

ISOLASI, SELEKSI, DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER AKTINOMISETES PENGHASIL ANTIBIOTIK

ISOLATION, SELECTION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF ANTIBIOTIC PRODUCING ACTINOMYCETES

Tri Ratna Sulistiyanı dan Nunuk Widhyastuti

Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia,
Jalan Raya Bogor-Jakarta Km. 46, Cibinong 16911 Indonesia
e-mail: tri_ratna83@yahoo.com

ABSTRACT

Microorganisms is one of the biodiversity that is priceless. One type of microorganisms is actinomycetes. Actinomycetes is a potential source of bioactive compounds producing high commercial value in pharmaceuticals and agricultures. The results showed that 44 Actinomycetes isolates has the ability to produce secondary metabolites antibiotics. They were active against M. luteus, S. aureus, E. coli, B. subtilis, S. cerevisiae, and C. albicans. Morphological studied indicated that the A16.1 isolate belonged to the genus Streptomyces. The identification result based on 16S rDNA sequence is S. hygroscopicus subsp. azalomyceticus with 97% similarity level.

Keywords: Actinomycetes, Antibiotic, screening, identification by 16S rDNA

ABSTRAK

Mikroorganisme merupakan salah satu keanekaragaman hayati yang tidak ternilai harganya. Salah satu jenis mikroorganisme tersebut adalah aktinomisetes. Aktinomisetes merupakan sumber potensial penghasil senyawa bioaktif yang bernilai ekonomi tinggi dalam bidang farmasi dan pertanian. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 44 isolat Aktinomisetes yang diisolasi memiliki potensi menghasilkan antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae, dan Candida albicans. Hasil identifikasi berdasarkan pendekatan morfologi menunjukkan bahwa isolat tersebut termasuk dalam genus Streptomyces. Sedangkan identifikasi molekuler berdasarkan pendekatan molekuler 16S rDNA adalah S. hygroscopicus subsp. azalomyceticus dengan tingkat kesamaan 97%.

Kata kunci: Aktinomisetes, Antibiotik, penapisan, identifikasi

PENDAHULUAN

Kebutuhan senyawa antibiotik dan senyawa kemoterapi yang efektif dengan toksisitas terhadap inang rendah, dan limbah yang dihasilkan dapat didegradasi oleh lingkungan, merupakan masalah yang perlu dicermati dengan serius. Adanya resistensi terhadap antibiotik (seperti *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, dan *Streptococcus*) menyebabkan perlu dikembangkan antibiotik jenis baru dari bahan alami dan mikroorganisme yang dapat mengontrol mikroba-mikroba patogen.¹

Senyawa-senyawa yang diperoleh dari bahan alam terutama tanaman dan mikroba memberikan hasil yang menjanjikan dalam pengembangan senyawa-senyawa antibiotik baru.²

Di antara jenis mikroorganisme yang ada, aktinomisetes merupakan sumber yang paling potensial penghasil antibiotik. Selain antibiotik, aktinomisetes juga menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang sangat bernilai ekonomi tinggi dalam bidang kesehatan sebagai antivirus dan anti kanker, sedangkan dalam bidang

pertanian sebagai herbisida, insektisida, dan senyawa antiparasit.^{3,4} Hal ini menyebabkan perlu dilakukan eksplorasi aktinomisetes lokal yang berpotensi menghasilkan senyawa antibiotik.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan *screening* dan identifikasi aktinomisetes yang memiliki aktivitas antibiotik berspektrum luas dari tanah Pulau Timor bagian barat (NTT).

METODE

Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil secara acak dari sekitar perakaran tanaman yang berbeda di Pulau Timor (NTT) dengan kedalaman 15 cm dpl.

