



## Aktivitas Antibakteri Metabolit Sekunder Aktinomisetes terhadap Bakteri Patogen Gram-Negatif (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, dan *Shigella flexneri*)

Tamina Melindah<sup>1\*</sup>, Rhodesia Mustika Roza<sup>2</sup>, Ega Delva<sup>3</sup>, Ni Ny Wedarthani Achintya A<sup>4</sup>, Nurul Azizah<sup>4</sup>, Diah Paramita<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Bidang Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Negeri Makassar, Indonesia

<sup>2</sup>Bidang Mikrobiologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau, Indonesia

<sup>3</sup>Bidang Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Negeri Makassar, Indonesia

<sup>4</sup>Bidang Kesehatan Masyarakat, Fakultas Kedokteran Universitas Negeri Makassar, Indonesia

<sup>5</sup>Bidang Fisiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Negeri Makassar, Indonesia

\*Penulis Korespondensi: [tamina.melindah@unm.ac.id](mailto:tamina.melindah@unm.ac.id)

**Abstract.** Infections caused by pathogenic bacteria remain a significant public health concern and may lead to various diseases, including diarrhea. Several bacterial species commonly associated with diarrheal diseases are *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Shigella flexneri*. The excessive and continuous use of antibiotics has contributed to the emergence of bacterial resistance, highlighting the need to discover new antimicrobial sources. Actinomycetes are microorganisms known for their ability to produce a wide range of secondary metabolites with antibacterial properties. This study aimed to evaluate the antibacterial activity of secondary metabolites produced by actinomycetes isolated from soil samples collected from the Arboretum of the University of Riau against pathogenic bacteria that cause diarrhea. The actinomycete isolates used in this study were B1.06, B3.13, C2.18, A2.01, and C2.20. Secondary metabolites were extracted using ethyl acetate as the solvent and tested for antibacterial activity using the disc diffusion method. Antibacterial activity was assessed based on the diameter of the inhibition zones formed around the discs. The results demonstrated that all actinomycete isolates were capable of inhibiting the growth of diarrhea-causing pathogenic bacteria, although with varying levels of effectiveness. The inhibition zone diameters were compared with tetracycline susceptibility criteria to determine bacterial sensitivity levels. The antibacterial activity of the actinomycete secondary metabolites was categorized as resistant, intermediate, or sensitive against the tested bacteria.

**Keywords:** Actinomycetes; Antibacterial Activity; Diarrhea; Pathogenic Bacteria; Secondary Metabolites.

**Abstrak.** Infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen masih menjadi salah satu masalah kesehatan masyarakat yang dapat memicu berbagai penyakit, termasuk diare. Beberapa bakteri yang sering menjadi penyebab diare adalah *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, dan *Shigella flexneri*. Penggunaan antibiotik secara terus-menerus dapat menyebabkan resistensi bakteri, sehingga diperlukan pencarian sumber antibiotik baru. Aktinomisetes dikenal sebagai mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan berbagai senyawa metabolit sekunder yang bersifat antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri metabolit sekunder aktinomisetes yang diisolasi dari tanah Arboretum Universitas Riau terhadap bakteri patogen penyebab diare. Isolat aktinomisetes yang digunakan yaitu B1.06, B3.13, C2.18, A2.01, dan C2.20. Metabolit sekunder diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat, kemudian diuji aktivitas antibakterinya dengan metode *disc diffusion*. Aktivitas antibakteri ditentukan berdasarkan diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram. Hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh isolat aktinomisetes memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri patogen penyebab diare dengan tingkat aktivitas yang berbeda-beda. Diameter zona hambat yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan kriteria antibiotik tetrasiklin untuk menentukan tingkat sensitivitas bakteri. Berdasarkan hasil tersebut, aktivitas antibakteri metabolit sekunder aktinomisetes dikategorikan ke dalam kelompok resisten, intermediet, dan sensitif terhadap bakteri uji.

**Kata kunci:** Aktinomisetes; Aktivitas Antibakteri; Bakteri Patogen; Diare; Metabolit Sekunder.

### 1. LATAR BELAKANG

Penyakit infeksi bakteri tetap menjadi salah satu tantangan global terbesar dalam dunia kesehatan masyarakat dengan beban morbiditas dan mortalitas yang terus meningkat setiap tahunnya. Penggunaan senyawa antibiotik merupakan modalitas utama dalam mengeradikasi

infeksi, namun intensitas persebaran yang tidak rasional serta penyalahgunaan antimikroba yang masif dalam beberapa dekade terakhir telah memicu konsekuensi klinis yang fatal berupa eskalasi fenomena resistensi bakteri patogen terhadap multi-obat (*Multi-Drug Resistance*) (World Health Organization [WHO], 2021; Murray et al., 2022). Infeksi oleh bakteri patogen enterik merupakan etiologi utama dari tingginya kasus gastroenteritis dan diare akut pada manusia. Strain bakteri seperti *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, dan *Shigella flexneri* diidentifikasi sebagai patogen kunci yang mendominasi manifestasi klinis saluran pencernaan ini. Meskipun infeksi enterik ini secara konvensional dapat diatasi dengan lini pertama antimikroba, laporan klinis terbaru menunjukkan adanya lonjakan resistensi yang signifikan pada ketiga isolat tersebut terhadap berbagai sediaan antibiotik standar seperti amoksisilin, kolistin, streptomisin, eritromisin, asam nalidiksat, tetrasiklin, dan kloramfenikol (Tacconelli et al., 2018; CDC, 2021). Krisis resistensi ini mendesak para peneliti untuk secara masif mengeksplorasi kandidat antibiotik baru yang bersumber dari bahan alami guna memutus rantai penyebaran strain resisten tersebut.

