

**KARAKTERISASI DAN UJI DAYA HAMBAT ISOLAT
ACTINOMYCETES ASAL TAMAN NASIONAL
BALURAN TERHADAP JAMUR**

SKRIPSI



Diajukan untuk Memenuhi Persyaratan Penyelesaian Program Sarjana Sains
Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

Oleh :

Erika Nugraheni

NIM. 971810401065



Student
Registration
No. 01 reg 245
JH

J
Rinc
589.92
NUG
K

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**
Januari, 2004

MOTTO

Takut akan Tuhan adalah permulaan pengetahuan, tetapi orang bodoh menghina hikmat dan didikan.

(Ams 1:7)

Kegagalan bukanlah akhir segala-galanya melainkan awal dari pengetahuan akan kebenaran.

(Erika)

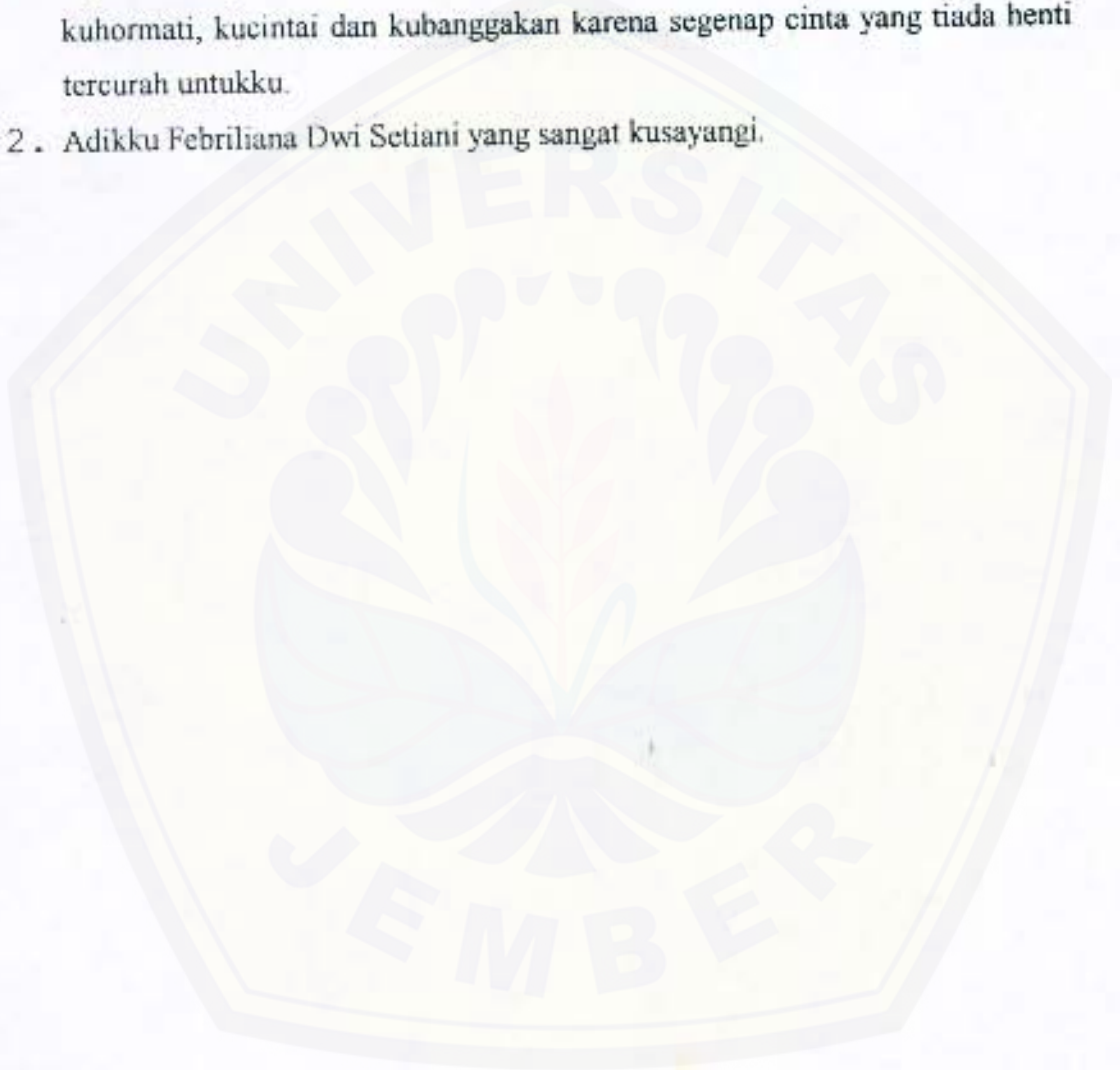
Lebih baik mempunyai satu talenta berbuah dua kali lipat daripada mempunyai sepuluh talenta yang tak berbuah.

(Erika)

HALAMAN PERSEMBAHAN

Dalam nama Bapa, Putra dan Roh Kudus, kupersembahkan Karya Ilmiah Tertulis ini untuk :

1. Papa Soenarjo Atmantawijana dan Mama C. Ernie Setiawati yang selalu kuhormati, kucintai dan kubanggakan karena segenap cinta yang tiada henti tercurah untukku.
2. Adikku Febriliana Dwi Setiani yang sangat kusayangi.

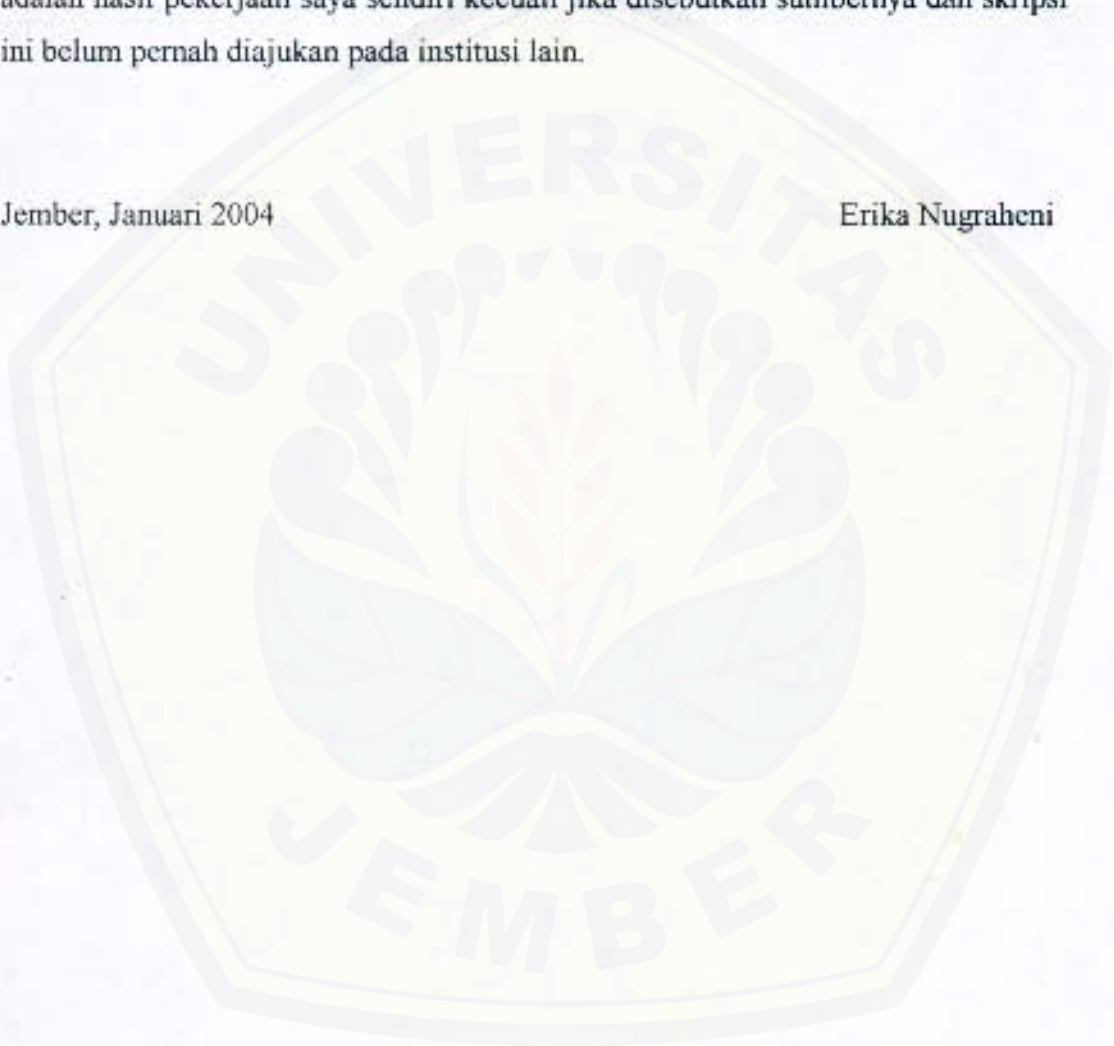


DEKLARASI

Skripsi ini berisi hasil penelitian mulai bulan Maret sampai September 2003 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Bersama ini saya menyatakan bahwa isi skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri kecuali jika disebutkan sumbernya dan skripsi ini belum pernah diajukan pada institusi lain.

Jember, Januari 2004

Erika Nugraheni



ABSTRAK

Karakterisasi dan Uji Daya Hambat Isolat Actinomycetes Asal Taman Nasional Baluran terhadap Jamur, Erika Nugraheni, 971810401065, Skripsi, Januari, 2004, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

Actinomycetes merupakan kelompok mikroba yang banyak diketahui menghasilkan senyawa antimikroba yang dapat dimanfaatkan untuk pengendalian hayati diantaranya penyakit tanaman yang disebabkan oleh jamur. Penelitian ini bertujuan mengkarakterisasi sifat morfologi makroskopis, mikroskopis, tingkat keasaman (pH) media pertumbuhan isolat actinomycetes asal TNB dan uji daya hambatnya terhadap jamur *Fusarium* sp., *Aspergillus flavus* dan *A. niger*. Pada penelitian ini, tiga macam genus isolat actinomycetes berhasil dideterminasi yang terdiri dari genus *Micromonospora*, *Rhodococcus* dan *Streptomyces*. Isolat tersebut tumbuh baik pada media PDA dengan pH 7 dan 9 tetapi tidak tumbuh baik pada pH 2 dan 5. Uji daya hambat menunjukkan bahwa *Micromonospora* sp. galur T1 paling berpotensi untuk mengendalikan tiga jenis jamur uji. *Rhodococcus* sp. galur T3 tidak mampu menghambat *Fusarium* sp. dan *A. niger*. Sedangkan *Streptomyces* sp. galur T30 mempunyai daya hambat terhadap ketiga jamur uji yang lebih kecil daripada *Micromonospora* sp. galur T1.