Isolasi dan Pemurnian Aktinomisetes

Tanah yang akan diisolasi dikeringkan pada suhu ruang selama 3 sampai 5 hari, ditumbuk halus dan diayak. Isolasi aktinomisetes dilakukan dengan metode SDS-YE melalui cara pengenceran, yaitu 1 g sampel tanah disuspensikan pada 10 mL akuades steril, dihomogenkan dan diendapkan. Satu mL suspensi dilarutkan dalam 9 mL SDS-YE dalam bufer fosfat 5 mM pH 7.00 kemudian diinkubasi pada 40°C selama 20 menit. Larutan kemudian diencerkan sampai 10–4 kali konsentrasi semula, diambil 0.1 mL, disebar ke permukaan medium *Humic Acid-Vitamin* (HV), dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 1 sampai 4 minggu.⁵

Koloni aktinomisetes yang tumbuh dimurnikan dengan menggunakan medium YS agar. Isolat aktinomisetes yang telah murni dipindahkan dari medium YS agar ke media YS agar miring untuk disimpan dan digunakan dalam pengujian selanjutnya.

Produksi Antibiotik

Produksi antibiotik dilakukan pada media padat. Isolat aktinomisetes dari media YS miring digoreskan pada permukaan media produksi padat dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 14 hari.^{5,6}

Pembuatan Media Uji

Mikroba uji yang digunakan adalah *M. luteus*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *C. albicans*, dan *S. cerevisiae*. Satu ose mikroba uji diinokulasikan

pada media *nutrient broth* (NB) atau Saboroud, kemudian digoyang selama 24–48 jam. Untuk bakteri *M. luteus*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* diinokulasi pada media NB. *C. Albicans* dan *S. cerevisiae* diinokulasikan pada media sabaroud cair.

Banyaknya *seed culture* yang ditambahkan yaitu *E. coli* 0.2%, *M. luteus* 0.5%, *S. aureus* 0.1%, dan *B. subtilis* 0.1% dari volume media lapisan atas.⁵ Sedangkan *seed culture* dengan volume untuk *S. cerevisiae* 0.5% dan *C. albicans* 0.5% volume media lapisan atas.⁵

Seleksi Aktinomisetes Penghasil Antibiotik

Seleksi aktinomisetes penghasil antibiotik dilakukan dengan metode teknik difusi kertas cakram. Media produksi yang telah ditanami aktinomisetes, diinkubasi selama 2 minggu. Media produksi kemudian dilubangi dengan *cork borer* berdiameter 7 mm dan diletakkan pada permukaan media uji hayati dua lapis yang sudah disiapkan. Cawan petri kemudian dimasukkan ke dalam kulkas suhu 5°C selama satu malam, diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam dan diukur zona hambat yang terbentuk.

Identifikasi Aktinomisetes Terseleksi A16.1

Aktinomisetes yang memiliki spektrum luas kemudian diidentifikasi secara molekuler dengan sekuensing 16S rDNA.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi dilakukan dengan metode Pitcher *et al.*⁶ Sel bakteri dapat ditumbuhkan di media cair YSB. Pemanenan sel dilakukan dengan sentrifuse pada kecepatan 3.000 xg selama 15–30 menit. Sel yang telah dipanen dibilas menggunakan 1 mL bufer TE dan disentrifuse 10.000 rpm, selama 15 menit.

Sel yang telah dipanen selanjutnya dipecah menggunakan 50 µL lisozim (50 µg/mL). Kocok hingga homogen dan inkubasi 37°C selama 30 menit. Untuk melarutkan protein membran dan enzim, ditambahkan pereaksi GES sebanyak 250 µL. Homogenkan hingga larut sempurna dan inkubasi selama 10 menit pada suhu ruang.

Dilanjutkan dengan penambahan 125 μL *ammonium acetate* 7.5 M dan ditempatkan dalam es selama 10 menit.

