

PROFIL BIOAUTOGRAM AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ISOLAT JAMUR LAUT PADA ALGAE *Kappaphycus alvarezii* SECARA KLT BIOAUTOGRAFI

Fitriana, Rusli

Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia, Makassar

Email : fitriana.fitriana@umi.ac.id

ABSTRACT

The Research Chromatogram Profile Of Activities Antibacterial Extracts Isolates Marine Fungi in Algae Kappaphycus alvarezii by TLC Bioautography has been done with the intention of doing the screening test of pathogenic bacteria that can be inhibited by the extract of F3 (extract liquid culture and extract mycelia) and extracts of E (extract liquid culture and extract mycelia) and see chromatogram profile of liquid culture extract of F3 on bacteria Escherichia coli and mycelia extract of E on bacteria Bacillus subtilis. This research was conducted purification of Fungi isolates E and F3 followed by fermentation process of fungi isolates for 3 weeks. Then proceed with the extraction process using an ethyl acetate solvent. The solvent was evaporated to obtain a dry extract, followed by a screening test of antibacterial activity against bacterial pathogenic, antibacterial activity test by TLC Bioautography to liquid culture extract of F3 and extract mycelia of E. The results of the screening test with a concentration of 250 µg was obtained to extract liquid culture of F3 and E provide activity against 5 pathogenic bacteria to extract mycelia while F3 and E provide activity against two bacterial pathogens. Separation of compounds by TLC using the ethyl acetate eluent: ethanol: water (8: 2: 1). The result of TLC Bioautography test of liquid culture extract of F3 to bacteria Escherichia coli and mycelia extract of E on bacteria Bacillus subtilis showed the existence of antibacterial activity.

Key words : Alga, Antibakteri, TLC-Bioautografi, Isolate Fungi.

PENDAHULUAN

Mikroorganisme laut khususnya jamur, menjadi sumber penting untuk mendapatkan senyawa baru dengan aktivitas farmakologis yang potensial.¹ Jamur laut berasosiasi dengan berbagai macam substrat, diantaranya *sponge*, *mangrove*, alga dan tunikat. Sejumlah senyawa aktif dengan berbagai aktivitas seperti antitumor,

antikanker, antimikroba, sitotoksik dan antibiotik telah banyak diisolasi dari lingkungan laut. Jamur yang diisolasi dari lingkungan laut menghasilkan keanekaragaman metabolit sekunder yang tinggi. Dibandingkan dengan lingkungan terestrial, aktivitas metabolit habitat laut masih belum dieksplorasi. Jamur laut terbukti menjadi sumber yang menjanjikan

dalam pencarian senyawa senyawa bioaktif baru, salah satunya adalah antibiotik.²

Biota laut dalam beberapa tahun terakhir ini menjadi target dalam pencarian bahan antibiotik. Beberapa diantaranya mengandung berbagai jenis senyawa dengan bioaktivitas yang berbeda-beda. Alga merupakan salah satu biota laut potensial yang melimpah di perairan Indonesia, termasuk di Sulawesi Selatan.^{3,4} Metabolit sekunder dari jamur laut yang berasal dari alga dilaporkan memiliki potensi yang dapat dikembangkan sebagai antimikroba seperti antibakteri, antijamur, antivirus dan sebagainya.⁵

Selain kandungan primernya yang bernilai ekonomis, kandungan metabolit sekunder dari alga berpotensi sebagai produser bioaktif yang beragam dengan aktivitas yang sangat luas sebagai antibakteri, antivirus, antijamur dan sitostatik.⁶

Penelitian yang telah dilakukan oleh Fitriana (2015) yaitu isolasi dan uji aktivitas antimikroba isolat jamur laut pada beberapa jenis alga dari perairan Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan, diperoleh ekstrak etil asetat kultur cair isolat jamur dengan kode F3 terhadap bakteri *Escherichia coli* dan ekstrak etil asetat miselia isolat jamur

dengan kode E terhadap bakteri *Bacillus subtilis* memiliki nilai KHM dan KBM sebesar 512 µg/mL.⁷

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan yaitu profil bioautogram aktivitas antibakteri ekstrak isolat jamur laut pada alga *Kappaphycus alvarezii* secara KLT-Bioautografi. Selain itu juga akan dilakukan uji skrining aktivitas antibakteri isolat jamur laut pada alga *Kappaphycus alvarezii* dari perairan Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan terhadap beberapa bakteri patogen uji selain bakteri yang telah diujikan.