Kata kunci : karakterisasi, daya hambat, actinomycetes, jamur.

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diterima oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada:

Hari : RABU

Tanggal : 04 FEB 2004

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua (Dosen Pembimbing Utama)

Sekretaris (Dosen Pembimbing Anggota)



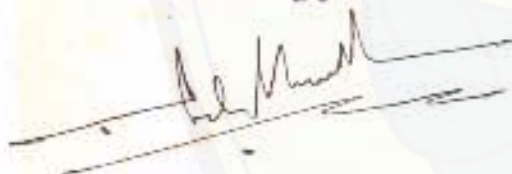
(Drs. Sutoyo, M.Si.)
NIP. 131 993 435



(Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.)
NIP. 131 832 331

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II



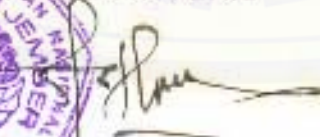
(Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.)
NIP. 132 083 605



(Sattya Arimurti, S.P., M.Si.)
NIP. 132 240 149



Mengesahkan
Dekan FMIPA UNEJ



(Drs. Sujito, Ph.D.)
NIP. 131 756 176

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah Yang Maha Esa karena kasih sayang-Nya yang teramat besar, telah membimbing dan memberikan kekuatan kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Pembuatan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Strata Satu Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Penelitian ini mengambil judul : "Karakterisasi dan Uji Daya Hambat Isolat Actinomycetes Asal Taman Nasional Baluran terhadap Jamur".

Penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

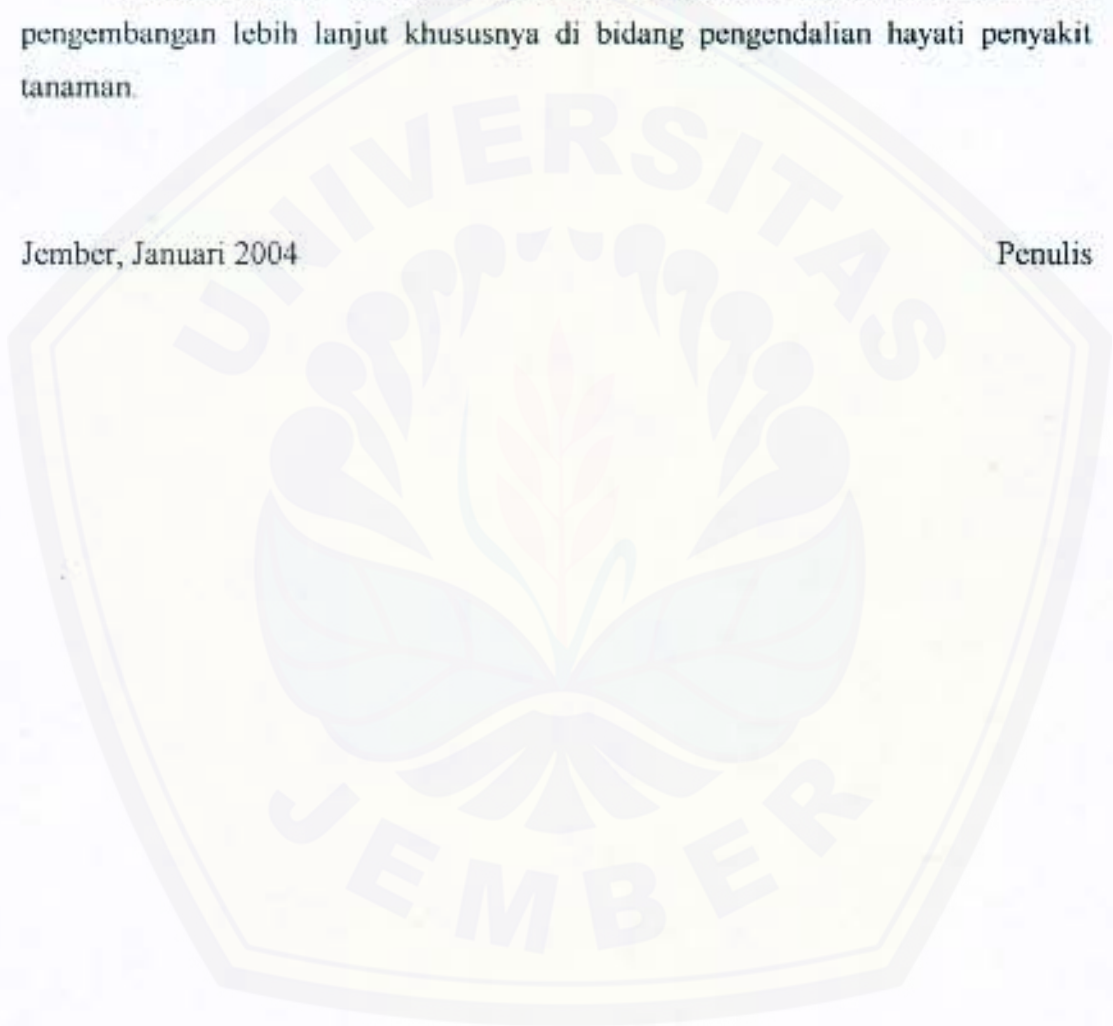
1. Drs. Sutoyo, M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes selaku Dosen Pembimbing Anggota atas segala petunjuk, bimbingan dan arahan yang telah diberikan dengan sabar kepada penulis sampai terselesaikannya skripsi ini.
2. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si selaku Dosen Penguji I dan Sattya Arimurti, S.P., M.Si selaku Dosen Penguji II yang telah memberikan masukan dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Ir. Endang Susetyaningsih dan Sutrisno yang telah banyak membantu selama penelitian.
4. Nenek Sudarmi, Om Darto, Om Bambang, Om Naryo, Tante Dwi, Tante Mari, dan Tante Puji atas segala kasih sayang dan bantuan yang telah diberikan demi terselesaikannya skripsi ini.
5. Sahabat-sahabat sejatiku Elok dan Shinta yang selalu mendengar keluh kesahku dan memberikan dorongan semangat dalam proses penyusunan skripsi ini serta mewarnai hari-hariku dengan kasih sayang yang tulus.
6. Teman-teman Biologi angkatan '97 (Ila', Yetti, Jumini, Nining, Aci, Didin, Ririn) yang telah memberikan dorongan semangat, mendengar keluh kesahku dan mewarnai hari-hariku dengan cerita dan canda.
7. Erika, Indah R.A., Su'udah, Aries, Tyas, Lutfi, Agus dan Rijal yang telah membantuku selama penelitian.

8. Semua teman Biologi FMIPA dari semua angkatan yang telah hadir dalam seminar proposal dan hasil.
9. Mas Imam, Pak Handoko, Mas Ahsan, Karno dan Asim (Rental Bintang Computer) yang telah memberikan bantuan lebih dari yang seharusnya.
10. Semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini.

Semoga skripsi ini bermanfaat untuk dijadikan acuan penelitian dan pengembangan lebih lanjut khususnya di bidang pengendalian hayati penyakit tanaman.

Jember, Januari 2004

Penulis



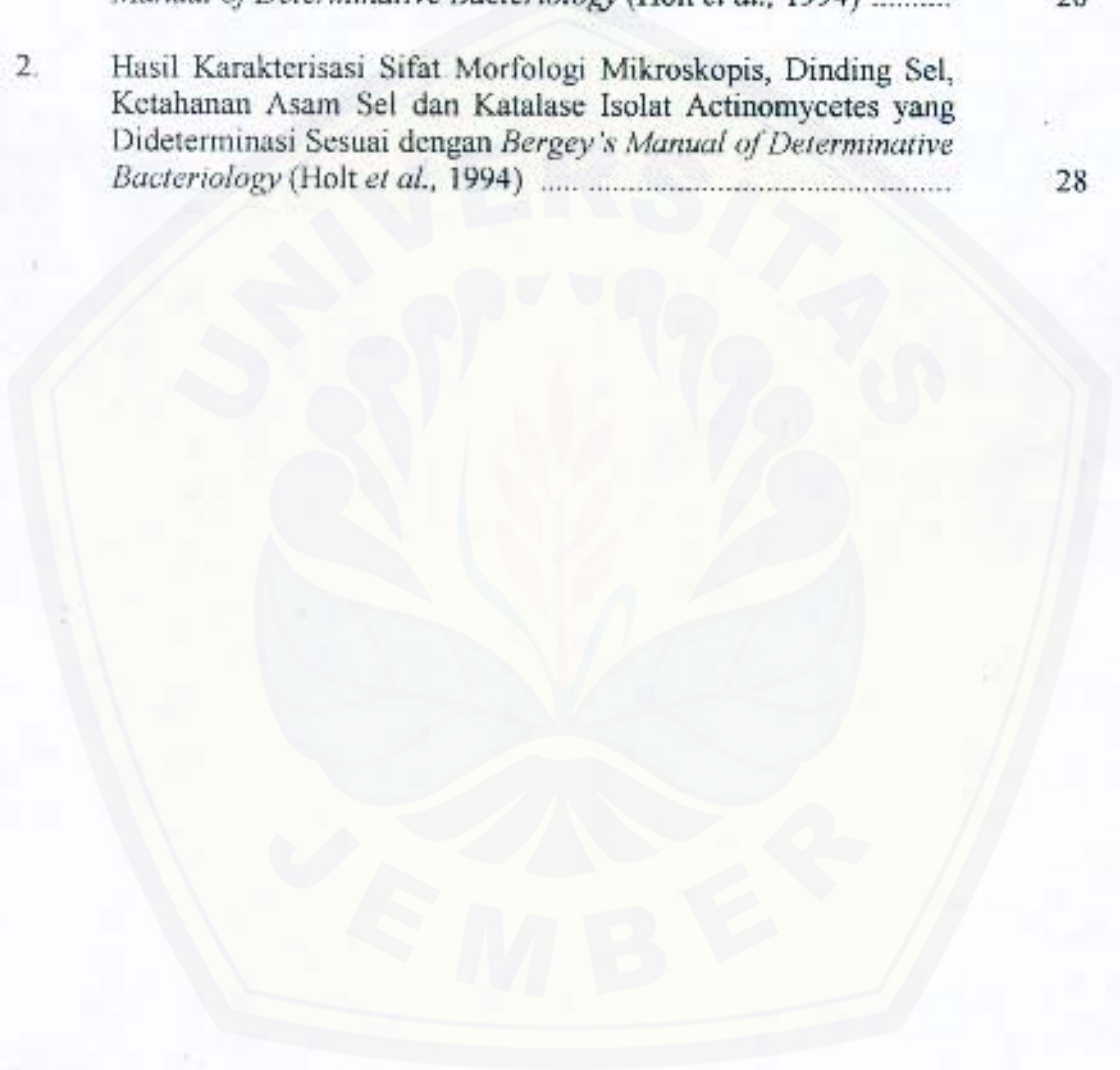
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN MOTTO.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN DEKLARASI.....	iv
ABSTRAK.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Permasalahan.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Pengelompokan Actinomycetes.....	4
2.2 Distribusi Actinomycetes.....	7
2.4 Peranan Actinomycetes.....	8
2.5 Teknik Isolasi dan Identifikasi.....	9
III. METODOLOGI.....	12
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	12
3.2 Bahan dan Alat Penelitian.....	12
3.3 Metode Penelitian.....	13
3.3.1 Peremajaan Isolat Actinomycetes.....	13
3.3.2 Karakterisasi Morfologi Makroskopis.....	13
3.3.3 Karakterisasi Morfologi Mikroskopis.....	14
3.3.4 Karakterisasi Dinding dan Ketahanan Asam Sel.....	15
3.3.5 Karakterisasi Aktivitas Katalase.....	16
3.3.6 Uji Pertumbuhan Pada Media dengan Tingkat Keasaman Berbeda.....	16
3.3.7 Uji Penghambatan Isolat Actinomycetes terhadap Jamur.....	17