Pemisahan DNA dari protein dan polisakarida dilakukan dengan menambahkan 500 μL kloroform ke dalam larutan, dibolak-balik 50 kali, dan disentrifuse pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Setelah selesai sentrifuse akan terbentuk 3 lapisan dan DNA berada pada lapisan paling atas. DNA diambil menggunakan pipet tumpul dan ditempatkan ke ependorv yang baru. Untuk membentuk benang-benang DNA, ke dalam larutan DNA ditambahkan isopropanol setengah dari volume larutan DNA, kemudian dibolak-balik sampai terlihat benang-benang DNA. Sentrifuse pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit hingga benang-benang DNA mengendap. Selanjutnya endapan DNA dicuci dengan etanol 70% dingin. Sentrifuse kembali dan buang supernatan. DNA dikeringanginkan selama 10 menit, dilarutkan dalam 100 μL 0.2X bufer TE, dan selanjutnya konsentrasi DNA diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm.

Amplifikasi PCR 16S rDNA

Amplifikasi 16S rDNA dilakukan menggunakan GoTaq (Promega) dengan primer 20F dan 1500R, dengan komposisi 8.75 μL *ultrapure water*, 12.5 μL GoTag Green Master Mix 2X, 0.625 μL primer 20F (10 μM), 0.625 μL primer 1500F (10 μM), 0.5 μL DMSO, dan 2 μL sampel DNA dengan total volume 25 μL . Amplifikasi dilakukan dengan kondisi PCR 95°C selama 3 menit, dilanjutkan (95°C, 30 detik denaturasi; 50°C, 30 detik annealing; 72°C, 90 detik elongasi) 30 siklus dan final extension pada 72°C, 10 menit. Produk PCR kemudian dianalisis menggunakan gel agarose 1%.

Purifikasi Produk PCR

Purifikasi produk PCR dilakukan dengan *PEG precipitation method*. Produk PCR ditambah dengan 15 μL larutan PEG (40% PEG 6.000 dalam 10 mM MgCl₂) dan 6 μL 3M sodium asetat. Kocok selama 10 menit pada suhu kamar, kemudian disentrifusi pada kecepatan 16.000 rpm selama 25 menit. Endapan DNA yang terbentuk dicuci

2 kali dengan etanol 70% dan dikeringanginkan selama 10 menit. DNA dilarutkan dalam 20 μL milli-Q dan dilanjutkan dengan *cycle sequencing*.

Cycle sequencing

Produk PCR yang telah dipurifikasi dilanjutkan dengan *cycle sequencing*. Komposisi *cycle sequencing* 0.5 μL BDT Rmix, 1.75 μL 5X *Seq buffer*, 0.5 μL *Seq primer* (10 μM) dengan primer 520F (5'-GTGCCAGCAGCCGCGG-3') dan 920R (5'-GTCAATTCCTTTGAGTTT-3'), 1.0 μL produk PCR, dan 6.25 μL *ultrapure water*. *cycle sequencing* dilakukan pada kondisi 95°C selama 1 menit, dilanjutkan 40 siklus (95°C, 10 detik denaturasi; 50°C, 5 detik annealing; 60°C, 90 detik elongasi) dan dilanjutkan pada 4°C.

Hasil *cycle sequencing* dipurifikasi kembali dengan *Ethanol purification method*. Produk *cycle sequencing* ditambah 1 μL EDTA 125 mM, 1 μL natrium asetat 3 M, dan 25 μL etanol 99%. Kocok hingga homogen, inkubasi pada suhu kamar selama 15 menit dan disentrifus pada kecepatan 16.000 rpm selama 25 menit 4°C. Endapan DNA selanjutnya dicuci dengan etanol 70%, disentrifuse kembali dan endapan DNA dikeringanginkan 10 menit.