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, cawan petri, cawan penguap, corong pisah, Erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, inkubator, jarum Ose, kapas, kertas label, korek api, *laminary air flow*, lampu spiritus, lampu UV 254 nm dan 366 nm, lemari pendingin, otoklaf, oven, *shaker*, spektrofotometri UV-VIS, dan timbangan analitik. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah aquadest, Antimicrobial susceptibility test discs, biakan bakteri patogen (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shyggella*

Profil bioautogram aktivitas antibakteri ekstrak isolat jamur laut pada Algae Kappaphycus alvarezii secara KLT bioautografi

dysenteriae, *Streptococcus mutans*, *Vibrio cholerae* dan *Salmonella thypi*, *Staphylococcus epidermidis*), etanol 96%, larutan NaCl fisiologis 0,9%, medium MHA (*Muller Hinton Agar*), pelarut etil asetat, kloroform, n-heksan, metanol, n-butanol, asam asetat, sampel isolat jamur laut dengan kode F3 dan E. Digunakan juga *aqua demineralisasi*, NaHCO₃, MgCl₂.6H₂O, MgSO₄.7H₂O, CaCl₂.2H₂O, KCl, NaCl, *yeast extract*, pepton, dekstrosa, agar, pipa kapiler, lempeng KLT, dan Streptomisin sulfat.

Prosedur Kerja

Pemurnian Isolat Jamur

Isolat jamur dengan kode F3 dan E masing-masing dimurnikan dengan menggunakan medium YPD agar, yaitu masing-masing isolat ditanam ke dalam medium YPD agar dengan metode tusuk menggunakan jarum ose. Kemudian di inkubasi selama 5-7 hari pada suhu kamar. Pemurnian isolat jamur dilakukan hingga diperoleh isolat tunggal atau koloni tunggal.

Fermentasi Isolat Jamur

Media YPD agar yang bagian permukaannya ditumbuhkan jamur murni secara merata dipotong 1,5 cm x 1,5 cm dengan Ose bulat lalu dimasukkan kedalam Erlenmeyer 250 mL yang berisi 100 mL media cair

YPD steril untuk fermentasi. Fermentasi secara dinamis menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama tiga minggu pada suhu kamar.¹

Ekstraksi

Setelah tiga minggu hasil fermentasi disaring untuk memisahkan kultur cair dan miselia. Miselia dimaserasi selama 24 jam dengan pelarut etil asetat sedangkan kultur cair diekstraksi dengan ekstraksi cair-cair sebanyak 3 kali dengan pelarut etil asetat. Pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* lalu dimasukkan ke dalam cawan penguap yang sudah ditara, sampai diperoleh ekstrak kering.¹

Penyiapan Bakteri patogen

Biakan bakteri yang digunakan untuk pengujian yaitu *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shygella dysenteriae*, *Streptococcus mutans*, *Vibrio cholera*, *Salmonella thypi*, dan *Staphylococcus epidermidis*. Bakteri dari biakan stok diinokulasikan pada media agar miring MHA, dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Kemudian bakteri disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9 %. Suspensi mikroba yang telah dibuat diukur transmitannya pada spektrofotometri UV Vis pada panjang gelombang 580 nm hingga mencapai

transmitan 25 % untuk bakteri yang setara dengan standar McFarland 1×10^8 CFU/mL.

Uji Skrining Ekstrak Isolat Jamur Terhadap Bakteri Patogen

Sebanyak 20 μ L bakteri patogen (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shyella dysenteriae*, *Streptococcus mutans*, *Vibrio cholera*, *Salmonella thypi*, dan *Staphylococcus epidermidis*) dimasukkan ke dalam cawan petri lalu ditambahkan masing-masing media MHA sebanyak 15 mL, dihomogenkan dengan menggoyang cawan petri. Setelah agar memadat, letakkan cakram di atasnya kemudian diteteskan sebanyak 10 μ L yang mengandung bobot 250 μ g ekstrak uji pada cakram. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 x 24 jam untuk bakteri. Kontrol positif dibuat menggunakan streptomisin sulfat konsentrasi 250 μ g dan kontrol negatif menggunakan metanol. Kemudian diamati diameter hambatan yang terbentuk disekitar cakram uji.¹

Pemisahan Secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Lempeng KLT diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit sebelum digunakan. Ekstrak etil asetat kultur F3

dan ekstrak etil asetat miselia E yang menunjukkan aktivitas ditotolkan pada lempeng KLT ukuran 7 x 1 cm dengan menggunakan pipa kapiler. Lalu dilusi dengan menggunakan eluen etil asetat : etanol : air (8 : 2 : 1) di dalam chamber. Lempeng dikeluarkan dari chamber, diangin – anginkan hingga cairan pengelusnya menguap. Kemudian kromatogram yang dihasilkan diamati nodanya di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, serta dihitung nilai Rf-nya.