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	19
4.1 Sifat Morfologi Makroskopis Isolat Actinomyces Asal Taman Nasional Baluran.....	19
4.2 Sifat Morfologi Mikroskopis Isolat Actinomyces Asal Taman Nasional Baluran.....	23
4.3 Sifat Dinding dan Ketahanan Asam Sel.....	25
4.4 Sifat Aktivitas Katalase.....	27
4.3 Kemampuan Pertumbuhan Pada Media dengan Tingkat Keasaman Berbeda.....	29
4.4 Kemampuan Penghambatan Isolat Actinomyces Asal TNB terhadap Jamur.....	32
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	38
5.1 Kesimpulan.....	38
5.2 Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	43

DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Hasil Karakterisasi Sifat Morfologi Makroskopis Isolat Actinomycetes yang Dideterminasi Sesuai dengan <i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i> (Holt et al., 1994)	20
2. Hasil Karakterisasi Sifat Morfologi Mikroskopis, Dinding Sel, Ketahanan Asam Sel dan Katalase Isolat Actinomycetes yang Dideterminasi Sesuai dengan <i>Bergey's Manual of Determinative Bacteriology</i> (Holt et al., 1994)	28



DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Koloni-koloni Isolat T1 Berumur 15 Hari (A); T3 Berumur 15 Hari (B); T30 Berumur 10 Hari (C) dari Kelompok Actinomycetes Asal TNB dan <i>S. olivaceus</i> FNCC 0174 Berumur 10 Hari (D) sebagai Isolat Perbandingan yang Ditumbuhkan pada Media PDA dan Diamati dari Permukaan Atas (Gambar Atas) dan Bawah (Gambar Bawah)	22
2. Struktur Mikroskopis dan Bentuk Alat Perkembangbiakan Seksual Isolat Actinomycetes T1 (A), T3 (B), T30 (C) Asal TNB dan <i>S. olivaceus</i> FNCC 0174 (D) yang Ditumbuhkan pada Biakan Kaca Obyek dengan Perbesaran 1000 kali.....	24
3. Sifat Gram Isolat Actinomycetes T1 (A), T3 (B), T30 (C) Asal TNB dan <i>S. olivaceus</i> FNCC 0174 (D) dengan Perbesaran 400 kali.....	25
4. Sifat Tahan Asam Isolat Actinomycetes T1 (A), T3 (B), T30 (C) Asal TNB dan Isolat Referensi (<i>S. olivaceus</i> FNCC 0174) (D) dengan Perbesaran 400 kali.....	27
5. Pengaruh pH Media Pertumbuhan terhadap Pertumbuhan Isolat Actinomycetes Asal TNB dan <i>S. olivaceus</i> FNCC 0174 (Isolat Referensi).....	30
6. Persentase Daya Hambat Isolat <i>Micromonospora</i> sp. galur T1(M), <i>Rhodococcus</i> sp. galur T3 (R) dan <i>Streptomyces</i> sp. galur T30 (S) Actinomycetes Asal TNB masing-masing terhadap <i>Fusarium</i> sp. (a), <i>A. flavus</i> (b) dan <i>A. niger</i> (c).....	33

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Tabel Diferensiasi Genus Actinomycetes Menurut Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Sesuai dengan Isolat Actinomycetes Asal TNB.....	43
2. Gambar Uji Daya Hambat Antara Actinomycetes dengan <i>Fusarium</i> sp. yang Ditumbuhkan Pada Media PDA Selama 6 Hari. <i>Fusarium</i> sp. Sebagai Kontrol (A), <i>Micromonospora</i> sp. galur T1 Diuji dengan <i>Fusarium</i> sp. (B), <i>Rhodococcus</i> sp. galur T3 Diuji dengan <i>Fusarium</i> sp. (C), <i>Streptomyces</i> sp. galur T30 Diuji dengan <i>Fusarium</i> sp. (D).....	44
3. Gambar Uji Daya Hambat Antara Actinomycetes dengan <i>A. flavus</i> yang Ditumbuhkan Pada Media PDA Selama 6 Hari. <i>A. flavus</i> Sebagai Kontrol (A), <i>Micromonospora</i> sp. galur T1 Diuji dengan <i>A. flavus</i> (B), <i>Rhodococcus</i> sp. galur T3 Diuji dengan <i>A. flavus</i> (C), <i>Streptomyces</i> sp. galur T30 Diuji dengan <i>A. flavus</i> (D).....	44
4. Gambar Uji Daya Hambat Antara Actinomycetes dengan <i>A. niger</i> yang Ditumbuhkan pada Media PDA Selama 6 hari. <i>A. niger</i> Sebagai Kontrol (A), <i>Micromonospora</i> sp. galur T1 Diuji dengan <i>A. niger</i> (B), <i>Rhodococcus</i> sp. galur T3 Diuji dengan <i>A. niger</i> (C), <i>Streptomyces</i> sp. galur T30 Diuji dengan <i>A. niger</i> (D).....	45
5. Tabel Pengaruh Isolat-isolat Actinomycetes terhadap Luas Pertumbuhan Koloni <i>Fusarium</i> sp., <i>A. flavus</i> , dan <i>A. niger</i>	45
6. Tabel Pertumbuhan Jamur <i>Fusarium</i> sp., <i>A. flavus</i> , dan <i>A. niger</i> pada Media PDA Tanpa Isolat Actinomycetes.....	45
7. Komposisi Media <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	46
8. Komposisi Pewarna Gram.....	46
9. Komposisi Pewarna Tahan Asam.....	47



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki biodiversitas yang tinggi, baik jenis hewan, tumbuhan maupun mikroba. Masing-masing organisme tersebut hidup pada berbagai kondisi alam dengan peranan yang berbeda-beda bagi kehidupan manusia. Namun demikian peranan mikroba masih banyak yang belum dieksplorasi secara optimal. Sesuai dengan kebutuhan manusia yang semakin bertambah maka eksplorasi jenis-jenis yang berasal dari alam dan liar masih sangat perlu dilakukan. Eksplorasi mikroba dapat diawali dengan cara isolasi dan selanjutnya dilakukan karakterisasi serta uji potensinya.

Beberapa jenis mikroba dari kelompok actinomycetes bersifat menghambat terhadap sel hidup. Sifat penghambatan actinomycetes antara lain berkaitan dengan metabolit sekunder yang dihasilkannya. Kemampuan isolat actinomycetes dalam menghasilkan metabolit sekunder bisa dimanfaatkan dalam bidang kesehatan dan pengendalian hayati pada penyakit tumbuhan yang disebabkan oleh mikroba.

Taman Nasional Baturan (TNB) didalamnya terdapat beberapa jenis hutan yaitu savana, hutan yang hijau sepanjang tahun (*evergreen*), dan mangrove yang masih dianggap asli (Sedhana, 1982). Di TNB diduga terdapat actinomycetes yang unik dan potensial. Di antara anggota kelompok actinomycetes mempunyai keragaman karakteristik antara lain sifat morfologi. Berdasarkan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh beberapa anggota dari actinomycetes diduga juga mempunyai potensi yang berbeda sebagai agen pengendalian hayati.

Karakteristik masing-masing jenis isolat yang ditemukan dari alam perlu dipelajari untuk mempermudah dalam identifikasi dan mengenali sifat pertumbuhannya sehingga akan mempermudah dalam mengkaji potensinya. Penelitian ini dilakukan dengan harapan untuk mendapatkan informasi tentang sebagian dari sifat-sifat isolat actinomycetes asal TNB yang dapat digunakan untuk menentukan yang diduga masing-masing genus berbeda. Selain itu juga

untuk melihat sebagian potensi masing-masing isolat sebagai agen pengendalian hayati.

1.2 Permasalahan

Untuk identifikasi isolat-isolat anggota kelompok actinomycetes yang asli (*original*) dari alam, perlu terlebih dahulu mencoba pembiakan pada media dengan kondisi pertumbuhan yang sesuai. Pada isolat-isolat yang mampu tumbuh dengan baik selanjutnya dapat dipelajari sifat-sifatnya. Untuk mengetahui karakteristik yang lengkap membutuhkan uji coba dengan berbagai metode yang cukup sulit dilakukan. Pada penelitian ini karena tingkat kesulitan yang tinggi maka dilakukan karakterisasi secara parsial, tetapi minimal sudah cukup untuk mengetahui genus-genusnya. Sedangkan untuk mempelajari sebagian potensinya dalam ruang lingkup sebagai agen pengendalian hayati, perlu dilakukan uji penghambatan. Potensi yang dimiliki oleh actinomycetes bermacam-macam, akan tetapi dalam penelitian ini hanya akan dipelajari kemampuan isolat dalam menghambat pertumbuhan jamur.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk karakterisasi sifat morfologi, tingkat keasaman dan kemampuan pertumbuhannya pada media dengan tingkat keasaman yang berbeda serta kemampuan penghambatan beberapa isolat actinomycetes asal dari TNB terhadap pertumbuhan jamur.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi mengenai karakteristik morfologi dan tingkat keasaman (pH) media pertumbuhan yang dapat digunakan untuk dasar sifat-sifat genus masing-masing isolat actinomycetes yang diisolasi dari TNB.
2. Menjadi acuan untuk penelitian lebih lanjut tentang identifikasi tingkat spesies actinomycetes dan potensinya sebagai penghasil metabolit sekunder golongan antimikrob.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pengelompokan Actinomycetes

Populasi actinomycetes diidentifikasi sebagai salah satu kelompok utama dari populasi tanah yang merupakan mikrob Gram positif dan dianggap sebagai kelompok peralihan antara jamur dan bakteri (Kuster, 1968 dalam Singh dan Agrawal, 2002). Actinomycetes dikelompokkan ke dalam Super Kingdom: Bacteria, Filum: Firmicutes, Kelas: Actinobacteria, Anak Kelas: Actinobacteridae, bangsa Actinomycetales. Actinomycetes dibagi ke dalam delapan Suku: Actinomycetaceae, Mycobacteriaceae, Actinoplanaceae, Frankiaceae, Dermatophilaceae, Nocardiaceae, Streptomycetaceae, dan Micromonosporaceae (Holt, 1989 dalam Singh dan Agrawal, 2002). Berdasarkan sistem klasifikasi rRNA 16s actinomycetes dikelompokkan ke dalam 10 Anak Suku, yaitu: Actinomycineae, Corynebacterineae, Frankinae, Glycomycineae, Micrococineae, Micromonosporineae, Propionibacterineae, Pseudonocardineae, Streptomycineae dan beberapa anggota actinomycetes masih sedang dikelompokkan (www.ncbi.nlm.nih.gov dalam Singh dan Agrawal, 2002).