Urutan basa nitrogen dibaca menggunakan *automated DNA sequencer* (ABI PRISM 3130 *Genetic Analyzer*) (*Applied Biosystems*). Data hasil sekuensing selanjutnya diolah dengan program Bioedit, Clustalx, dan Njplot. Data yang diperoleh dicari homologinya atau dicocokkan dengan bank data DNA yang ada secara online di internet (www.ddbj.nig.ac.jp; www.ncbi.nlm.nih.gov).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Aktinomisetes

Aktinomisetes merupakan salah satu jenis bakteri tanah yang mempunyai spora yang bersifat tahan terhadap panas, kering, dan bahan-bahan kimia. Sifat-sifat yang dimiliki tersebut menyebabkan aktinomisetes diisolasi dengan metode SDS-YE karena spora aktinomisetes tahan terhadap senyawa kimia SDS.⁸ Penelitian ini menggunakan metode SDS-YE, di mana SDS digunakan untuk membunuh sel-sel bakteri tanah melalui penurunan

tegangan permukaan dinding selnya dan *yeast extract* yang kaya vitamin B, juga mengandung nitrogen organik dan senyawa-senyawa karbon berfungsi untuk memacu perkecambahan spora aktinomisetes. Dalam hal ini, perkecambahan spora jg dipacu dengan *heat shock* yaitu inkubasi pada suhu 40°C selama 20 menit.

Pada media yang miskin seperti HV, aktinomisetes tumbuh dalam waktu yang lama yaitu sekitar 1–2 minggu karena siklus hidupnya yang kompleks.⁵ Pengenalan koloni pada media agar relatif lebih mudah dan sederhana. Aktinomisetes dapat dibedakan dari bakteri lain dengan mudah jika dilihat dari bentuk koloninya. Bentuk koloni bulat dengan elevasi timbul dan cembung, tepian rata tidak beraturan serta permukaan bertepung, licin, kasar atau keriput. Keistimewaan bentuk koloni aktinomisetes adalah hifanya yang bersifat hidrofobik, tetapi miselium vegetatifnya bersifat hidrofilik sehingga seringkali berbentuk tetesan air pada permukaan miseliana.

Sebanyak 74 isolat aktinomisetes telah diperoleh dari 27 sampel tanah yang diambil dari perakaran tanaman yang berbeda. 74 isolat tersebut memiliki warna spora, miselium aerial, miselium substrat, dan warna media yang berbeda-beda. Spora warna coklat dihasilkan oleh 22 isolat, warna putih 17 isolat, warna abu-abu 8 isolat, warna hijau dan kuning masing-masing 5 isolat, warna merah tua 2 isolat, warna putih kemerahan, hitam, coklat kehitaman, putih kehitaman, dan putih kekuningan masing-masing dihasilkan 1 isolat.

Sebagian besar isolat yang diperoleh diasumsikan masuk dalam genus *Streptomyces* yaitu ditunjukkan dengan terbentuknya spora.⁷ Kemampuan aktinomisetes dalam menghasilkan biopigmen menyebabkan terjadinya perubahan warna pada media tempat tumbuhnya.

Hasil isolasi menunjukkan bahwa setiap sampel tanah menghasilkan jumlah isolat yang berbeda. Isolat terbanyak dihasilkan oleh sampel tanah yang diambil dari perakaran rumput di Desa Oeltua. Tempat yang berbeda akan menghasilkan jumlah isolat yang berbeda meskipun diambil dari jenis perakaran tanaman yang sama. Perbedaan aktinomisetes mungkin dipengaruhi oleh perbedaan spesies tanaman itu sendiri.⁷