Pengujian KLT Bioautografi

Hasil identifikasi KLT dilanjutkan dengan uji KLT-Bioautografi dengan cara medium *Muller Hinton Agar (MHA)* steril sebanyak 10 mL dituang ke dalam cawan petri steril yang berisi suspensi bakteri patogen sebanyak 20 μ L kemudian dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Lempeng KLT yang telah dilusi, diletakkan di atas permukaan medium agar dan dibiarkan selama 60 menit. Setelah itu, lempeng tersebut diangkat dan dikeluarkan, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Diamati bercak noda yang memberikan aktivitas sebagai antibakteri.

HASIL PENELITIAN

Hasil Uji Skrining Aktivitas Antibakteri Ekstrak E dan Ekstrak F3

Tabel 1. Hasil Uji Skrining Aktivitas Antibakteri Ekstrak E dan Ekstrak F3 Terhadap Beberapa Bakteri Patogen.

Sampel Ekstrak	Diameter Zona Hambatan (mm) Bakteri patogen						
	1	2	3	4	5	6	7
Ekstrak kultur cair E	9,73	10,79	0	7,27	6,39	0	8,37
Ekstrak Miselia E	8,55	7,68	0	0	0	0	0
Ekstrak Kultur cair F3	8,07	7,59	0	8,90	6,90	0	8,89
Ekstrak Miselia F3	8,70	8,62	0	0	0	0	0

Keterangan :

1.	: <i>Shigella dysenteriae</i>	4.	: <i>Staphylococcus aureus</i>
2.	: <i>Salmonella thypii</i>	5.	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3.	: <i>Streptococcus mutans</i>	6.	: <i>Vibrio cholera</i>
		7.	: <i>Stahpylococcus epidermidis</i>

Hasil Uji Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Tabel 2. Hasil Uji Kontrol Positif dan Kontrol Negatif Terhadap Beberapa Bakteri Patogen.

Kontrol Uji	Diameter Zona Hambatan (mm) Bakteri patogen						
	1	2	3	4	5	6	7
Kontrol Positif	11,64	12,33	26,58	12,71	19,33	10,91	13,76
Kontrol Negatif	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan :

1	: <i>Shigella dysenteriae</i>	4	: <i>Staphylococcus aureus</i>
2	: <i>Salmonella thypii</i>	5	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3	: <i>Streptococcus mutans</i>	6	: <i>Vibrio cholera</i>
		7	: <i>Stahpylococcus epidermidis</i>

Hasil profil kromatogram secara (KLT) ekstrak kultur cair F3

Tabel 3. Hasil profil kromatogram secara (KLT) ekstrak kultur cair F3 menggunakan eluen etil asetat : etanol : air (8:2:1)

Bercak	Penampak Bercak pada			
	UV 254		UV 366	
	Nilai Rf	Warna	Nilai Rf	Warna
1	0,98	Ungu	0,98	Ungu berpendar
2	0,92	Ungu	0,92	Ungu berpendar
3	0,74	Ungu	0,87	Ungu berpendar
4	0,65	Ungu	0,83	Ungu berpendar
5	-		0,78	Ungu berpendar
6	-		0,74	Ungu berpendar
7	-		0,65	Ungu berpendar

Hasil profil kromatogram secara (KLT) ekstrak miselia E

Tabel 4. Hasil profil kromatogram secara (KLT) ekstrak miselia E menggunakan eluen etil asetat : etanol : air (8:2:1)

Bercak	Penampak Bercak pada			
	UV 254		UV 366	
	Nilai Rf	Warna	Nilai Rf	Warna
1	0,96	Ungu	0,96	Ungu berpendar
2	0,92	Ungu	0,92	Ungu berpendar
3	0,80	Ungu	0,80	Ungu berpendar
4	0,74	Ungu	0,74	Ungu berpendar
5	0,63	Ungu	0,63	Ungu berpendar