Menurut Waksman (1959), actinomycetes memiliki hubungan dengan bakteri dan jamur. Hubungan actinomycetes dengan bakteri antara lain:

- 1) diameter hifa dan spora actinomycetes (biasanya 0.5-1.0 μ) sama dengan bakteri;
- 2) beberapa actinomycetes bereproduksi melalui fragmen atau oidia yang sama dengan bakteri dalam hal ukuran dan bentuk, yaitu batang dan bola;
- 3) beberapa actinomycetes menghasilkan miselium udara yang tidak sebenarnya, pertumbuhan mereka tampak sama dengan bakteri pleomorfik tertentu, khususnya pada corynebacteria;
- 4) dinding sel actinomycetes tidak mengandung kitin atau selulosa seperti yang terdapat pada jamur, melainkan polimer dari gula, gula amino dan beberapa asam amino seperti pada bakteri Gram positif (Cummins dan Harris, 1958 dalam Burges dan Raw, 1967);

- 5) sensitivitas actinomycetes terhadap antibiotik dan fage menempatkan mereka dengan bakteri dan tidak dengan jamur (Burges dan Raw, 1967).
- 6) actinomycetes adalah prokariot seperti bakteri, sedangkan jamur merupakan eukariot.

Hubungan actinomycetes dengan jamur antara lain:

- 1) produksi dan cara percabangan miselium udara dan cara pembentukan spora, khususnya dalam genus *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Waksmania*, *Streptosporangium*, dan *Thermopolyspora* mirip dengan jamur.
- 2) pertumbuhan beberapa actinomycetes pada permukaan media cair dan padat serta pertumbuhannya dalam suspensi atau kondisi tenggelam sama dengan jamur (Waksman, 1959).

Pengelompokan actinomycetes ke dalam genus didasarkan atas karakteristik morfologi seperti fragmentasi hifa, pembentukan miselium aerial, dan keragaman pembentukan spora (secara tunggal, dalam rantai atau dalam sporangium), sporofor, bentuk spora, warna miselium aerial dan vegetatif (Holt *et al.*, 1994). Ahli taksonomi juga mengevaluasi beberapa karakteristik fisiologi seperti aktifitas enzim, temperatur, kebutuhan oksigen dan produksi fermentasi. Studi secara rinci dengan membandingkan DNA, katalog oligonukleotida rRNA, analisis asam lemak, fosfolipid, menakuinon dan komposisi dinding sel (Joklik *et al.*, 1992).

Menurut Holt *et al.* (1994) actinomycetes dibagi menjadi 8 kelompok:

a. Kelompok 1

Kelompok 1 adalah actinomycetes berbentuk Nocardia (Nocardioform actinomycetes); kelompok ini didasarkan pada filamen yang berfragmen menjadi elemen-elemen yang lebih pendek, pertumbuhan aerial dan produksi rantai spora. Selain itu juga tipe kimia dinding sel, ada tidaknya asam mikolat, dan sifat kimia lainnya. Kelompok ini masih dibagi lagi menjadi empat sub kelompok yaitu sub kelompok 1 adalah bakteri yang mengandung asam mikolat; genus yang termasuk di dalamnya antara lain: genus *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, dan *Tsukamurella*; sub kelompok 2 adalah Pseudonocardia dan genus yang berhubungan, terdiri atas genus *Actinobispora*, *Actinokineospora*,

Actinopolyspora, *Amycolata*, *Amycolatopsis*, *Kibdelosporangium*, *Pseudoamycolata*, *Pseudonocardia*, *Saccharomonospora*, dan *Saccharopolyspora*; sub kelompok 3 adalah *Nocardioides* dan *Terrabacter*, terdiri atas genus *Nocardioides* dan *Terrabacter*; sub kelompok 4 adalah *Promicromonospora* dan genus yang berhubungan, terdiri atas genus *Jonesia*, *Oerskovia*, dan *Promicromonospora*.

b. Kelompok 2

Kelompok 2 adalah genus dengan sporangium multilokular; pengelompokan didasarkan pada filamen-filamen yang dibagi oleh septa longitudinal dan transversal, adanya elemen-elemen seperti kokoid yang motil (*Dermatophilus* dan *Geodermatophilus*) atau nonmotil (*Frankia*).

c. Kelompok 3

Kelompok 3 adalah Actinoplanetes; pengelompokan didasarkan pada pembentukan filamen stabil dengan ada atau tidaknya pertumbuhan aerial. Spora motil diproduksi dalam sporangium (*Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Dactylosporangium*, *Pilimelia*), atau spora nonmotil yang diproduksi secara tunggal (*Micromonospora*) atau dalam rantai (*Catellatospora*). Dinding sel mengandung *meso*-DAP, glisin, arabinosa dan silosa yang ditemukan dalam seluruh hidrolisat sel.

d. Kelompok 4

Kelompok 4 adalah Streptomycetes dan genus yang berhubungan; kelompok ini didasarkan atas pembentukan filamen stabil dan pertumbuhan aerial yang luas dengan spora berantai panjang (*Streptomyces* dan *Streptoverticillium*). Genus lain tidak atau sedikit memproduksi pertumbuhan aerial (*Intrasporangium*, *Kineosporia*, *Sporichthya*) dan terdapat variasi bentuk spora.

e. Kelompok 5

Kelompok 5 adalah Maduromycetes; kelompok ini didasarkan atas pembentukan filamen stabil dan produksi berbagai pertumbuhan aerial yang membawa spora-spora. Rantai-rantai pendek artrospora dihasilkan oleh *Microbispora* (dua spora), *Microtetrastora* (empat spora), dan *Actinomadura* (jumlah bervariasi). Genus lain menghasilkan spora dalam sporangium yang motil

(*Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora*) atau nonmotil (*Streptosporangium*). Dinding sel mengandung *meso*-DAP, dan hidrolisat sel mengandung madurosa. Kelompok ini masih dibagi lagi menjadi dua sub kelompok yaitu sub kelompok 1 adalah *Streptosporangium* dan genus yang berhubungan, terdiri atas genus *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Spirillospora*, dan *Streptosporangium* dan sub kelompok 2 adalah *Actinomadura* hanya terdiri atas satu genus yaitu *Actinomadura*.

f. Kelompok 6

Kelompok 6 adalah *Thermomonospora* dan genus yang berhubungan; pengelompokan didasarkan atas pembentukan filamen stabil dan produksi pertumbuhan aerial yang membawa spora tunggal (*Thermomonospora*), dalam rantai (*Actinosynnema*, *Nocardiopsis*), atau dalam struktur seperti sporangium (*Streptoalloteichus*). Dinding sel mengandung *meso*-DAP, tetapi tidak ada karakteristik asam amino atau gula dalam seluruh hidrolisat sel.

g. Kelompok 7

Kelompok 7 adalah *Thermoactinomycetes*; kelompok ini hanya berisi satu genus yaitu *Thermoactinomyces*. Genus ini membentuk filamen stabil dan menghasilkan pertumbuhan aerial. Selain itu dibentuk spora tunggal (endospora) baik pada filamen aerial maupun filamen vegetatif. Semua spesies bersifat termofilik. Dinding sel mengandung *meso*-DAP tetapi tidak ada karakteristik asam amino atau gula.

h. Kelompok 8

Kelompok 8 adalah genus lain; kelompok ini berisi tiga genus yaitu: *Glycomyces*, *Kitasatosporia*, dan *Saccharothrix* yang tidak dapat dimasukkan ke dalam kelompok lain. Mereka semua menghasilkan pertumbuhan aerial yang membawa rantai-rantai spora.

2.2 Distribusi Actinomycetes

Actinomycetes tersebar luas di alam, ditemukan pada setiap substrat alam, udara, air, dalam bahan makanan, dan tanah. Selain itu juga ditemukan di kutub utara dan pegunungan tinggi, lapisan dalam tanah, dan deposit minyak. Tanah dan

kompos sangat dikehendaki untuk perkembangan actinomycetes sehingga jumlah dan jenisnya sangat melimpah. Sebaliknya laut dalam tidak dikehendaki sebagai media untuk perkembangannya. Beberapa jenis substrat cocok sebagai habitat permanen untuk actinomycetes yaitu untuk hidup dan perbanyakannya. Substrat lain hanya untuk habitat sementara bagi actinomycetes, distribusinya melalui pergerakan air dan udara (Waksman, 1959). Persentase actinomycetes dalam total populasi mikroba meningkat menurut kedalaman tanah. Actinomycetes dapat diisolasi dalam jumlah yang cukup bahkan dari sampel tanah dari profil tanah horison C (Rao, 1977).

2.3 Peranan Actinomycetes

Actinomycetes dikenal sebagai mikroba yang berpotensi menghasilkan berbagai macam senyawa metabolit baik metabolit primer maupun sekunder. Metabolit primer biasanya berupa enzim sedangkan metabolit sekunder berupa antibiotik. Metabolit-metabolit tersebut dapat diaplikasikan dalam bidang kesehatan, industri, pangan dan pertanian. Jenis metabolit yang paling banyak dihasilkan oleh actinomycetes adalah metabolit sekunder yang berupa antibiotik. Antibiotik dapat diterapkan pada berbagai bidang yang salah satunya adalah bidang pertanian (Burgess dan Raw, 1967).