Penapisan Aktinomisetes Penghasil Antibiotik

Hasil pengujian aktivitas antibiotik Aktinomisetes terhadap pertumbuhan mikroba ditandai dengan terbentuknya suatu zone hambat di sekitar blok agar. Terbentuknya zone hambat di sekitar blok agar menunjukkan bahwa dalam blok agar tersebut terdapat antibiotik. Sebanyak 74 isolat aktinomisetes yang diuji, hanya 44 isolat yang menghasilkan antibiotik. Tabel 1 memperlihatkan bahwa sebanyak 23 isolat menghasilkan zone hambat terhadap *M. luteus*, 11 isolat terhadap *B. subtilis*, 8 isolat terhadap *S. aureus*, 5 isolat terhadap *E. coli*, 5 isolat terhadap *S. cerevisiae*, dan 2 isolat terhadap *C. albicans*. Berdasarkan spektrum aktivitas penghambatannya, sebagian besar isolat memiliki spektrum yang sempit, yaitu menghasilkan antibiotik yang hanya menghambat beberapa jenis spesies bakteri, misal isolat A2.1, A8.3, dan A41.1. Hanya beberapa isolat yang memiliki spektrum luas, yaitu menghasilkan antibiotik yang mampu menghambat berbagai macam mikroba, misalnya A92.1. isolat ini mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* yang mewakili bakteri gram negatif, *M. luteus*, dan *S. aureus* yang mewakili bakteri gram positif, dan *S. cerevisiae* yang mewakili khamir.

Berdasarkan hipotesis bahwa perbedaan aktinomisetes mungkin dipengaruhi oleh perbedaan spesies tanaman seperti bakteri yang akan banyak tumbuh di humus. Lebih jauh lagi, tanaman-tanaman berbeda memproduksi tipe metabolit sekunder yang berbeda dan beberapa dari metabolit sekunder adalah toksik untuk mikroorganisme tanah termasuk aktinomisetes. Bagaimanapun juga, adaptasi ini menyebabkan aktinomisetes memproduksi metabolit sekunder.⁷ Hal ini terlihat pada Tabel 1 yaitu bahwa pada perakaran tanaman yang berbeda terdapat aktinomisetes yang berbeda yang kemungkinan menghasilkan metabolit sekunder yang berbeda pula, misal isolat A6.1 dengan isolat A16.1.

Davis Stout mengemukakan bahwa ketentu- an kekuatan antibiotik-antibakteri sebagai berikut: daerah hambatan 20 mm atau lebih berarti sangat kuat, daerah hambatan 10–20 mm (kuat), daerah hambatan 5–10 mm (sedang), daerah hambatan 5 atau kurang (lemah).⁹ Data pada Tabel 1, jika dikaitkan dengan kekuatan antibiotik-antibakteri