Ketiga bakteri model tersebut dipilih karena ketiganya merepresentasikan famili Enterobacteriaceae dengan arsitektur dinding sel Gram-negatif yang kompleks. Membran luar dari ketiga patogen ini dilapisi oleh molekul lipopolisakarida yang rapat dan bersifat selektif terhadap penetrasi zat asing (Raza et al., 2021). Meskipun berada dalam rumpun gram-negatif yang sama, perbedaan mikro-struktural pada susunan protein porin dan ketebalan ruang periplasmik antara *E. coli*, *S. typhimurium*, dan *S. flexneri* berpotensi menghasilkan tingkat sensitivitas yang bervariasi terhadap paparan sediaan antimikroba, sehingga pengujian komparatif ini krusial untuk memetakan spektrum aktivitas inhibisi secara spesifik pada variasi strain enterik target. Sebagai langkah solutif, eksplorasi diarahkan pada Aktinomisetes yang merupakan kelompok bakteri Gram-positif filamentosus dengan karakteristik genetik berupa kandungan guanin-sitosin yang tinggi (*High Guanine-Cytosine*) (Putri & Arif, 2016). Kelompok mikroorganisme ini diakui secara luas sebagai produsen antibiotik alami paling produktif di biosfer, di mana lebih dari dua pertiga sediaan bioaktif komersial yang digunakan saat ini berhasil diisolasi dari ordo Actinomycetales (Barka et al., 2016). Berbeda dengan kinetika pertumbuhan eubakteria pada umumnya yang mampu berproliferasi dalam waktu 24 jam, Aktinomisetes memiliki fase lag yang lebih panjang dan pola pertumbuhan miselium yang membutuhkan waktu kultivasi berkisar antara 5 hingga 7 hari untuk mencapai fase stasioner dan menyintesis metabolit sekunder (Genilloud, 2019).

Metabolit sekunder dari Aktinomisetes merupakan basis molekular utama yang dieksplorasi sebagai agen antibiotik baru, di mana efektivitas isolasinya sangat analisis bergantung pada pemilihan polaritas pelarut organik yang digunakan selama proses partisi cair-cair. Penelitian terdahulu oleh Ervina (2019) telah mengevaluasi aktivitas antibakteri dari isolat lokal Aktinomisetes asal Arboretum Universitas Riau (kode isolat: A2.01, B1.06, B3.13, C2.18, dan C2.20) menggunakan metode ekstraksi pelarut polar metanol 75%. Hasil studi tersebut mengonfirmasi adanya pembentukan zona hambat yang bervariasi terhadap *S. typhimurium*, *S. flexneri*, dan *E. coli*. Kendati demikian, potensi bioaktivitas metabolit sekunder dari isolat-isolat tersebut yang difraksinasi menggunakan pelarut semipolar seperti etil asetat hingga saat ini belum diketahui. Pelarut etil asetat memiliki sifat semipolar dengan indeks polaritas sebesar 4,4, menjadikannya sangat ideal untuk menarik senyawa aktif golongan *intermediate* (berat molekul sedang) seperti flavonoid, alkaloid, dan komponen poliketida dari matriks seluler Aktinomisetes (Abubakar & Haque, 2020). Dibandingkan dengan pelarut polar seperti metanol yang cenderung ikut menarik komponen non-aktif seperti gula dan protein terlarut, etil asetat bekerja lebih selektif dalam mengonsentrasikan senyawa-senyawa hidrofobik eksternal. Karakteristik kimiawi ini diprediksi memberikan keunggulan mekanistik bagi ekstrak dalam berinteraksi serta mengganggu stabilitas lipid bilayer pada membran luar bakteri Gram-negatif.

Keterbaruan dan urgensi dari penelitian ini terletak pada optimalisasi penggunaan pelarut etil asetat untuk mengeksplorasi fraksi semipolar dari isolat lokal Aktinomisetes Arboretum Universitas Riau yang belum pernah dilaporkan sebelumnya pada pelarut tersebut. Ketika penelitian terdahulu terbatas pada efek ko-ekstraksi komponen matriks akibat pelarut polar, penelitian ini berfokus pada isolasi fraksi metabolit yang lebih spesifik. Penapisan bioaktivitas ekstrak etil asetat ini dilakukan untuk mengkuantifikasi dan menganalisis kapasitas daya hambat metabolit sekunder Aktinomisetes dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen penyebab diare. Melalui pendekatan tersebut, penelitian ini secara spesifik bertujuan untuk menguji dan mengevaluasi aktivitas antibakteri secara *in vitro* dari ekstrak etil asetat metabolit sekunder Aktinomisetes (isolat A2.01, B1.06, B3.13, C2.18, dan C2.20) terhadap bakteri patogen enterik penyebab penyakit diare yaitu *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, dan *Shigella flexneri*.