PEMBAHASAN

Isolat jamur dengan kode E dan F3 yang diperoleh dari alga *Kappaphycus alvarezii* dimurnikan dengan menggunakan metode tusuk sampai diperoleh isolat jamur yang murni. Isolat jamur yang telah murni kemudian dilanjutkan dengan proses fermentasi dengan menggunakan media cair YPD steril dalam labu Erlenmeyer. Fermentasi dilakukan secara dinamis menggunakan *shaker* selama tiga minggu pada suhu kamar dengan kecepatan 150 rpm, agar pada saat fermentasi dihasilkan pelet berukuran kecil dan padat.⁸ Fermentasi dilakukan selama tiga minggu karena telah memasuki fase stationer dan telah menghasilkan metabolit sekunder. Fermentasi dilakukan pada suhu kamar karena produksi metabolit antimikroba akan meningkat pada peningkatan temperatur dari 20-25 °C.⁹

Setelah fermentasi, kultur cair dan miselia dipisahkan, dilanjutkan dengan proses ekstraksi senyawa metabolit dengan tujuan untuk memecah sel sehingga senyawa metabolit berdifusi ke pelarut.¹⁰ Kultur cair diekstraksi dengan etil asetat menggunakan metode ekstraksi cair-cair, sedangkan miselia diekstraksi dengan etil asetat menggunakan metode maserasi. Pelarut etil asetat digunakan karena memiliki sifat yang semi polar sehingga diharapkan metabolit yang diekstraksi bersifat semi polar. Metabolit yang dihasilkan oleh jamur dapat dikeluarkan ke media kultur cair namun sebagian dapat ditemukan di dalam miselium. Ekstraksi cair-cair dilakukan terhadap media kultur cair untuk memperoleh metabolit ekstraseluler jamur, sedangkan maserasi dilakukan terhadap miselia untuk memperoleh metabolit intraseluler.¹¹ Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan

menggunakan *rotary evaporator* lalu dipindahkan ke dalam vial steril yang telah ditara dan dibiarkan pada udara terbuka agar sisa etil asetat menguap dan diperoleh ekstrak kering.

Ekstrak yang diperoleh kemudian dilanjutkan dengan pengujian skrining aktivitas antibakteri ekstrak terhadap beberapa bakteri patogen yang lain selain bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*. Uji skrining aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat kultur cair dan miselia dengan kode E, dan F3 bertujuan untuk melihat ekstrak tersebut mampu memberikan aktivitas antibakteri dengan terbentuknya diameter zona hambatan di sekitar disk yang telah ditetesi ekstrak dengan konsentrasi 250 µg. Hasil dari uji skrining aktivitas antibakteri ekstrak dari kultur cair dan ekstrak dari miselia dengan kode E, F3 terhadap bakteri patogen dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil yang diperoleh pada uji skrining aktivitas antibakteri ekstrak kultur cair E dan ekstrak kultur cair F3 memberikan aktivitas terhadap 5 bakteri patogen yaitu *Shigella dysenteriae*, *Salmonella thypi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis*. Uji skrining aktivitas antibakteri ekstrak miselia E dan

ekstrak miselia F3 memberikan aktivitas terhadap 2 bakteri patogen yaitu *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella thypi*. Pengujian skrining aktivitas antibakteri ini menggunakan kontrol positif (antibiotik streptomisin) dan kontrol negatif (pelarut metanol). Hasil uji kontrol positif dan kontrol negatif terhadap bakteri patogen dapat dilihat pada Tabel 2.

Antibiotik streptomisin sulfat digunakan sebagai kontrol positif untuk uji aktivitas antibakteri jamur yang diisolasi dari sampel laut berdasarkan protokol yang dibuat.¹ Kontrol positif yang digunakan memberikan aktivitas terhadap semua bakteri patogen yang diujikan. Kontrol negatif yang digunakan adalah pelarut metanol, dimana pelarut metanol ini tidak memberikan hambatan terhadap bakteri patogen yang diujikan.

Hasil yang telah diperoleh dari penelitian sebelumnya untuk ekstrak kultur cair F3 terhadap bakteri *Escherichia coli* dan ekstrak miselia E terhadap bakteri *Bacillus subtilis* yang menunjukkan nilai KHM dan KBM sebesar 512 µg/mL memiliki potensi kuat sebagai antibakteri, sehingga dilakukan penelitian lanjutan untuk melihat profil kromatogram dari setiap ekstrak tersebut. Ekstrak kultur cair F3 dan ekstrak miselia E terlebih

dahulu dilakukan pemisahan senyawa dengan menggunakan campuran eluen etil asetat : etanol : air (8 : 2 : 1) dengan penampak bercak UV 254 nm dan UV 366 nm. Pada penampak bercak UV 254 nm ekstrak kultur cair F3 diperoleh sebanyak 4 bercak sedangkan penampak bercak UV 366 nm ekstrak kultur cair F3 diperoleh 7 bercak. Hasil profil kromatogram dapat dilihat pada Tabel 3. Pada penampak bercak UV 254 nm ekstrak miselia E diperoleh dan penampak bercak UV 366 nm diperoleh sebanyak 5 bercak. Hasil profil kromatogram dapat dilihat pada Tabel 4