Pemanfaatan beberapa jenis mikroba dari kelompok actinomycetes yang bersifat menghambat pada umumnya menghasilkan metabolit sekunder berupa senyawa antimikroba antara lain antibiotik. Pada tahun 1994, hampir 8000 antibiotik telah ditemukan, 80% berasal dari spesies *Streptomyces* dan 20% dari genus kelompok actinomycetes yang lainnya (Zhao, 2002). Beberapa jenis antibiotik telah lama diterapkan di berbagai bidang antara lain bidang pengobatan manusia dan veteriner. Selain itu juga dapat digunakan pada bidang pengawetan makanan, dan pakan ternak, sedangkan mikroba penghasil senyawa antimikroba tersebut dapat diterapkan untuk pengendalian hayati terhadap penyakit tumbuhan. Potensi masing-masing jenis mikroba penghasil antibiotik berbeda-beda, baik dari segi jenis, kuantitas senyawa yang dihasilkan maupun kecepatan dalam penghasilan antibiotik (Burgess dan Raw, 1967).

Permasalahan yang sangat penting dalam bidang pertanian adalah berbagai macam penyakit tanaman yang disebabkan oleh jamur dan bakteri. Tiga jenis jamur patogen diantaranya adalah *Fusarium* sp., *A. flavus* dan *A. niger*. *Fusarium* sp. merupakan jamur penyebab penyakit layu *Fusarium* pada tomat dan pisang (Indrawati *et al.*, 2001) dan busuk akar pada tanaman kedelai (Sinclair dan Backman, 1989 dalam Nyval, 1979). *A. flavus* menyebabkan kerusakan pada waktu penyimpanan atau sering disebut sebagai penyakit gudang pada kacang tanah dengan menghasilkan aflatoksin yang dapat meracuni kacang tanah tersebut (Supartini, 1996). Sedangkan *A. niger* merupakan mikroba perusak pada tanaman yang disimpan dan penyebab *crown rot* pada kacang-kacangan (Melouk dan Backman, 1995). Pengendalian penyakit tanaman yang selama ini dilakukan kurang efektif, relatif mahal, menyebabkan resistensi pada mikroba penyebab penyakit dan tidak ramah lingkungan. Maka pemecahan dari permasalahan tersebut adalah menggunakan metode pengendalian hayati yang diharapkan lebih efektif, lebih murah dan aman bagi lingkungan. Untuk memenuhi tujuan itu perlu dicari mikroba yang berpotensi besar untuk menjadi agen pengendalian hayati (Sukanto, 1995).

Actinomycetes juga mempunyai peranan di alam yaitu sebagai dekomposer pada bahan-bahan organik di tanah. Beberapa jenis isolat anggota kelompok actinomycetes mampu menguraikan selulosa dan polisakarida lain. Kemampuan penguraian bahan-bahan organik disebabkan oleh adanya enzim ekstraselular yang dihasilkan oleh mikroba anggota kelompok actinomycetes (Ingham, 2004). Selain itu actinomycetes juga mampu membentuk nodul pada akar tumbuh-tumbuhan yang bukan dari jenis kacang-kacangan, biasanya dari jenis *Frankia* sp. Nodul yang dibentuk terlibat dalam proses fiksasi N_2 yang selanjutnya dapat dimanfaatkan sebagai sumber nitrogen oleh tumbuh-tumbuhan (Schlegel dan Schmidt, 1994).

2.4 Teknik Isolasi dan Identifikasi

Pada prinsipnya teknik yang digunakan dalam isolasi dan pembiakan bakteri dan jamur dapat diterapkan pada actinomycetes. Actinomycetes dapat

diisolasi dari tanah, kompos, air dan substrat alam lainnya. Metode yang digunakan untuk mengisolasi actinomycetes antara lain metode cawan agar dan biakan selektif. Metode cawan agar dilakukan dengan cara membuat suspensi sampel bahan dalam akuades steril yang kemudian dibuat berbagai pengencerannya dengan akuades steril pula. Hasil pengenceran tersebut ditaburkan pada media agar yang sesuai untuk perkembangan selektif actinomycetes. Selain itu substansi tertentu yang salah satunya adalah antibiotik perlu ditambahkan ke media selektif untuk menghalangi pertumbuhan jamur dan bakteri. Selanjutnya cawan biakan diinkubasi pada temperatur yang sesuai yaitu pada 28-30°C dan diamati setelah 2 sampai 7 hari. Koloni-koloni actinomycetes yang masih bercampur dengan mikrob lain harus diambil dan dipindahkan ke media cawan agar steril sehingga akan didapatkan biakan actinomycetes yang murni. Selanjutnya koloni-koloni dari biakan murni dipindahkan ke media cair atau media padat steril untuk pengamatan lebih lanjut.

Proses identifikasi isolat actinomycetes sangat rumit sebab banyak sifat yang harus dipelajari secara mendalam agar keakuratan sifat-sifat tersebut mampu menunjukkan golongan actinomycetes yang sebenarnya terutama untuk tingkat spesies. Sifat-sifat yang harus dipelajari secara menyeluruh meliputi sifat morfologi, kimia dan fisik. Menurut Waksman (1959) metode yang digunakan untuk karakterisasi morfologi actinomycetes antara lain dengan pengamatan mikroskopis secara langsung, *contact slide* dan mikroskop elektron. Kenampakan koloni actinomycetes yang dapat membedakannya dengan jamur dan bakteri antara lain kompak, berbulu dan memiliki permukaan yang kering, seringkali ditutupi oleh miselium udara (Burrows, 1959).

Menurut Singh dan Agrawal (2002), sifat morfologi makroskopis dan mikroskopis actinomycetes sudah dapat digunakan untuk mengetahui kemungkinan nama genus dari actinomycetes tersebut. Sifat morfologi makroskopis actinomycetes yang harus dipelajari adalah kenampakan koloninya pada media pertumbuhan. Sedangkan sifat morfologi mikroskopis yang harus diketahui antara lain struktur miselium, konidia, sporangium dan struktur-struktur lain yang merupakan ciri khas dari genus isolat anggota kelompok actinomycetes.

Metode yang digunakan untuk mengetahui sifat morfologi makroskopis actinomycetes adalah dengan mengamati kenampakan koloni actinomycetes pada media pertumbuhan. Sedangkan sifat morfologi mikroskopis actinomycetes dipelajari dengan cara mempersiapkan biakan kaca obyek (*slide culture*) terlebih dahulu. Biakan kaca obyek disiapkan dengan menancapkan gelas penutup dengan posisi miring pada media pertumbuhan. Selanjutnya di dekat gelas penutup tersebut diinokulasi dengan biakan actinomycetes dan diinkubasi pada temperatur 28-30°C sampai terjadi sporulasi. Gelas penutup yang dirambati koloni actinomycetes ditangkupkan pada gelas benda yang telah ditetesi agen pembasah. Kemudian diamati di bawah mikroskop (Holt *et al.*, 1994).





III. METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember mulai bulan Maret sampai September 2003.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Isolat-isolat yang diuji dalam penelitian ini antara lain: tiga isolat Actinomycetes asal Taman Nasional Baluran, isolat *Streptomyces olivaceus* FNCC 0174 (isolat referensi asal PAU Pangan dan Gizi UGM), isolat *Fusarium* sp., *Aspergillus flavus*, dan *A. niger* yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Bahan-bahan yang digunakan meliputi media *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), alkohol 70%, HCl 1N, NaOH 1N, larutan kristal ungu (cat Gram A), Iodium (cat Gram B), larutan alkohol asam (cat Gram C), larutan Safranin (cat Gram D), larutan *Ziehl Neelsen carbol fuchsin* (ZN-A), larutan peluntur alkohol asam (ZN- B), larutan *Loeffler's MB* (ZN-C), larutan H₂O₂ 3%, larutan garam fisiologis 0,85%, akuades steril dan spiritus.

Alat-alat gelas yang digunakan antara lain: cawan Petri, gelas piala, tabung reaksi, labu Erlenmeyer, gelas ukur, batang gelas bengkok, gelas obyek, dan gelas penutup. Alat-alat mikroskopis yang dibutuhkan meliputi mikroskop, mikrometer obyektif, mikrometer okuler, dan kaca pembesar. Adapun alat-alat lainnya antara lain: shaker, jarum ose, bor gabus, pipet volume, pipet tetes, pipet mikro, tip, inkubator, desikator, oven, jangka sorong, pH meter, panduan warna *Castell-Polychromos* 9216, timbangan, corong plastik, autoklaf, kertas saring, lampu Bunsen, botol semprot, label, dan kertas tisu.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Peremajaan Isolat Actinomycetes

Biakan murni isolat-isolat actinomycetes yang akan dipelajari terlebih dahulu diremajakan pada media PDA miring. Satu ose hifa isolat actinomycetes dipindahkan dari biakan persediaan ke media PDA miring steril. Biakan diinkubasi pada suhu 28°C selama 7 hari. Biakan yang tumbuh baik kemudian dimurnikan dengan pengenceran dan ditumbuhkan pada media PDA pada cawan Petri. Koloni yang tumbuh terpisah dan menunjukkan kenampakan yang sama dengan biakan induk diisolasi dan ditumbuhkan pada media miring sebagai biakan yang akan diidentifikasi.

3.3.2 Karakterisasi Morfologi Makroskopis

Biakan actinomycetes hasil peremajaan yang telah tumbuh baik diidentifikasi secara makroskopis mengenai sifat morfologinya dengan cara sesuai dengan prosedur seperti pada buku identifikasi *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994). Identifikasi secara makroskopis terhadap isolat-isolat actinomycetes dilakukan pada biakan yang tumbuh dalam cawan agar.

Isolat actinomycetes yang akan diamati sifat morfologi makroskopisnya dipersiapkan dengan cara mengambil dua ose hifa dari hasil peremajaan selanjutnya diencerkan dengan larutan garam fisiologis 0,85% dari pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-6} . Kemudian sebanyak 50 μ l suspensi dari seri pengenceran 10^{-6} disebarakan secara merata dengan menggunakan batang gelas bengkok pada permukaan media PDA yang sebelumnya sudah dituangkan ke dalam cawan Petri steril sebanyak 25 ml. Kemudian biakan diinkubasi pada suhu 28°C selama 15 hari untuk isolat T1 dan T3 dan 10 hari untuk isolat T30 dan *S. olivaceus*. Setiap hari koloni yang tumbuh diamati sifat-sifat morfologinya dengan pengamatan langsung menggunakan kaca pembesar. Pengamatan sifat-sifat morfologi makroskopis isolat actinomycetes meliputi antara lain: bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni, warna koloni, pigmentasi, keadaan permukaan koloni dan diameter

koloni. Diameter koloni masing-masing isolat actinomycetes diukur menggunakan jangka sorong.