## 2. KAJIAN TEORITIS

Penyakit infeksi yang menyerang saluran pencernaan dan jaringan kulit merupakan salah satu masalah kesehatan global utama yang dipicu oleh kolonisasi bakteri patogen (Murray et al., 2022). Bakteri enterik penyebab diare seperti *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, dan *Salmonella typhimurium* merupakan kelompok bakteri Gram-negatif yang secara struktural memiliki membran luar asimetris yang kaya akan lipopolisakarida dan protein porin (Gomes et al., 2016). Karakteristik makromolekul barrier ini secara teoritis membatasi penetrasi sediaan senyawa antimikroba hidrofobik, sehingga kelompok bakteri enterik ini memiliki tingkat resistensi alami yang lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri Gram-positif (Murray et al., 2022). Aktinomisetes, terutama dari genus *Streptomyces*, diakui secara teoritis sebagai produsen alami paling superior dalam menyintesis senyawa metabolit sekunder aktif (Genilloud, 2019). Senyawa-senyawa bioaktif ini diproduksi selama fase stasioner (*idiofase*) sebagai respons adaptif akibat adanya cekaman lingkungan atau keterbatasan nutrisi pada medium pertumbuhan (Genilloud, 2019). Aktivitas antimikroba dari metabolit Aktinomisetes umumnya bekerja melalui jalur inhibisi sintesis dinding sel, disrupti permeabilitas membran, atau interferensi replikasi asam nukleat bakteri target (Barka et al., 2016). Karakteristik sitotoksik ini serupa dengan mekanisme aksi antibiotik berspektrum luas golongan tetrasiklin yang bekerja secara spesifik menginterferensi jalur translasi bakteri dengan berikatan secara reversibel pada subunit ribosom 30S, sehingga mencegah penempelan aminoasil-tRNA dan menghentikan perpanjangan rantai peptida esensial (Arenz & Wilson, 2016). Berdasarkan standarisasi terbaru dari *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2024), tingkat sensitivitas bakteri terhadap sediaan antimikroba seperti tetrasiklin diukur berdasarkan diameter zona hambat yang terbentuk secara *in vitro*, dengan kategori interpretatif meliputi sensitif (19 mm), intermediet (15-18 mm), dan resisten (14 mm). Efektivitas pengujian zona hambat ini secara eksperimental sangat dipengaruhi oleh parameter lingkungan laboratorium seperti pH media, komposisi nutrisi medium, densitas takaran inokulum, dan stabilitas termal sediaan obat (CLSI, 2024).

Proses isolasi untuk memaksimalkan yield dan bioaktivitas sediaan antibiotik mentah dari cairan kultur Aktinomisetes sangat bergantung pada hukum kelarutan *like dissolves like* melalui metode ekstraksi cair-cair (Abubakar & Haque, 2020). Penggunaan pelarut organik semipolar etil asetat dengan indeks polaritas intermediate sebesar 4,4 terbukti secara kimiawi sangat efisien untuk memisahkan senyawa organik dengan berat molekul sedang dari fase akuatik (Abubakar & Haque, 2020). Karakteristik selektivitas etil asetat memungkinkannya menarik senyawa aktif semi-hidrofobik tanpa mengikutsertakan komponen matriks seluler

non-aktif yang bersifat sangat polar seperti karbohidrat kompleks atau protein terlarut (Abubakar & Haque, 2020). Hal ini didukung oleh temuan empiris terdahulu oleh Sulistyani dan Achmad (2014) yang menunjukkan bahwa ekstraksi metabolit sekunder Aktinomisetes menggunakan pelarut semipolar etil asetat secara konsisten menghasilkan rendemen zona hambat yang jauh lebih besar dan kuat terhadap bakteri uji seperti *E. coli* dan *S. aureus* dibandingkan penggunaan pelarut non-polar seperti n-heksana atau kloroform.

Penyusunan kerangka konseptual pada penelitian ini didasarkan pada premis teoretis bahwa perubahan tingkat polaritas pelarut ekstraksi akan mengubah profil dan konsentrasi metabolit sekunder yang terisolasi dari kelima isolat Aktinomisetes Arboretum Universitas Riau tersebut (Ervina, 2019). Melalui optimalisasi parameter ekstraksi menggunakan pelarut semipolar etil asetat, diharapkan rendemen senyawa aktif golongan intermediate yang memiliki kemampuan spesifik dalam melarutkan komponen membran sel bakteri dapat terkonsentrasi secara optimum (Abubakar & Haque, 2020; Sulistyani & Achmad, 2014). Dengan demikian, pengujian ini diarahkan pada pembuktian konseptual bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak etil asetat dari metabolit sekunder isolat Aktinomisetes A2.01, B1.06, B3.13, C2.18, dan C2.20 secara linier akan menghasilkan diameter zona hambat yang signifikan, kuat, dan efektif dalam mengeradikasi aktivitas proliferasi seluler bakteri patogen *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, secara *in vitro* (Arenz & Wilson, 2016; CLSI, 2024; Ervina, 2019).