Tabel 1. Hasil Uji Penapisan Aktinomisetes Penghasil Antibiotik

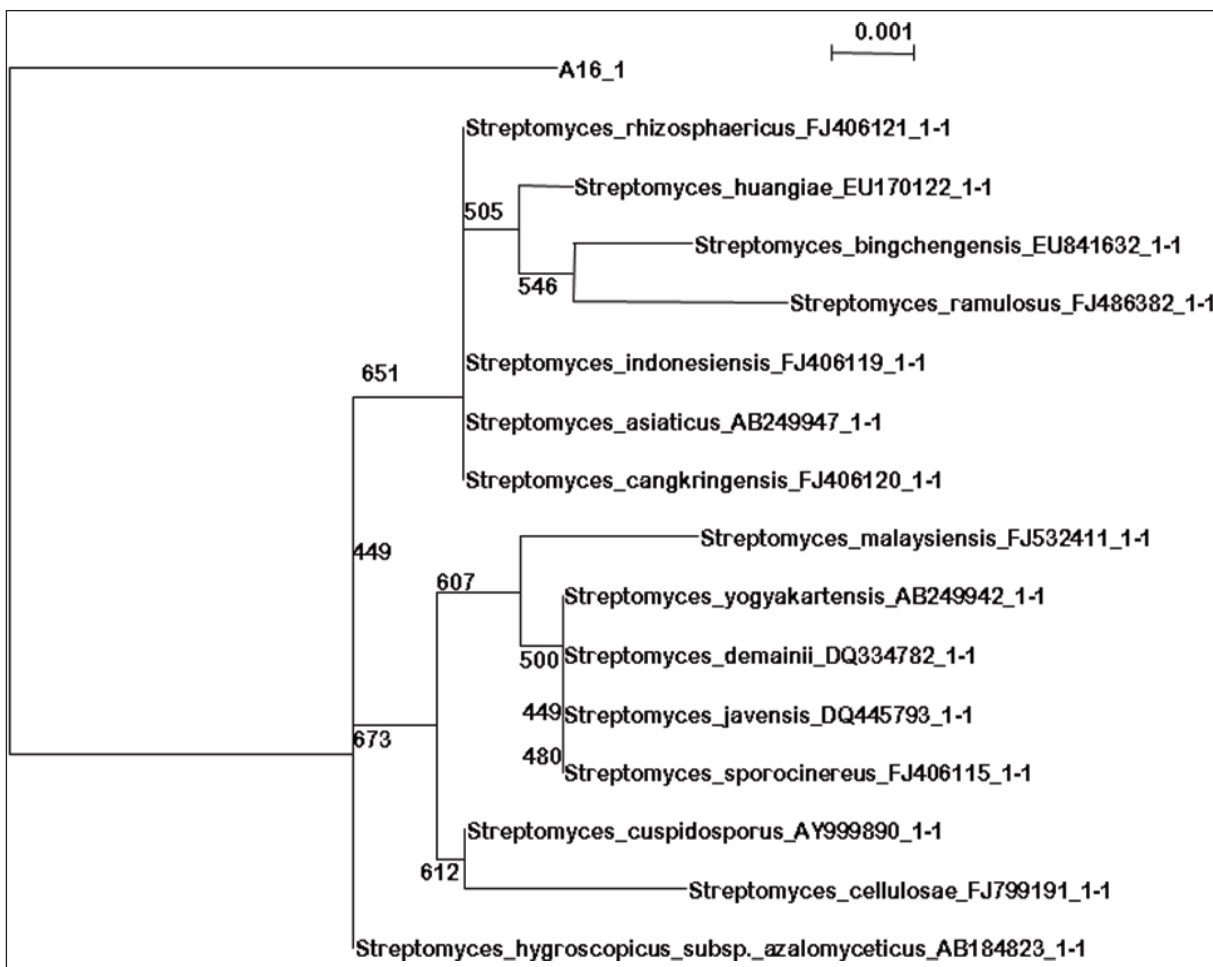
Kode isolat	Perakaran tanaman	Diameter zona hambat (mm)					
		<i>B. subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>M.luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
A2.1	Bambu, belu	10	-	12	10	-	-
A6.1	Pohon asam	-	25	32	-	-	-
A8.1	Pohon maja	11.5	-	21	8	-	-
A8.2		-	-	17	26	-	-
A8.3		-	-	8.5	-	-	-
A8.6		-	-	15	-	-	-
A8.7		-	-	17	-	-	-
A8.8		-	13	22	20	-	-
A16.1	Tumb. Polongang	-	-	30	13	16	24
A21.1	Rumput sulan	-	-	8	-	-	-
A22.1	Rumput, Embung	-	14	20	-	-	-
A23.1	Kayu ular	-	17	50	-	-	-
A24.2	Bambu, Oemasi	-	-	40	34	-	10
A24.3		-	-	8	-	-	-
A25.12	Pohon Hausisi	-	-	10	-	-	-
A26.8	Pohon Lilfui	-	-	40	25	-	-
A27.1	Rumput Ko-lakura, Oemasi	-	-	20	-	-	-
A27.2		11	-	34	-	-	-
A27.3		-	-	16	-	-	-
A27.4		-	-	20	-	-	-
A27.6		9.5	-	18	11	-	-
A28.1	Tuba, Oemasi	13	-	25	-	-	-
A32.4	Pohon Cemara	-	-	18	-	-	-
A41.1	Pohon Turi	-	-	42	-	-	-
A41.2		14	-	15	-	-	14
A41.3		16	-	24	-	-	18
A41.5		-	-	6.5	-	-	-
A44.1	Tanah Sumber Air	-	-	24	-	-	-
A48.1	Rumput, Camplong	-	-	15	-	-	-
A56.1	Kayu Putih	-	-	20	-	-	-
A56.2		-	-	18	-	-	-
A58.3	Pohon Asam, KEFA	12	-	20	-	-	-
A58.4		-	-	15	-	-	-
A58.5		8	-	11	-	-	-
A60.1	Cemara rumput, KEFA	-	-	8	-	-	-
A71.1	Lamtoro, mbung	-	-	8	-	8	20
A73.2	Rumput, Embung	-	-	14	-	-	-
A73.5		-	-	8.5	-	-	-
A73.10		-	-	11	-	-	-
A73.11		7.5	-	11	-	-	-
A81.2	Cendana	19	-	24	-	-	-
A81.3		-	-	10	-	-	-
A82.1	Tanah dekat Embung	-	-	7	-	-	-
A92.1	Bananin 4	-	18	17	14	-	8