3.3.3 Karakterisasi Morfologi Mikroskopis

Karakterisasi morfologi isolat actinomycetes secara mikroskopis dilakukan dengan cara membuat biakan kaca obyek (*slide culture*) dengan cara sesuai dengan prosedur seperti pada buku identifikasi *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994). Secara aseptik gelas penutup ditancapkan pada media PDA 25 ml di cawan Petri steril dengan posisi miring. Kemudian di dekat gelas penutup tersebut diinokulasikan sedikit biakan actinomycetes dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 4 hari. Bagian gelas penutup yang dirambati koloni actinomycetes ditangkupkan di atas gelas benda yang sebelumnya ditetesi dengan akuades steril.

Pengamatan mikroskopis dilakukan setiap hari menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Sifat-sifat morfologi mikroskopis isolat actinomycetes yang diamati antara lain: ada tidaknya percabangan miselium atau hifa, bentuk konidia (tunggal, berpasangan, berantai pendek, berantai panjang); bentuk sporangium; ada tidaknya spora dan susunannya (bila ada tunggal, berpasangan atau berantai panjang atau pendek), dan ada tidaknya fragmentasi hifa.

Diameter hifa dan spora actinomycetes diukur dengan menggunakan mikrometer. Mula-mula mikrometer okular disisipkan pada okular mikroskop. Sebuah mikrometer obyektif diletakkan di bawah lensa obyektif berkekuatan rendah dan digeserkan ke tengah-tengah bidang pandang mikroskop. Okular diputar sehingga garis nolnya akan terletak berimpit dengan garis nol mikrometer obyektif. Kemudian dicari garis berikutnya pada skala okular yang berimpit segaris dengan sebuah garis pada skala mikrometer obyektif. Subskala pada kedua mikrometer dihitung dari garis nol sampai pada titik pertemuan garis mikrometer obyektif dengan mikrometer okular. Subskala tersebut dihitung untuk menentukan faktor kalibrasinya. Faktor kalibrasi dihitung dari hasil pembagian jumlah skala yang pertama sampai dengan skala mikrometer obyektif yang berimpit dengan

skala pada mikrometer okular kali satuan setiap subskala mikrometer obyektif dibagi dengan banyaknya subskala yang pertama sampai dengan terakhir yang berimpit dengan skala pada mikrometer okular.

Bila setiap subskala mikrometer obyektif berukuran 0,01 mm atau 10 μ m dan terdapat 34 subskala mikrometer obyektif pada perbesaran 100 kali yang berimpit dengan mikrometer okular dan melewati tujuh skala mikrometer okular maka faktor kalibrasinya adalah:

$$\frac{7 \times 0,01 \text{ mm}}{34} = 0,002 \text{ mm} = 2 \mu\text{m}$$

Selanjutnya diameter spora dan hifa dihitung berdasarkan jumlah subskala pada mikrometer obyektif yang menunjukkan panjang atau lebar spora dan hifa dikalikan faktor kalibrasi.

3.3.4 Karakterisasi Dinding dan Ketahanan Asam Sel

Pengecatan Gram dilakukan untuk mengetahui sifat dinding sel isolat actinomycetes asal TNB dan isolat referensi apakah bersifat Gram positif atau Gram negatif. Sedikit hifa dari biakan yang terdapat pada media PDA di cawan Petri yang tumbuh baik diambil dan diletakkan pada kedua ujung gelas obyek secara aseptik. Olesan actinomycetes yang telah dibuat difiksasi di atas nyala lampu Bunsen. Selanjutnya olesan tersebut ditetesi dengan Kristal ungu (cat Gram A) selama 2 menit sebagai pewarnaan awal, dibilas dengan air mengalir. Kemudian ditetesi larutan Iodium (cat Gram B) selama 1 menit sebagai mordan, dibilas dengan air mengalir. Larutan alkohol asam (cat Gram C) ditetaskan ke olesan tersebut, dibiarkan selama 10 detik dan dibilas dengan air mengalir. Olesan diwarnai kembali dengan larutan Safranin (cat Gram D), dibiarkan selama 30 detik, lalu dibilas dengan air mengalir. Setelah dikeringanginkan, preparat diamati di bawah mikroskop dimulai dengan lensa perbesaran lemah dilanjutkan dengan perbesaran 400 kali. Isolat yang bersifat Gram positif akan menunjukkan sel yang berwarna ungu sedangkan bila berwarna merah berarti isolat tersebut bersifat Gram negatif.

Pengecatan tahan asam (*acid fast*) perlu dilakukan untuk mengetahui apakah isolat bersifat tahan asam atau tidak tahan asam. Pengecatan tahan asam

(*acid fast*) dilakukan dengan cara mengambil sedikit hifa actinomycetes kemudian dioleskan pada gelas benda yang telah dibersihkan dengan alkohol 70%. Olesan actinomycetes dikeringanginkan dan difiksasi di atas Bunsen. Biakan tersebut dibubuhi dengan cat ZN-A yang berlebihan dan dipanasi di atas nyala lampu Bunsen selama 5-10 menit. Selanjutnya olesan actinomycetes tersebut dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Biakan dicuci dengan ZN-B sebagai peluntur, dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Selanjutnya olesan dibubuhi dengan ZN-C selama 30 detik, kemudian dicuci dengan air mengalir. Setelah dikeringanginkan, diamati di bawah mikroskop dimulai dengan lensa obyektif perbesaran lemah dilanjutkan dengan perbesaran 400 kali. Sel-sel isolat yang bersifat tahan asam akan tampak berwarna merah sedangkan yang bersifat tidak tahan asam berwarna biru.

3.3.5 Karakterisasi Aktivitas Katalase

Uji katalase juga diperlukan untuk mengidentifikasi isolat actinomycetes. Uji katalase dilakukan dengan cara 3-4 tetes hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% diteteskan pada permukaan biakan miring isolat actinomycetes selanjutnya diamati selama 1 menit. Bila muncul gelembung-gelembung udara atau busa pada permukaan koloni berarti isolat tersebut bersifat katalase positif sedangkan bila tidak muncul gelembung maka isolat tersebut bersifat katalase negatif.

3.3.6 Uji Pertumbuhan Pada Media dengan Tingkat Keasaman Berbeda

Kebutuhan tingkat keasaman media perlu dipelajari untuk mengetahui kemampuan tumbuh isolat terhadap pH yang berbeda sehingga akan diketahui kondisi pH media yang optimum untuk pertumbuhannya. pH media yang diuji terhadap pertumbuhan isolat actinomycetes adalah pH 2, 5, 7 dan 9. Pertumbuhan diamati dari hasil pengukuran berat kering isolat yang diuji.

Pengukuran berat kering sebagai hasil pertumbuhan masing-masing isolat actinomycetes dilakukan pada biakan yang ditumbuhkan pada media PDA dalam cawan Petri. Biakan actinomycetes pada media PDA tersebut disiapkan dengan cara menumbuhkan dua ose hifa dari inokulum yang diencerkan terlebih dahulu dengan larutan garam fisiologis 0,85% dari seri pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-6} .

Sebanyak 50 µl suspensi dari seri pengenceran 10^{-6} diinokulasikan ke media PDA 25 ml pada cawan Petri steril. Caranya suspensi tersebut disebarakan di atas permukaan media secara merata menggunakan batang gelas bengkok. Selanjutnya biakan diinkubasi pada suhu 28°C selama 7 hari. Pada hari ke tujuh sejumlah koloni yang mempunyai berat basah 20 mg diambil dengan jarum ose dan ditumbuhkan kembali ke dalam media PDB yang telah diatur pHnya. pH media PDB diatur dengan menambahkan HCl 1N untuk mendapatkan pH rendah dan NaOH 1N untuk mendapatkan pH tinggi. Media PDB diatur pada pH 2, 5, 7 dan 9. Media PDB yang berisi biakan actinomycetes tersebut dishaker dengan kecepatan 150 rpm selama 7 hari. Selanjutnya biakan actinomycetes yang ada pada media PDB disaring dengan kertas saring dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 50°C . Selanjutnya berat kering hifa dan spora ditimbang sampai beratnya konstan. Perlakuan pH dilakukan sebanyak 2 kali. Biakan media PDB berbagai tingkat keasaman disediakan sebanyak dua kali.

3.3.7 Uji Penghambatan Isolat Actinomycetes terhadap Jamur

Jenis isolat actinomycetes yang telah dikarakterisasi secara morfologi dari tingkat keasaman (pH) media pertumbuhannya diuji lebih lanjut daya hambat terhadap jenis-jenis jamur yaitu: *Fusarium* sp., *A. flavus*, dan *A. niger*. Daya hambat actinomycetes tersebut akan menunjukkan potensinya sebagai agen pengendalian hayati terhadap jamur-jamur tersebut.

Percobaan untuk menguji daya hambat isolat actinomycetes terhadap jamur uji sebagai indikator dilakukan dengan metode deskriptif dengan ulangan sebanyak 2 kali. Isolat actinomycetes dan jamur uji sebagai indikator yang akan diuji terlebih dahulu diremajakan pada media PDA miring. Selanjutnya dua ose hifa actinomycetes dari hasil peremajaan diencerkan dengan larutan garam fisiologis 0,85% sampai dengan pengenceran 10^{-6} . Sebanyak 50 µl suspensi dari pengenceran 10^{-6} disebarakan ke permukaan media PDA 25 ml pada cawan Petri steril. Biakan actinomycetes diinkubasi pada suhu 28°C selama 10 hari untuk isolat T30 dan 15 hari untuk isolat T1 dan T3 agar diperoleh koloni yang tumbuh dengan diameter 4 mm. Jamur uji juga diencerkan dengan larutan garam fisiologis

0,85% sampai dengan pengenceran 10^{-6} . Sebanyak 20 μ l suspensi dari pengenceran 10^{-6} tersebut disebarakan ke permukaan media PDA 10 ml. Biakan jamur diinkubasi pada suhu 28°C selama 4 hari. Sifat daya hambat isolat actinomycetes diuji dengan cara inokulum actinomycetes dan jamur uji ditumbuhkan berhadapan dalam cawan Petri yang berisi media PDA 25 ml. Koloni inokulum actinomycetes (10 hari untuk isolat T30 dan 15 hari untuk isolat T1 dan T3) dan jamur uji (4 hari) yang masing-masing berdiameter 4 mm ditumbuhkan dengan cara oposisi langsung menggunakan bor gabus (Dennis dan Webster, 1971b). Jarak antar isolat adalah 2,5 cm di tengah media PDA. Isolat-isolat tersebut diinkubasi pada suhu 28°C selama enam hari (waktu yang diperlukan koloni jamur tanpa actinomycetes atau kontrol memenuhi media). Pada media kontrol, isolat jamur uji ditempatkan pada posisi yang sama tetapi pada tempat yang bersilangan tidak ditambah dengan isolat actinomycetes. Persentase daya hambat dihitung menurut metode Pe'er & Chet (1990) dalam Widyastuti *et al.* (2002).

$$C = \frac{a-b}{b} \times 100\%$$

Keterangan:

C = Persentase daya hambat actinomycetes (%)

a = Luas koloni jamur uji tanpa koloni actinomycetes/kontrol (cm^2)

b = Luas koloni jamur uji dengan koloni actinomycetes (cm^2)

Luas koloni jamur diketahui dengan terlebih dahulu membuat pola koloni pertumbuhannya. Pola pertumbuhan koloni tersebut kemudian ditimbang. Dengan membandingkan luas koloni kertas lain yang ditentukan sebesar 1 cm^2 maka akan diketahui luas koloni jamur yang diamati. Luas koloni jamur diketahui dengan cara menghitung hasil perbandingan berat kertas yang menunjukkan pola pertumbuhan koloni jamur kali luas kertas 1 cm^2 (kertas standar) dengan berat kertas standar seluas 1 cm^2 .