### **3. METODE PENELITIAN**

#### **Waktu dan Tempat Penelitian**

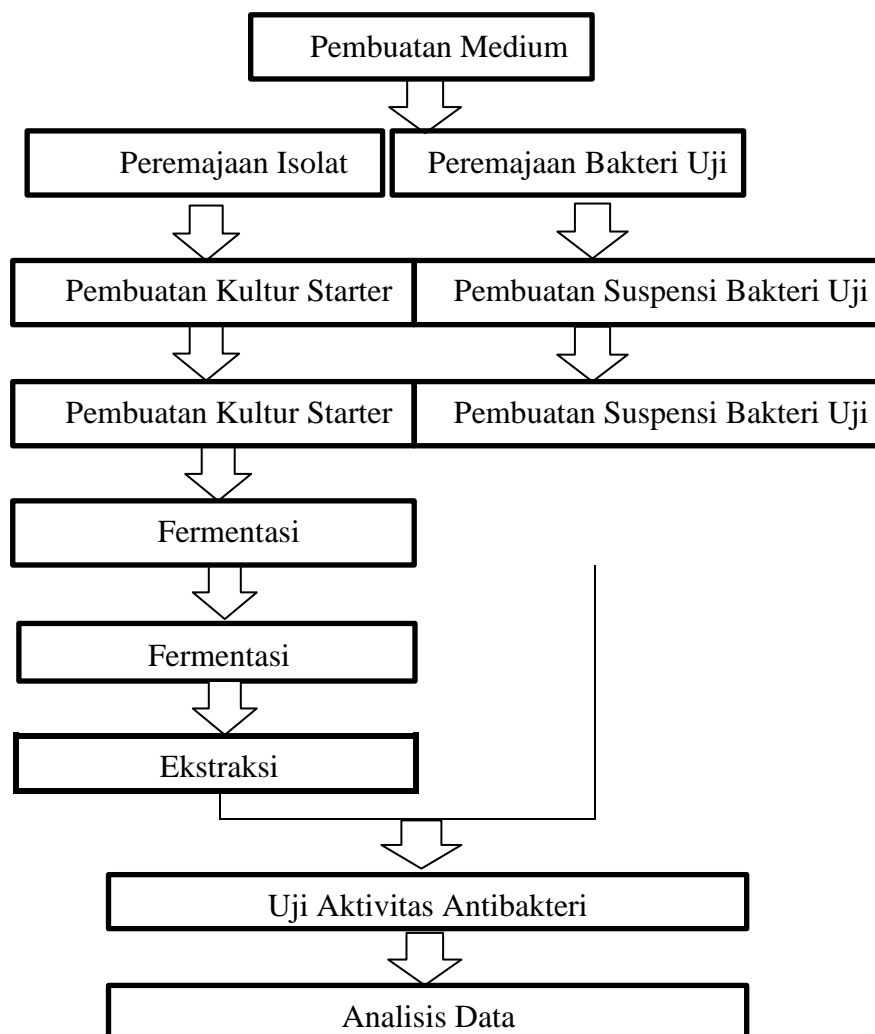
Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Laboratorium Teknologi Bahan Alam dan Mineral, Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik, Universitas Riau, Pekanbaru.

#### **Alat Dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : autoklaf, shaker inkubator, evaporator, refrigerator, Laminar air flow, oven sterilisasi, microwave, waterbath, timbangan analitik, hotplate, vortex, jangka sorong, mikropipet, bunsen, gelas beker, labu erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, batang pengaduk, pH meter, pipet tetes, pipet volume, jarum ose, gelas ukur, spatula, sprayer, corong pemisah, tabung Eppendorf, blank disc, colony counter, aluminium foil, pemantik api, pinset, log book, kertas label, alat tulis, dan alat dokumentasi.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : lima isolat aktinomisetes yang diisolasi dari tanah di Arboretum Universitas Riau yaitu isolat B1.06, B3.13, C2.18, A2.01, C2.20, bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 11775, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Shigella flexineri* ATCC 12022, *Nutrient Agar* (NA), akuades, alkohol 70 %, spiritus, tetrasiklin, etil asetat, kasein, pati,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ , *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Mueller Hinton Broth* (MHB),  $\text{HCl}$ , dan  $\text{NaOH}$ .

### Desain Penelitian



Gambar 1. Desain Penelitian

## **Prosedur Kerja**

### ***Pembuatan Medium***

- a. *Medium Starch Casein Agar (SCA)* dan *Medium Starch Casein Borth (SCB)*  
*Medium Starch Casein Agar (SCA)*, dibuat dengan mencampurkan 18 g *agar bacto*, 10 g pati, 0,3 g kasein, 2 g KNO<sub>3</sub>, 2 g NaCl, 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,02 g CaCO<sub>3</sub>, 0,01 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O dalam 1000 ml akuades. Medium diatur pada pH 7. Medium kemudian dipanaskan diatas *hotplate* dan diaduk hingga homogen. Medium disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 15 menit. *Medium Starch Casein Borth (SCB)* dibuat dengan cara yang sama tanpa menggunakan agar (Pudi *et al.* 2016).
- b. *Medium Nutrien Agar (NA)*  
*Medium larutan Nutrien Agar (NA)*, dibuat dengan mencampurkan 23 g bubuk NA ke dalam 1000 ml akuades dan disterilisasi (Zimbro dan Power 2003).
- c. *Medium Mueller Hinton Agar (MHA)* dan *Mueller Hinton Borth (MHB)*  
*Medium Mueller Hinton Agar (MHA)*, dibuat dengan mencampurkan bubuk MHA sebanyak 38 g dan aquades 1000 ml dan *Medium Mueller Hinton Borth (MHB)* dibuat dengan mencampurkan MHB sebanyak 21 g ke dalam aquades 1000 ml, Selanjutnya media diaduk dan dipanaskan menggunakan *hotplate* dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 15 menit (Zimbro dan Power 2003).
- d. Peremajaan Isolat Aktinomisetes dan Bakteri Uji  
Isolat aktinomisetes A2.01, B1.06, B2.13, C2.20, C2.18 diremajakan pada medium SCA secara *streak plate*, dan diinkubasi selama 7 hari (Mubarak *et al.* 2017). Bakteri uji diremajakan pada medium NA kemudian diinkubasi selama 24 jam (Litaay *et al.* 2017).
- e. Pembuatan Kultur Starter Aktinomisetes  
Pembuatan kultur starter dilakukan dengan cara memasukkan sebanyak dua plug koloni aktinomisetes diinokulasi pada 50 ml media SCB kemudian diinkubasi pada shaker inkubator 150 rpm selama 6 hari pada suhu kamar (Sulistiyani dan Achmad 2014).