yang dikemukakan oleh Stout, maka ada 19 isolat yang memiliki kekuatan sangat kuat yaitu isolat A6.1, A8.1, A8.2, A8.8, A16.1, A22.1, A23.1, A24.2, A26.8, A27.1, A27.2, A27.4, A28.1, A41.1, A41.3, A44.1, A56.1, A58.3, A71.1. Isolat yang mempunyai kekuatan antibiotik terbesar terhadap *B. subtilis* adalah isolat A81.2 dengan diameter zone hambat 19 mm, terhadap *E. coli* adalah isolat A6.1 dengan diameter 25 mm, terhadap *M. luteus* adalah isolat A23.1 dengan diameter 50 mm, terhadap *S. aureus* adalah isolat A24.2 dan A27.2 dengan diameter 34 mm, terhadap *C. albicans* adalah isolat A16.1 dengan diameter 16 mm, dan terhadap *S. cerevisiae* adalah isolat A16.1 dengan diameter 24 mm.

Hasil pengujian aktivitas antibiotik menunjukkan bahwa zone penghambatan oleh senyawa antibiotik lebih besar pada bakteri uji dibandingkan dengan khamir. Dapat dikatakan bahwa

senyawa antibiotik tersebut lebih efektif terhadap prokariota dibandingkan eukariota. Bakteri cenderung lebih sensitif terhadap komponen antibiotik jika dibandingkan *yeast* (fungi).

Bakteri merupakan sel prokariot dengan struktur sel yang relatif lebih sederhana sehingga memudahkan senyawa antibiotik masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja. Sedangkan *yeast* merupakan sel eukariot yang memiliki sistem membran internal yang ekstensif, yaitu retikulum endoplasma yang berfungsi sebagai penghalang di antara berbagai organel.¹⁰ *C. albicans* relatif lebih resisten terhadap antibiotik dibanding mikroba uji lainnya. Hal ini ditunjukkan dengan kecilnya zone penghambatan terhadap *C. albicans* dan hilangnya aktivitas penghambatan setelah perlakuan pemanasan terhadap senyawa antibiotik.



Gambar 1. Pohon filogenetik yang menunjukkan posisi isolat A16.1

Identifikasi Aktinomisetes Terseleksi

Hasil seleksi aktinomisetes penghasil antibiotik menunjukkan bahwa isolat A16.1 merupakan salah satu isolat yang mampu menghasilkan senyawa antibiotik berspektrum luas, yaitu mampu menghambat kelompok bakteri dan yeast (*M. luteus*, *S. aureus*, *C. albicans*, dan *S. cerevisiae*) (Tabel 1). Untuk melengkapi informasi mengenai isolat A16.1, maka dilakukan identifikasi berdasarkan pendekatan morfologi dan molekuler. Hasil identifikasi berdasarkan pendekatan morfologi menunjukkan bahwa isolat tersebut termasuk dalam genus *Streptomyces*. Sedangkan identifikasi molekuler yang digunakan adalah berdasarkan pendekatan molekuler 16S rDNA.