Kemampuan hambatan actinomycetes ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening di sekitar koloni isolat actinomycetes atau persentase luas koloni jamur uji

tanpa actinomycetes. Persentase daya hambat actinomycetes menunjukkan kemampuan hambatan actinomycetes terhadap pertumbuhan jamur uji.





V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan karakterisasi dan identifikasi yang telah dilakukan isolat T1 diduga termasuk genus *Micromonospora*; isolat T3 termasuk genus *Rhodococcus* dan isolat T30 termasuk genus *Streptomyces*.

Micromonospora sp. galur T1 dan *Rhodococcus* sp. galur T3 tumbuh baik pada pH 7 dan 9 sedangkan *Streptomyces* sp. galur T30 tumbuh paling baik pada pH 9. Ketiga isolat actinomycetes asal TNB tidak toleran terhadap pH 2 dan 5 (asam).

Micromonospora sp. galur T1 adalah isolat actinomycetes asal TNB yang paling berpotensi untuk diteliti dan dikembangkan lebih lanjut dalam pengendalian hayati jamur *Fusarium* sp., *A. flavus* dan *A. niger*. *Micromonospora* sp. galur T1 mempunyai daya hambat terbesar pada *A. niger* yaitu sebesar 121,77%. Isolat *Rhodococcus* sp. galur T3 hanya dapat menghambat *A. flavus* dengan persentase daya hambat yang sangat kecil yaitu sebesar 7,30%. Sedangkan pada *Fusarium* sp. dan *A. niger* tidak terhambat oleh *Rhodococcus* sp. galur T3. *Streptomyces* sp. galur T30 memiliki daya hambat terhadap tiga jenis jamur uji tapi lebih kecil daripada *Micromonospora* sp. galur T1 dan lebih besar daripada *Rhodococcus* sp. galur T3.

5.2 Saran

Sifat-sifat yang dipelajari dalam penelitian ini masih secara parsial. Jadi masih banyak sifat yang perlu dipelajari untuk menguatkan dugaan nama genus dan karakterisasi ke tingkat spesies. Sifat-sifat yang perlu diteliti antara lain sifat biokimia dan fisik. Isolat actinomycetes asal TNB yang berpotensi sebagai agen pengendalian hayati dapat diteliti dan dikembangkan lebih lanjut mengenai jenis senyawa antimikrob yang dihasilkan oleh isolat yang berpotensi dan mekanismenya dalam mengendalikan mikroba patogen pada tanaman. Selanjutnya isolat yang potensial tersebut dapat dipelajari dan dikembangkan di lapang yang aplikasinya dalam bentuk inokulum hidup atau senyawa antimikrobnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Alcorno, E. 1983. *Laboratory Fundamentals of Microbiology*. Canada: Addison-Wesley Publishing Company, Inc.
- Burgess, A. and F. Raw. 1967. *Soil Biology*. London: Academic Press.
- Burrows, W. 1959. *Microbiology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Cappuccino, J.G. and N. Sherman. 1996. *Microbiology A Laboratory Manual*. Fourth edition. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Cullimore, D.R. 2000. *Practical Atlas for Bacterial Identification*. Washington, D.C.: Lewis Publishers.
- Dennis, C. and J. Webster. 1971a. Antagonistic Properties of Species Group of Trichoderma. I. Production of Non Volatile Antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57(1).
- Dennis, C. and J. Webster. 1971b. Antagonistic Properties of Species Group of Trichoderma. III. Hyphal Interaction. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 57(3).
- Djafarudin. 1996. *Dasar-Dasar Perlindungan Tanaman (Umum)*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed. Ke-9. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Indrawati, A., A. Khaerani, A. Kusumaningsih, E. Syahputra, I.W. Laba, M. Syakir, M. Taufik, N. Aidawati, Trizelia, U. Khairul dan Zulyusri. 2001. *Konservasi Agens Hayati Organisme Pengganggu Tanaman*. (On line). http://rudyc2.250x.com/sem1_012/ke1_012.htm. [21 Nopember 2003].
- Ingham, E.R. 2004. *The Soil Biology Primer*. (On line) http://soils.usda.gov/sqi/soil_quality/soil_biology/bacteria.html. [5 Januari 2004].
- Ismet, A., S. Vikineswary and W.H. Wong. 2003. *Antagonistic Micromonospora Isolates From Tropical Mangrove Rhizosphere Ecosystem*. (On line). <http://www.dbs.nus.edu.sg/conferences/PGC/UPDATE-ABSTRACTS/posr-ecology.htm>. [23 Oktober 2003].
- Joklik, W.K., H.P. Willet, D.B. Amos, and C.M. Wilfert. 1992. *Zinsser Microbiology* Ed. ke-20. Connecticut: Appleton & Lange.

- Madigan, M.T., J.M. Martinko and J. Parker. 1997. *Biology of Microorganisms*. Eighth edition. New Jersey: Prentice Hall International, Inc.
- Melouk, H.A and P.A. Backman. 1995. *Management of Soilborne Fungal Pathogen* Dalam H.A. Melouk and F.M. Shokes. Peanut Health Management. Minnesota: The American Phytopathological Society (APS Press).
- Nyval, R.F. 1979. *Field Crop Disease Handbook*. Connecticut: A VI Publishing Company, Inc.
- Pelczar, M.J. and E.C.S. Chan. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jilid 1. Terjemahan Ratna Siri Hadioetomo. Jakarta: Universitas Indonesia (UI-Press).
- Rao, N.S.S. 1977. *Soil Microorganisms and Plant Growth*. New Delhi: Mohan Pramlani, Oxford & IBH Publishing Co
- Robert, D.P. and D.R. Fravel. 1993. *Strategies Techniques for Improving Biocontrol of Soilborne Plant Pathogens* Dalam S.O. Duke, J.J. Menn and J.R. Plimmer. Pest Control with Enhanced Environmental Safety. Washington, D.C.: American Chemical Society.
- Schlegel, H.G and K. Schmidt. 1994. *Mikrobiologi Umum*. Edisi ke-6. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Sedhana, M. 1982. *Kondisi Ekologik Taman Nasional Baluran*. Laporan Penelitian. Jember: Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Singh, D. and V.P. Agrawal. 2002. *Biodiversity of Actinomycetes of Lobuche in Mount Everest I* (On line). http://www.nepalschools.org/rlabb/biodiversity_of_actinomycetes_of.htm. [21 Februari 2002].
- Sukanto, S. 1997. *Kajian Pengendalian Biologi Terhadap Penyakit Busuk Buah Kakao (Phytophthora palmivora Butl.)*. Risalah Kongres Nasional XIII dan Seminar Ilmiah PFI. Mataram: Perhimpunan Fitopatologi Indonesia.
- Supartini, V. 1996. *Dampak Serangan Jamur Aspergillus flavus terhadap Kandungan Aflatoksin Pada Kacang Tanah Dalam Beberapa Jenis Kemasan*. Laporan Penelitian. Jember: Lembaga Penelitian Universitas Jember.
- Waksman, S.A. 1959. *The Actinomycetes : Nature, Occurrence, and Activities*. Vol. I. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.

Widyastuti, S.M., Sumardi, dan S. Widyaningsih. 2002. Pengaruh Metode Penyimpanan Terhadap Viabilitas dan Aktivitas Antagonistik Isolat *Trichoderma* Spp. Dalam Menghambat Jamur Patogen Tular Tanah. *Biota Vol VII (1)*, Februari 2002.

Winarno, F.G. 1995. *Enzim Pangan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

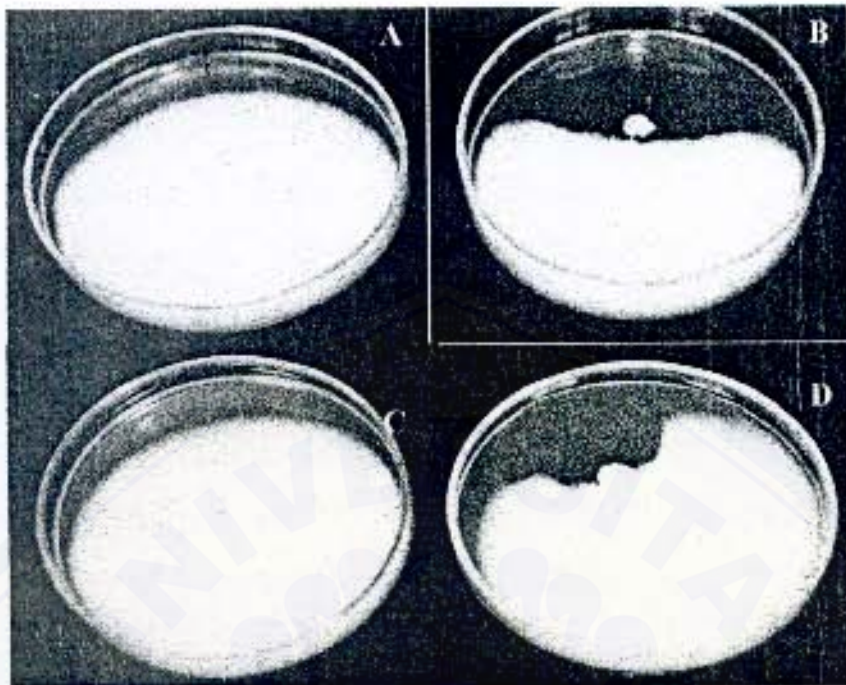
Zhao, H. 2002. *Isolation and Characterization of Environmental Actinomycetes* (On line). <http://qbab.aber.ac.uk/roy/projects/projectn.htm>. [21 Februari 2002].