### **Produksi Senyawa Metabolit Aktinomisetes**

Produksi senyawa metabolit aktinomisetes dilakukan dengan cara Sebanyak 20 ml kultur starter aktinomisetes diinokulasi ke dalam 200 ml SCB dan diinkubasi pada shaker dengan kecepatan 150 rpm dengan suhu kamar, selama 7 hari. Kemudian kultur dipindah ke tabung *ependroff* dan disentrifus 3000 rpm 15 menit. Supernatan merupakan sumber metabolit sekunder (Mulyadi dan nanik (2013) ; Rahayu *et al.* (2016)).

## Ekstraksi Senyawa Antibakteri Aktinomisetes

Ekstraksi senyawa antibakteri aktinomisetes dilakukan dengan cara mencampurkan supernatan dengan etil asetat 75% dengan perbandingan 1 : 1 (v/v). Campuran tersebut kemudian dikocok menggunakan shaker selama 1 jam pada kecepatan 150 rpm, kemudian terbentuk dua lapisan fraksi cair dan fraksi etil asetat. fraksi etil asetat dievaporasi dengan menggunakan evaporator pada suhu 40°C (50 rpm) selama 1 jam. Ekstrak yang diperoleh diuji aktivitas antibakteri (Baskaran *et al.* (2015) ; Wahyuni (2014)).

## Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode *disc diffusion*. Sebanyak 1 ml suspensi bakteri uji dimasukkan ke dalam cawan petri dan medium MHA dituangkan ke cawan petri tersebut. Kemudian *blank disc* yang telah ditetesi 20 µl ekstrak aktinomisetes diletakkan ke dalam cawan petri yang sudah berisi bakteri target. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengerjaan yang sama dilakukan untuk kontrol positif menggunakan tetrasiklin dan kontrol negatif menggunakan etil asetat sebanyak 20 µl. Pengamatan dilakukan dengan mengukur zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong. (Purwantini dan Wahyuono (2004) ; Prakash *et al.* (2013)).

## Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif berdasarkan pengamatan zona hambat yang terbentuk dari uji aktivitas antibakteri. Isolat yang telah diujikan dikelompokkan kedalam beberapa kriteria dan dibandingkan dengan tetrasiklin sebagai kontrol positif dengan kriteria sesuai *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2012), yaitu bila daerah hambat  $\geq 19$  mm dikatakan sensitif, daerah hambat  $\leq 14$  mm dikatakan resisten, sedangkan antara 15 mm – 18 mm dikatakan intermediet.

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### Peremajaan Isolat Aktinomisetes

Empat isolat aktinomisetes (A2.01, B1.06, C2.18, dan C2.20) diremajakan selama 7 hari dan diamati secara morfologi. Isolat A2.01 dan C2.20 menunjukkan koloni berbentuk sirkular dengan warna putih, tepi entire, dan elevasi datar hingga convex. Isolat B1.06 memiliki bentuk koloni tidak beraturan dengan elevasi crateriform, sedangkan isolat C2.18 berbentuk filamen dengan warna putih krem pada bagian atas dan kuning pada bagian bawah, serta tepi serate. Secara umum, karakteristik morfologi isolat yang diperoleh sesuai dengan penelitian Rahayu *et al.* (2016) serta Sulistyani dan Akbar (2014) .

## Produksi dan Ekstraksi Metabolit Sekunder Aktinomisetes

Penelitian ini menggunakan medium SCB untuk pembuatan kultur starter aktinomisetes karena mengandung karbon dan mineral yang mendukung pertumbuhan. Ekstraksi metabolit sekunder dilakukan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar yang mampu melarutkan senyawa polar dan nonpolar. Sebelumnya, isolat aktinomisetes dari Arboretum Universitas Riau telah diekstraksi menggunakan metanol oleh Ervina (2019). Syarifuddin et al. (2022) menjelaskan terkait senyawa antibiotik diproduksi saat bakteri berada di fase awal stasioner, pada penelitian mereka fase log tercapai hari ke-5 dan fase stasioner dimulai hari ke-9. Perbandingan hasil ekstraksi dengan pelarut yang berbeda disajikan pada Tabel 4.1.