Alignment dari sekuens nukleotida isolat A16.1 melalui penyamaan dengan data bank di *website* NCBI dan dibandingkan dengan sekuens referens yang ada dalam *database* menunjukkan tingkat kesamaan 97% dengan *S. hygrosopicus subsp. azalomyceticus*. Hal ini terlihat jelas dari hasil analisis pohon filogenetik, bahwa isolat A16.1 memiliki hubungan yang erat dengan *S. hygrosopicus subsp. azalomyceticus* (Gambar 1).

KESIMPULAN

Sebanyak 44 isolat aktinomisetes berpotensi sebagai penghasil antibiotik. Sembilan isolat menunjukkan aktivitas daya hambat terhadap *B. subtilis* dan *M. luteus*. 2 isolat menunjukkan aktivitas daya hambat terhadap *S. aureus* dan *C. albicans*. Lima isolat menunjukkan aktivitas daya hambat terhadap *E. coli*, dan 1 isolat mampu menghambat pertumbuhan *E. coli*, *M. luteus*, *S. aureus*, dan *S. cervisiae*. Isolat A16.1 teridentifikasi secara molekuler memiliki tingkat kesamaan 97% dengan *S. hygrosopicus subsp. azalomyceticus*.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Oskay, M. Tamer, U. Azeri, C. 2004. "Antibacterial Activity of Some Actinomycetes Isolate From Farming Soils of Turkey". *African Journal of Biotechnology*, 3(9): 441–446.
- ²Arunachalam, C. and Gayathri, P. 2010. "Studies on Bioprospecting of Endophytic Bacteria From The Medicinal Plant of *Andrographis Paniculata* for Their Antimicrobial Activity and Antibiotic Susceptibility Pattern". *Int. Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2: 63–68.
- ³Pandey, B. Ghimire, P. Agrawal, V.P. "Studies on The Antibacterial of The Actinomycetes Isolated From The Khumbu Region of Nepal". (<http://www.aehms.org/pdf/panday%20F.pdf>, diakses 25 Februari 2005).
- ⁴Rabah, F. L. *et al.*, 2007. "Screening, Isolation, And Characterization of Novel Antimicrobial Producing Actinomycete, Strain RAf10". *Biotechnology*, 6(4): 489–496.
- ⁵Miyado. 2003. "Prosedur Karakterisasi dan Identifikasi Aktinomisetes". Puspita L; penerjemah. *Makalah dalam Training Course on Identification of Bacteria*. Bogor: 1–5 April 2003.
- ⁶Pitcher, D.G. Saunders, A. and Owen, R.J. 1989. "Rapid Extraction of Bacterial Genomic DNA with Guanidium Thiocyanate". *J. Applied Microbiology*, 8: 151–156.
- ⁷Hayakawa, M. 2003. *Selective Isolation of Rare Actinomycete Genera Using Pretreatment Techniques*. Ipek Kurtboke (Ed.). Faculty of Science 55–81. Queensland: University of The Sunshine Coast,
- ⁸Lo, C.W. Lai, N.S. Cheah, H.Y. Wong, N.K.I. and Ho, C.C. 2002. "Actinomycetes Isolated from Soil Samples from the Crocker Range Sabah". *Makalah dalam ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)*. JulySeptember 2002.
- ⁹Hasim. 2003. "Menanam Rumput- Memanen Antibiotik". *Kompas*, 3 Nov: 11.
- ¹⁰Pelczar, M.J. and Chain, E.C.S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Volume ke-1,2. Hadioetomo Rs, Imas T, Tjitrosomo SS, Angka SL, penerjemah. Jakarta: UI-Press. Terjemahan dari: *Elements of Microbiology*.