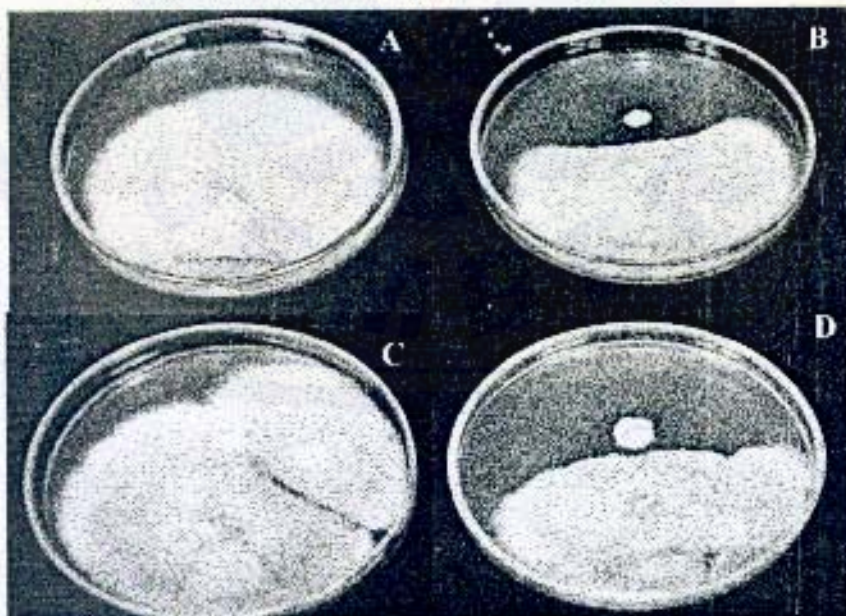
LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel Diferensiasi Genus Actinomycetes Menurut *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* yang Sesuai dengan Isolat Actinomycetes Asal TNB

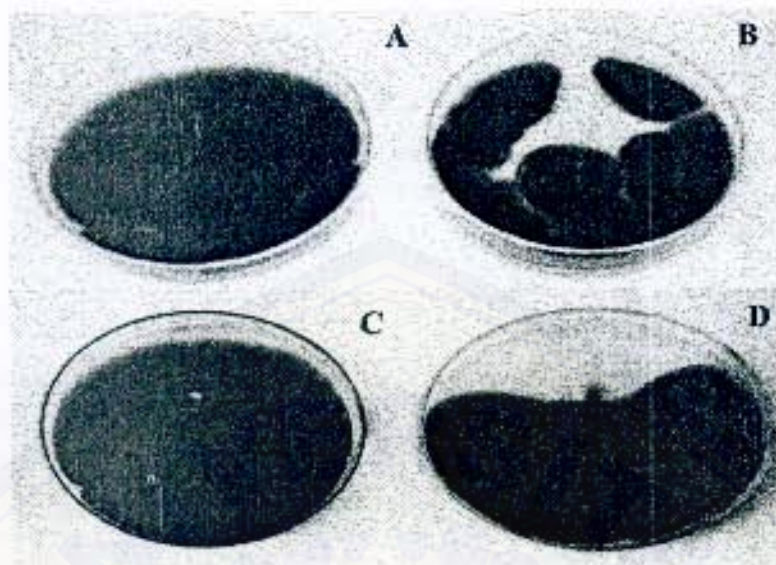
No.	Genus	Ciri-ciri
1.	<i>Micromonospora</i>	Berkembang baik, bercabang, septa miselium rata-rata berdiameter 0,5 μm . Spora-spora nonmotil tunggal, sesil, atau mempunyai sporofor pendek atau panjang yang sering terjadi dalam kelompok-kelompok bercabang. Sporofor berkembang secara monopodial atau kadang-kadang simpodial. Miselium aerial tidak ada atau kadang-kadang tampak secara tidak beraturan berwarna putih atau keabu-abuan. Gram positif dan tidak tahan asam. Aerobik sampai mikroaerobik.
2.	<i>Rhodococcus</i>	Miselium vegetatif berbentuk batang sampai bercabang luas. Semua galur dalam siklus morfogenetiknya diawali dengan bentuk kokus atau batang pendek; organisme lain menunjukkan perubahan yang lebih atau kurang kompleks pada siklus pertumbuhannya. Bentuk kokus hanya bertunas menjadi batang pendek, membentuk benang-benang, memperlihatkan adanya percabangan dasar. Generasi selanjutnya dibentuk fragmentasi batang, filamen-filamen, dan hifa. Beberapa galur menghasilkan hifa udara yang mungkin bercabang, atau synnemata aerial yang mengandung filamen tidak bercabang yang bersatu dan berproyeksi ke atas. Koloni-koloni mungkin kasar, halus atau mukoid dan berpigmen seperti warna kulit kerbau, krem, kuning, oranye, atau merah, meskipun ada varian yang tidak berwarna. Bersifat Gram positif. Biasanya sebagian tahan asam dan acrobik.
3.	<i>Streptomyces</i>	Hifa vegetatif (diameter 0.5-2.0 μm) menghasilkan miselium bercabang luas yang kadang-kadang berfragmen. Miselium aerial pada saat matang membentuk tiga sampai banyak spora. Beberapa spesies membawa rantai-rantai pendek spora. Sklerotia, piknidial, sporangium, dan struktur seperti synnemata dibentuk oleh beberapa spesies. Spora bersifat nonmotil. Koloni-koloni berbentuk <i>discrete</i> dan likenoid, berbulu atau seperti mentega. Pada awalnya, permukaan koloni-koloni halus tetapi kemudian berkembang menjadi benang-benang miselium aerial yang mungkin tampak <i>floccosa</i> , granular, bertepung, atau seperti beludru. Menghasilkan berbagai pigmen yang bertanggung jawab untuk warna miselium vegetatif dan aerial. Warna pigmen yang berdifusi juga dibentuk. Gram positif tetapi tidak tahan alkohol-asam dan bersifat aerob.



Lampiran 2. Gambar Uji Daya Hambat Antara Actinomycetes dengan *Fusarium* sp. yang Ditumbuhkan Pada Media PDA Selama 6 Hari. *Fusarium* sp. Sebagai Kontrol (A), *Micromonospora* sp. galur T1 Diuji dengan *Fusarium* sp. (B), *Rhodococcus* sp. galur T3 Diuji dengan *Fusarium* sp. (C), *Streptomyces* sp. galur T30 Diuji dengan *Fusarium* sp. (D).



Lampiran 3. Gambar Uji Daya Hambat Antara Actinomycetes dengan *A. flavus* yang Ditumbuhkan Pada Media PDA Selama 6 Hari. *A. flavus* Sebagai Kontrol (A), *Micromonospora* sp. galur T1 Diuji dengan *A. flavus* (B), *Rhodococcus* sp. galur T3 Diuji dengan *A. flavus* (C), *Streptomyces* sp. galur T30 Diuji dengan *A. flavus* (D).



Lampiran 4. Gambar Uji Daya Hambat Antara Actinomycetes dengan *A. niger* yang Ditumbuhkan pada Media PDA Selama 6 hari. *A. niger* Sebagai Kontrol (A), *Micromonospora* sp. galur T1 Diuji dengan *A. niger* (B), *Rhodococcus* sp. galur T3 Diuji dengan *A. niger* (C), *Streptomyces* sp. galur T30 Diuji dengan *A. niger* (D).

Lampiran 5. Tabel Pengaruh Isolat-isolat Actinomycetes terhadap Luas Pertumbuhan Koloni *Fusarium* sp., *A. flavus*, dan *A. niger*

Jenis Isolat Actinomycetes	Jenis Jamur Uji	Luas Koloni (cm ²)	Rata-rata Daya Hambat (%)
<i>Micromonospora</i> sp. galur T1	<i>Fusarium</i> sp.	38,595	47,95
<i>Rhodococcus</i> sp. galur T3	<i>Fusarium</i> sp.	57,198	0
<i>Streptomyces</i> sp. galur T30	<i>Fusarium</i> sp.	47,436	20,37
<i>Micromonospora</i> sp. galur T1	<i>A. flavus</i>	31,492	39,65
<i>Rhodococcus</i> sp. galur T3	<i>A. flavus</i>	40,825	7,30
<i>Streptomyces</i> sp. galur T30	<i>A. flavus</i>	38,516	13,82
<i>Micromonospora</i> sp. galur T1	<i>A. niger</i>	25,929	121,77
<i>Rhodococcus</i> sp. galur T3	<i>A. niger</i>	60,817	0
<i>Streptomyces</i> sp. galur T30	<i>A. niger</i>	49,087	16,93

Lampiran 5. Tabel Pertumbuhan Jamur *Fusarium* sp., *A. flavus*, dan *A. niger* pada Media PDA Tanpa Isolat Actinomycetes

Jenis jamur	Luas koloni (cm ²)	Rata-rata daya hambat (%)
<i>Fusarium</i> sp.	57,103	0
<i>Aspergillus flavus</i>	43,865	0
<i>Aspergillus niger</i>	57,413	0

Lampiran 6. Komposisi Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Bahan	Konsentrasi
Kentang	200 g
Dekstrosa	10 g
Agar	15 g
Akuades	1000 ml

Cara Pembuatan

Semua bahan dilarutkan dalam akuades dan dipanaskan sampai benar-benar mendidih. Kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi @ 25 ml dan ditutup dengan kapas. Selanjutnya disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit 121°C. Media yang akan digunakan dicairkan dengan cara dipanaskan kemudian dituang dalam cawan Petri steril dan dibiarkan sampai padat.

Lampiran 7. Komposisi Pewarna Gram

Bahan	Konsentrasi
Larutan violet kristal (Gram A)	
Violet kristal (90%)	2.0 g
Etil alkohol (95%)	20.0 ml
Amonium oksalat	0.8 g
Akuades	80 ml
Larutan iodium (Gram B)	
Kristal iodium	1.0 g
Kalium iodida	2.0 g
Akuades	300 ml
Gram C	Etil alkohol 95%
Larutan safranin O (Gram D)	
2.5% larutan alkohol	10 ml
Akuades	100 ml

Lampiran 8. Komposisi Pewarna Tahan Asam

Bahan	Konsentrasi
Larutan Carbol Fuchsin (ZN-A)	
Larutan A	
Basic fuchsin (90%)	0,3 g
Etil alkohol (95%)	10.0 ml
Larutan B	
Fenol	5.0 g
Akuades	95.0 ml
Alkohol Asam (ZN-B)	
Etil alkohol (95%)	97.0 ml
Asam Hidroklorat	3.0 ml
Methylene Blue	
Methylene blue	0,3 g
Akuades	100.0 ml

Pada cat carbol fuchsin (Ziehl's), larutan A dan B dicampur. Kemudian ditambahkan Triton X sebanyak 2 tetes per 100 ml untuk penggunaan dalam metode pemanasan.