**Tabel 1.** Perbandingan Hasil Ekstraksi Metabolit Sekunder Aktinomisetes Oleh Pelarut yang berbeda, Antara Pelarut Etil Asetat dan Metanol

Kode Isolat	Medium Fermentasi	
	Setelah Diekstraksi Etil Asetat	Setelah Diekstaksi Metanol*
A2.01	Bening	Kuning
B1.06	Kuning Pucat	Coklat
B3.13	Putih Kekuningan	Coklat
C2.18	Kuning Cerah	Coklat Tua
C2.20	Bening	Coklat

**Keterangan :** (\*) penelitian yang telah dilakukan oleh Ervina (2019).

### Uji Aktivitas Antibakteri Metabolit Sekunder Aktinomisetes

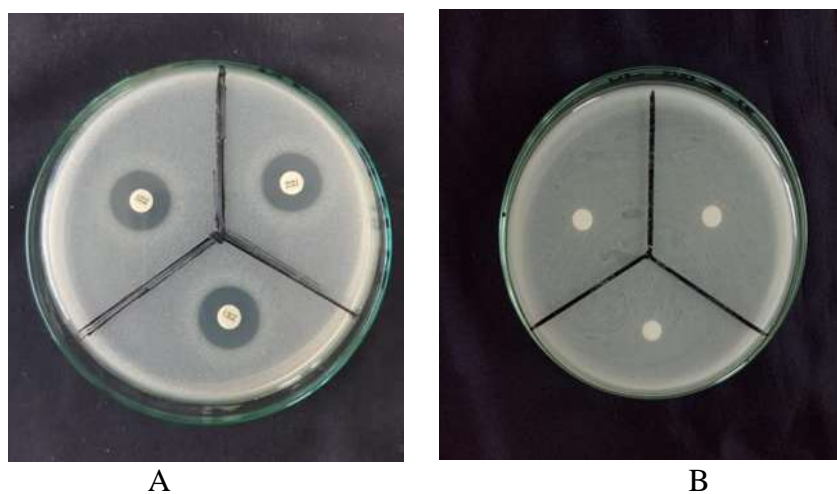
Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap lima isolat aktinomisetes (A2.01, B1.06, B3.13, C2.18, dan C2.20) menggunakan metode *disc diffusion*. Evaluasi aktivitas antibakteri secara *in vitro* menggunakan metode *disc diffusion* (Kirby-Bauer) merupakan pendekatan standar yang direkomendasikan untuk menentukan sensitivitas bakteri terhadap agen antimikroba. Penggunaan standar Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) sebagai acuan interpretasi diameter zona hambat memastikan konsistensi dan komparabilitas hasil antar laboratorium (CLSI, 2023). Besarnya zona hambat dipengaruhi oleh jumlah senyawa antibakteri yang dihasilkan Susilowati et al.. Zona hambat yang terbentuk dapat bersifat keruh (bakteriostatik) atau jernih (bakterisidal), tergantung pada mekanisme kerja senyawa antibakteri dalam menghambat atau membunuh sel bakteri Akhdiya dan Susilowati; Stringer. Penelitian oleh Syarifuddin et al. (2022), bahwa kemampuan isolat dalam menghambat bakteri Gram positif dan negatif dapat menunjukkan bahwa metabolit tersebut memiliki aktivitas antibakteri spektrum luas. Ekstrak isolat ditetaskan pada blank disc dan diuji terhadap bakteri

patogen penyebab diare, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, dan *Shigella flexineri*. Hasil rerata diameter zona hambat ekstrak metabolit sekunder *Actinomycetes* terhadap bakteri patogen penyebab diare ditunjukkan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Diameter Zona Hambat Ekstrak Metabolit Sekunder Aktinomisetes Terhadap Bakteri Patogen Penyebab Penyakit Diare dan Kulit

Isolat Aktinomisetes	Diameter Zona Hambat (mm) Bakteri Patogen Penyebab Penyakit Diare		
	Gram (-)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Shigella flexineri</i>
A2.O1	12,2±0,5	12,6±0,8	12,5±0,6
B1.06	15,5±0,9	15,7±0,8	20,6±0,8
B3.13	9,3±1,0	8,2±0,6	8,9±0,5
C2.18	10,5±0,1	10,4±1,7	9,2±1,1
C2.20	8,5±0,3	8,3±0,8	9,4±0,8
Tetrasiklin	19,5±0,6	17,1±0,5	18,6±0,7
Etil Asetat	-	-	-

Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode disc diffusion menunjukkan bahwa kelima isolat *Actinomycetes* mampu menghambat bakteri uji dengan kemampuan daya hambat yang berbeda. Aktivitas antibakteri tertinggi ditunjukkan oleh isolat B1.06 terhadap seluruh bakteri uji dengan diameter zona hambat pada rentang 15,5 - 20,6 mm. Diameter zona hambat terkecil teramati pada isolat B3.13 terhadap *S. thypimurium* sebesar 8,2 mm. Perbedaan diameter zona hambat antar isolat diduga dipengaruhi oleh variasi kemampuan produksi metabolit sekunder, metode, dan media yang digunakan. Sebagai perbandingan penelitian Sulistyani dan Akbar (2014) bahwa isolat dari sumber yang berbeda (sumber laut) dapat menghasilkan kategori yang kuat dengan diameter zona hambat mencapai 34mm terhadap *S.aureus*.



**Gambar 2.** Diameter zona hambat yang terbentuk oleh tetrasiklin dan etil asetat terhadap *Escherichia coli*. (A) merupakan diameter zona hambat yang terbentuk oleh tetrasiklin, (B) merupakan diameter zona hambat yang terbentuk oleh etil asetat.

