menguap paper disk kemudian di letakkan secara aseptis pada cawan petri yang berisi media yang mengandung masing-masing mikroba uji. Lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1x24 jam untuk bakteri dan pada suhu 25°C selama 3x24 jam untuk Fungi. Zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur menggunakan jangka sorong.

8. Identifikasi Molekular *Actinomycetes*

a. Ekstraksi DNA

Isolat aktif aktinomycetes ditumbuhkan 7 hari pada media *yeast malt agar* pada suhu 28°C, kemudian di ekstraksi menggunakan Quick-DNA Magbead Plus Kit (ZymoResearch, D4082) (B/7.2.1/IKP/009) bakteri Kit : diambil sebanyak $\pm 1 \times 10^9$ dimasukkan kedalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml lalu ditambahkan 200 μ l/gram + 4 mg/ml lysozim lalu divortex hingga lysozim melarut sempurna dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. kemudian ditambahkan 20 μ l Proteinase K lalu divortex dan diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit dengan posisi tube dibolak-balik setiap 3 menit. Selanjutnya pada proses lysis; ditambahkan 200 μ l GB Buffer kedalam sampel lalu divortex selama 10 detik, diinkubasi pada 70°C selama 10 menit dan selama inkubasi posisi tube dibolak-balik setiap 3 menit.

Pada proses pengikatan DNA ditambahkan 200 μ l etanol absolut, kemudian dishaker cepat selama 2 menit. Kemudian pindahkan campuran kedalam GD Column dan dilakukan proses pencucian dengan menambahkan 400 μ l W1 Buffer kedalam GD column, disentrifus selama 30 menit selanjutnya ditambahkan lagi 600 μ l Wash Buffer, disentrifus selama 30 menit, dipisahkan filtrat dan endapannya. Filtrat ditempatkan ke tube *collection* 2 ml, disentrifus selama 3 menit. Selanjutnya pada proses *elution* ditambahkan 100 μ l *elution* Buffer yang telah dipanaskan, didiamkan selama 5 menit kemudian disentrifus selama 30 menit. Hasil purifikasi dilanjutkan untuk proses PCR.

b. Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan Metode PCR

Amplifikasi gen 16S rRNA untuk *actinomycetes* di amplifikasi dengan menggunakan kit MyTaq HS Red Mix, 2X (Bioline, BIO-25048) (B/7.2.1/IKP/002) dan primer 63f (5'-

CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan primer reserve 1387r (5'-GGGCGGTGTGTACAAGGC-3'). Kondisi termal siklus diatur sebagai berikut: Pre denaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit, denaturasi DNA target pada suhu 94°C selama 15 detik, annealing primer pada suhu 55°C selama 15 detik, dan ekstensi primer pada suhu 72°C selama 15 detik, dilanjutkan dengan 35 siklus amplifikasi untuk denaturasi, annealing primer dan ekstensi primer. Kemudian dilanjutkan dengan post ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit dan selanjutnya didinginkan pada suhu 10°C.

c. Deteksi Produk PCR dengan elektroforesis

Gel agarosa 0.8% dibuat dengan mencampurkan 1,5 gr serbuk agarosa ke dalam 100 mL TAE 1x Buffer di erlenmeyer kemudian dipanaskan ke dalam microwave selama 2 menit hingga mendidih, lalu ditambahkan 8 µL Ethidium Bromida. Cairan gel lalu didinginkan di suhu kamar. Setelah agak dingin, cairan gel dituang ke cetakan gel elektroforesis dengan menggunakan sisir gel dengan jumlah sisir 14 sumur. Masing-masing 5 µl produk amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 0.8% yang terendam dalam tangki yang berisi TAE Buffer. Selanjutnya, elektroforesis dijalankan selama 50 menit dengan tegangan konstan 100 volt. Setelah 50 menit elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk diamati dibawah sinar UV. Hasil positif jika terdapat hanya satu pita DNA.

d. Sekuensing DNA

Produk PCR dari sampel yang menunjukkan hasil elektroforesis yang positif dilakukan Sekuensing dua arah menggunakan metode *Sanger DNA Sequencing by using Capillary Electrophoresis* (Pengujian Lab Subkontrak 1st BASE). Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan melakukan BLAST urutan nukleotida dari hasil sekuensing 16S rRNA

dengan data base yang tersedia pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> yang digunakan untuk mencari similaritas suatu sekuens nukleotida atau protein (*query sequence*) dengan sekuens data base (*subject sequence*). Pensejajaran sekuens dilakukan dengan menggunakan Analisis Bioinformatika hasil Sanger Sequencing (B/7.2.1/IKP/006). Selanjutnya visualisasi kekerabatan menggunakan pohon filogenetik Program MEGA 6.

9. Identifikasi profil kimia dari ekstrak *Peperomia pellucida* dan metabolit sekunder *actinomycetes*

1. Pembuatan simplisia *P. pellucida*

Tumbuhan *P. Pellucida* yang diambil pada daerah karst Maros dan pada daerah Non karst di Makassar dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran-kotoran dari bahan simplisia, kemudian dilakukan pencucian menggunakan air bersih dan mengalir, kemudian dilakukan pengeringan hingga simplisia menjadi kering. Kemudian simplisia yang telah kering dilakukan sortasi kering untuk memisahkan kotoran-kotoran yang tertinggal. Simplisia yang telah disortir kemudian dihaluskan menggunakan blender kemudian diayak untuk memperoleh serbuk simplisia, kemudian serbuk simplisia disimpan didalam wadah bersih , kering dan terlindung dari cahaya.

2. Ekstraksi simplisia *P. pellucida*

Serbuk simplisia tumbuhan *P. Pellucida* yang telah di peroleh ditimbang 10 gram kemudian dilakukan maserasi bertingkat menggunakan pelarut etil asetat, dibasahi simplisia sedikit demi sedikit sambil diaduk, setelah pelarut etil asetat merendam simplisia hingga ketinggian pelarut 1 cm dari permukaan serbuk, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 3 x 24 jam, sesekali dilakukan pengadukan. Filtrate dan ampas yang diperoleh dipisahkan pada wadah berbeda, ampas

yang diperoleh kemudian dimaserasi dengan pelarut yang sama sebanyak 2 kali. Selanjutnya hasil maserasi disaring dan filtrate yang diperoleh dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50°C, sehingga diperoleh ekstrak kental etil asetat. Selanjutnya dilakukan kromatografi lapis tipis untuk mengetahui profil kimia.

3. Kromatogram Lapis Tipis

Ekstrak etil asetat dari tumbuhan *P. pellucida* yang telah diperoleh dari daerah karst dan non karst serta ekstrak metabolit sekunder *actinomyces* kemudian dilanjutkan dengan uji KLT menggunakan TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄s. Lempeng yang sebelumnya telah di aktifkan pada oven kemudian ditotolkan masing-masing ekstrak dan didiamkan beberapa saat hingga kering lalu dimasukkan dalam chamber yang berisi eluen Metanol : Air (4:1 v/v). Setelah itu diamati pada lampu UV 254 nm dan 365 nm. Setelah itu di semprot menggunakan pereaksi H₂SO₄ 10% lalu dikeringkan dan dibakar hingga kecoklatan.