Setelah diperoleh profil kromatogram dari ekstrak kultur cair F3 dan ekstrak miselia E, kemudian dilanjutkan dengan metode KLT-Bioautografi dengan metode kontak. Bioautografi dilakukan dengan metode bioautografi kontak, yaitu dengan meletakkan lempeng kromatogram hasil elusi senyawa yang akan diuji di atas media padat yang sudah diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Adanya senyawa antimikroba atau antibakteri ditandai dengan adanya daerah jernih yang tidak ditumbuhi mikroba.¹² Pengujian secara KLT-Bioautografi untuk ekstrak kultur cair F3 terhadap bakteri *Escherichia coli* pada penampak bercak UV 254 nm

diperoleh 2 bercak dengan nilai Rf = 0,92 dan 0,74 sedangkan penampak bercak UV 366 nm diperoleh 3 bercak dengan nilai Rf = 0,92, 0,83 dan 0,74 yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Pengujian secara KLT-Bioautografi untuk ekstrak miselia E terhadap bakteri *Bacillus subtilis* pada penampak bercak UV 254 nm dan penampak bercak UV 366 nm diperoleh sebanyak 3 bercak dengan nilai Rf = 0,92, 0,80 dan 0,74 yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak isolat jamur laut F3 dan ekstrak isolat jamur E dapat memberikan aktivitas terhadap 5 bakteri patogen yang lain. Profil kromatogram ekstrak kultur cair F3 terhadap bakteri *Escherichia coli* pada penampak bercak UV 254 nm diperoleh 2 bercak dan penampak UV 366 nm diperoleh 3 bercak yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Profil kromatogram ekstrak miselia E terhadap bakteri *Bacillus subtilis* pada penampak bercak UV 254 nm dan penampak UV 366 nm diperoleh 3 bercak yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kjer JA, Debbab HA, Aly, Proksch. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. Nature Publishing group; 2010.
2. Bhadury PBT, Mohammad, Wright PC. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. J Ind Microbiol Biotechnol 2006.
3. Salem WMH, Galal, Nasr EF. Screening for Antibacterial Activities In Some Marine ALgae from The Red Sea (Hurghada, Egypt). African Journal of Microbiology Research 2011;5:5.
4. Arifuddin R, Patong, Ahmad A. Penelusuran Protein Bioaktif dalam Makro Alga sebagai Bahan Antibakteri dan Antijamur. Marina Chimica Acta 2001;2(2).
5. Cabrita MC, Vale, Rauter A. Halogenated compounds from marine algae. Marine Drugs 2010;8.
6. Zainuddin EN, Malina AC. Skrining Rumput Laut Asal Sulawesi Selatan sebagai Antibiotik Melawan Bakteri Patogen pada Ikan [Laporan Penelitian]. Research Grant; 2009.
7. Fitriana. Isolasi dan Uji Aktivitas Antimikroba Isolat Jamur Laut Pada Beberapa Jenis Alga Dari Perairan Kabupaten Takalar, Sulawesi selatan (Tesis). Bandung : Pasca Sarjana Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung;2015.
8. Purwanto LA, *et al.* Effect of Agitation Speed on Morphological Changes in *Apergillus niger* Hyphae During Production of Tannase, World Journal of Chemistry, Yogyakarta; 2009.
9. Jain P, Pundir RK. Effect of Fermentation Medium, pH, and Temperature Variations on Antibacterial Soil Fungal Metabolite Production, J Agr Sci Tech 2011;7(2).
10. Mawaddah R. Kajian Hasil Riset Potensi Antimikroba Alami dan Aplikasinya dalam Bahan Pangan. Bogor : Pusat Informasi Teknologi Pertanian Fateta IPB. Fakultas Teknologi, Institut Pertanian Bogor; 2008.
11. Oktaviary R. Isolasi dan Skrining Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Dari Lingkungan Laut, (Skripsi). Bandung : Sekolah Farmasi; 2014.
12. Kusumaningtyas E, Astuti E, Darmono. Sensitivitas Metode Bioautografi Kontak dan *Agar-Overlay* dalam Penentuan Senyawa Antikapang. J Farm Ind 2008;6(2):75-79.