Gambar 2. menunjukkan bahwa kontrol positif (tetrasiklin) menunjukkan adanya zona hambat, sedangkan kontrol negatif (etil asetat) tidak menunjukkan aktivitas antibakteri

Tetrasiklin merupakan antibiotik yang menghambat sintesis protein dengan berikatan pada subunit 30S ribosom sehingga mengganggu ikatan aminoasil-tRNA dan pembentukan peptida. Antibiotik ini efektif terhadap bakteri Gram-positif dan Gram-negatif, serta berasal dari genus *Streptomyces*. Sementara itu, pemilihan etil asetat sebagai kontrol negatif bertujuan untuk memastikan bahwa aktivitas antibakteri metabolit sekunder tidak dipengaruhi oleh pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi. Etil asetat tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap seluruh bakteri uji ditandai dengan tidak terbentuknya zona hambat yang menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri yang terbentuk pada isolat adalah murni dari kandungan metabolit sekunder. Pada penelitian ini, tetrasiklin menunjukkan daya hambat terhadap *Escherichia coli* dengan diameter zona hambat sebesar 19,5 mm, yang tergolong sensitif berdasarkan kriteria CLSI. Seluruh isolat mampu menghambat B1.06 menunjukkan aktivitas tertinggi dan B3.13 terendah. Zona hambat yang terbentuk cenderung keruh, menunjukkan sifat bakteriostatik. Terhadap *Escherichia coli*, daya hambat berkisar 8,5–15,5 mm, dengan aktivitas tertinggi pada isolat B1.06 dan terendah pada C2.20. Pada *Salmonella typhimurium*, zona hambat berkisar 8,2–15,7 mm, sedangkan terhadap *Shigella flexneri* berkisar 8,9–20,6 mm, dengan isolat B1.06 secara konsisten menunjukkan aktivitas tertinggi.

**Tabel 3.** Hasil Uji Sensitivitas Bakteri Terhadap Isolat Aktinomisetes Dengan Dibandingkan Pada Standar Kriteria Diameter Zona Hambat Tetrasiklin Berdasarkan CLSI

Isolat	<i>Escherichia coli</i> (mm)	Kategori	<i>Salmonella typhimurium</i> (mm)	Kategori	<i>Shigella flexneri</i> (mm)	Kategori
B3.13	9,3 ± 1,0	Resisten	8,2 ± 0,6	Resisten	8,9 ± 0,5	Resisten
C2.20	8,5 ± 0,3	Resisten	8,3 ± 0,8	Resisten	9,4 ± 0,8	Resisten
C2.18	10,5 ± 0,1	Resisten	10,4 ± 1,7	Resisten	9,2 ± 1,1	Resisten
A2.01	12,2 ± 0,5	Resisten	12,6 ± 0,8	Resisten	12,5 ± 0,6	Resisten
B1.06	15,5 ± 0,9	Intermediet	15,7 ± 0,8	Intermediet	20,6 ± 0,8	Sensitif
Tetrasiklin	19,5 ± 0,6	Sensitif	17,1 ± 0,5	Intermediet	18,6 ± 0,7	Intermediet

Keterangan: Standar Diameter Zona Hambat (mm) berdasarkan *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), ( $\leq$ ) 14 mm (Resisten), antara 15-18 mm (Intermediet), ( $\geq$ ) 19 (Sensitif), dan (-) tidak masuk dalam kriteria

Berdasarkan Tabel 3. Sebagian besar isolat aktinomisetes (A2.01, B3.13, C2.18, dan C2.20) tergolong resisten terhadap *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, dan *Shigella flexneri* dengan diameter zona hambat  $\leq$ 14 mm menurut kriteria CLSI. Sifat resistensi yang

teramati pada bakteri uji disebabkan oleh perbedaan struktural yang dimiliki oleh kelompok bakteri Gram-negatif. Bakteri Gram-negatif memiliki outer layer memiliki lapisan lipopolisakarida (LPS) sehingga lebih sulit ditembus oleh senyawa antibakteri. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Addienda et al. (2025) di mana *E. coli* dan *P. aeruginosa* tidak membentuk zona hambat dalam uji cakram difusi dengan perlakuan metabolit sekunder dari ekstrak bahan alam.

Isolat B1.06 menunjukkan aktivitas lebih tinggi, dengan kategori intermediet (15–18 mm) terhadap *S. typhimurium*, dan *E. coli*, serta sensitif ( $\geq 19$  mm) terhadap *S. flexneri*. *Shigella flexneri* merupakan salah satu penyebab utama disentri basiler di negara berkembang, dengan kasus resistensi terhadap berbagai kelas antibiotik yang terus meningkat secara global (Kotloff et al., 2013). Beberapa penelitian sebelumnya telah melaporkan aktivitas antibakteri dari Actinomycetes terhadap beberapa bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Penelitian Pratiwi et al. (2018) mengenai Actinomycetes yang diisolasi dari kulit batang *Neesia altissima* melaporkan penghambatan pertumbuhan *Bacillus cereus*, *S. typhimurium*, dan *S. flexneri* dengan rentang diameter zona hambat 1,25 - 5,75 mm. Penelitian serupa juga melaporkan aktivitas antibakteri isolat Actinomycetes dari sedimen mangrove mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, dan *Staphylococcus aureus* (Alfany dkk., 2024).

Kontrol positif (tetrakisiklin) menunjukkan tidak ada kategori resisten; bersifat intermediet terhadap *S. typhimurium*, dan *S. flexneri*, serta sensitif terhadap *E. coli*. Bakteri *E. coli*, *S. typhimurium*, dan *S. flexneri* menunjukkan tingkat sensitivitas yang berbeda terhadap isolat-isolat aktinomisetes yang diuji. Perbedaan ini dapat dijelaskan melalui perbedaan komposisi membran luar, sistem pompa efluks, dan mekanisme pertahanan intrinsik yang dimiliki masing-masing spesies (Blair et al., 2015). Kontrol positif tetrakisiklin menghasilkan kategori sensitif hanya terhadap *E. coli* ( $19,5 \pm 0,6$  mm), sementara terhadap *S. typhimurium* dan *S. flexneri* hanya mencapai kategori intermediet. Hal ini mencerminkan fenomena resistensi tetrakisiklin yang telah meluas pada bakteri enteropatogen, yang sebagian besar dimediasi oleh gen tet yang mengkodekan protein pompa efluks (van Boeckel et al., 2014). Temuan ini semakin memperkuat urgensi pencarian alternatif senyawa antimikroba baru dari sumber Actinomycetes.

## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian, seluruh isolat aktinomisetes (A2.01, B1.06, B3.13, C2.18, dan C2.20) yang diekstraksi menggunakan etil asetat menunjukkan kemampuan menghambat bakteri patogen penyebab penyakit diare. Isolat B1.06 memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dibandingkan isolat lainnya, dengan diameter zona hambat terbesar terhadap *Shigella flexneri* (20,6 mm), *Salmonella typhimurium* (15,7 mm), *Escherichia coli* (15,5 mm). Sebagai saran, diperlukan penelitian lanjutan untuk mengoptimalkan waktu produksi metabolit sekunder serta mengeksplorasi penggunaan pelarut lain seperti kloroform dan n-heksana guna meningkatkan potensi aktivitas antibakteri.

## DAFTAR REFERENSI

- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, *12*(1), 1–10. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19)
- Addianda, M. H., Retnaningrum, E., Purwestri, Y. A., & Nugroho, L. N. (2025). Antibacterial activity of plant extracts commonly used as folk medicines collected from national parks in Jambi, Indonesia. *Plant Science Today*, *12*(3), 1–11. <https://doi.org/10.14719/pst.6828>
- Alfany, C., Faturrahman, & Suryadi, B. F. (2024). Uji aktivitas antibakteri *Actinomycetes* yang diisolasi dari sedimen mangrove Dusun Ketapang Sekotong Barat. *SJBIOS*, *3*(2), 23–32.
- Arenz, S., & Wilson, D. N. (2016). Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(9), Article a025361.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Bator, R. J., Bryan, A. D., & Schultz, P. W. (2011). Who gives a hoot? Intercept surveys of litterers and disposers. *Environment and Behavior*, *43*(3), 295–315. <https://doi.org/10.1177/0013916509356884>
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021). *Antibiotic resistance threats in the United States*. U.S. Department of Health and Human Services.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2023). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (33rd ed., CLSI Supplement M100). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Ervina, M. (2019). *Uji aktivitas antibakteri isolat aktinomisetes Arboretum Universitas Riau terhadap bakteri penyebab penyakit diare* (Skripsi, Universitas Riau).
- Genilloud, O. (2019). Actinomycetes: Still a glamorous source of novel antibiotics. *Biochemical Pharmacology*, *162*, 51–69. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.11.010>

- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Hidayati, S. N. (2016). Pengaruh pendekatan keras dan lunak pemimpin organisasi terhadap kepuasan kerja dan potensi mogok kerja karyawan. *Jurnal Maksipreneur: Manajemen, Koperasi, dan Entrepreneurship*, 5(2), 57–66. <https://doi.org/10.30588/SOSHUMDIK.v5i2.164>
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Hamadani, B. H. K., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Pratiwi, R. H., Hanafi, M., Artanti, N., & Pratiwi, R. D. (2018). Bioactivity of antibacterial compounds produced by endophytic actinomycetes from *Neesia altissima*. *Journal of Tropical Life Sciences*, 8(1), 37–42. <https://doi.org/10.11594/jtls.08.01.07>
- Putri, D. H., & Arif, A. (2016). Isolasi dan karakterisasi *Actinomycetes* dari tanah rhizosfer tanaman sebagai penghasil antibiotik. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 5(1), 23–31. <https://doi.org/10.25077/jbioua.5.1.23-31.2016>
- Raza, S., Kim, J., & Shin, S. (2021). The outer membrane of Gram-negative bacteria: Barrier, transport, and therapeutic targets. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 174, 113–132. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.04.011>
- Risdwiyanto, A., & Kurniyati, Y. (2015). Strategi pemasaran perguruan tinggi swasta di Kabupaten Sleman Yogyakarta berbasis rangsangan pemasaran. *Jurnal Maksipreneur: Manajemen, Koperasi, dan Entrepreneurship*, 5(1), 1–23. <https://doi.org/10.30588/SOSHUMDIK.v5i1.142>
- Sulistiyani, N., & Akbar, A. N. (2014). Aktivitas isolat *Actinomycetes* dari rumput laut (*Eucheuma cottonii*) sebagai penghasil antibiotik terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Pharmaciana*, 12(1), 4–12.
- Syarifuddin, S., et al. (2022). Penentuan kurva pertumbuhan dan aktivitas antibakteri dari isolat ekstrak etil asetat bakteri (Te.325) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 20(2), 2–8.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Magrini, N., Woodhead, M., Gyssens, I. C., Gabutti, G., Nyqvist, K. H., Carmeli, Y., Scoditti, S., Hsueh, P. R., Gandra, S., Bao, L., Mougari, F., ... WHO Pathogens Priority List Working Group. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A., & Laxminarayan, R. (2014). Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 742–750. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7)
- World Health Organization. (2021). *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report*. World Health Organization.