

Penentuan Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Antibakteri dari Isolat Ekstrak Etil Asetat Bakteri (Te.325) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

(Determination of Growth Curve and Antibacterial Activity of Ethyl Acetate Extract Bacterial Isolate (Te.325) on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*)

ALFIAN SYARIFUDDIN^{1*}, RATNA WIJAYATRI¹, ICHSAN FERI KURNIAWAN¹,
HERMA FANANI AGUSTA¹

¹Departemen Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Magelang, Jalan
Mayjend. Bambang Soegeng, Mertoyudan, Magelang, Jawa Tengah, 56172, Indonesia

Diterima 29 April 2021, Disetujui 15 Juli 2022

Abstrak: Perkembangan kasus infeksi dan penggunaan antibiotik yang kurang tepat menimbulkan kasus resistensi antibiotik. Alternatif dalam mengatasi banyaknya antibiotik yang sudah resisten bakteri, yaitu dengan penemuan antibiotik baru. Proses penemuan antibiotik salah satunya dari mikroorganisme, yaitu dari bakteri. Proses eksplorasi penemuan antibiotik tersebut menggunakan pendekatan fase pertumbuhan bakteri, yaitu fase stasioner dimana bakteri memproduksi metabolit sekunder, salah satunya adalah senyawa antibiotik. Isolat Te.325 merupakan bakteri penghasil antibiotik tetapi belum diketahui fase pertumbuhannya yang dapat digunakan untuk melakukan pendekatan proses perolehan antibiotik. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan waktu fase pertumbuhan isolat Te.325 dan melakukan ekstraksi senyawa antibiotik dari isolat tersebut. Penentuan kurva pertumbuhan yaitu berdasarkan berat biomassa sel dan nilai absorbansi pada spektrofotometri UV/ Vis dari kultur yang disampling setiap hari selama 14 hari waktu inkubasi kultur. Hasil penelitian menunjukkan fase log/eksponensial pada hari ke-5 dan fase stasioner pada hari ke-9. Aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat dilakukan pengujian menggunakan metode sumuran dengan konsentrasi ekstrak 40% yang menghasilkan rata-rata diameter zona hambat sebesar 8,04 mm terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan 9,035 mm pada *Escherichia coli*. Ekstrak etilasetat Te.325 tergolong dalam potensi sedang.

Kata kunci: *Actinomycetes*, *Escherichia coli*, metabolit sekunder, rizosfer, spektrofotometri UV-Vis, *Staphylococcus aureus*

Abstract: The development of infection cases and inappropriate use of antibiotics has led to cases of antibiotic resistance. An alternative to overcoming the many antibiotics that are already resistant to bacteria has led to the discovery of new antibiotics. One of the processes of discovering antibiotics is from microorganisms, namely bacteria. The exploration process for the discovery of antibiotics uses a bacterial growth phase approach, namely the stationary phase which produces secondary metabolites, one of, which are bacteria that contain antibiotic compounds. Te.325 isolate is a producer of bacterial antibiotics but The growth phase is not yet known and can be used to approach the process of obtaining antibiotics. The study was to obtain the growth phase time of the Te.325 isolate and to extract antibiotic compounds from the isolate. The determination of the growth curve is based on the weight of cell biomass and the absorbance value on UV/ Vis spectrophotometry of the culture sampled every day for 14 days of culture incubation. The results showed a log/exponential phase on 5th day and a stationary phase on 9th day. The activity test of the ethyl acetate extract was carried out using the well method with an extract concentration of 40%, which resulted in an average diameter of 8.04mm in *Staphylococcus aureus* and 9.035mm in *Escherichia coli*. The ethyl acetate extract of Te.325 has medium potency.

Keywords: *Actinomycetes*, *Escherichia coli*, rizofer, secondary metabolite, UV-Vis spectrophotometry

*Penulis korespondensi
e-mail: alfiansy@ummg.ac.id

PENDAHULUAN

INFEKSI menjadi salah satu penyebab kasus kematian sebesar 50-70% pada beberapa rumah sakit. Mayoritas kasus infeksi yang banyak terjadi di masyarakat, antara lain: infeksi golongan *Enterobacteria* dari golongan *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiela*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa*⁽¹⁾.

Penanganan infeksi bakteri yaitu dengan terapi antibiotik. Seiring perkembangan kasus infeksi, terdapat banyak bakteri yang mengalami resistensi terhadap antibiotik. Resistensi antibiotik dapat menyebabkan beberapa wabah infeksi yang serius, bahkan menyebabkan kematian. Alternatif cara mengatasi banyaknya antibiotik yang sudah resisten bakteri, salah satunya dengan melakukan penemuan antibiotik baru. Penemuan antibiotik baru perlu dilakukan yang bertujuan untuk mendapatkan antibiotik yang mampu menjadi alternatif penghambatan atau mematikan bakteri yang telah resisten terhadap beberapa antibiotik⁽²⁾. Penemuan senyawa tersebut merupakan hasil metabolit dari suatu mikroorganisme, salah satunya bakteri *Actinomycetes*⁽³⁾. *Actinomycetes* merupakan bakteri gram positif yang terbukti mampu menghasilkan metabolit sekunder, salah satunya senyawa antibiotik. *Actinomycetes* terutama *Streptomyces* mampu menghasilkan sebanyak 95% dari 2000 antibiotik⁽⁴⁾. *Actinomycetes* banyak ditemukan seperti pada rizosfer ataupun tempat ekstrim seperti daerah kawah gunung berapi dan membutuhkan temperatur untuk tumbuh sekitar 25-37°C yang ukuran besar dengan kecenderungan untuk membentuk rantai atau *filament*⁽⁵⁾.

Senyawa metabolit yang berpotensi sebagai antibiotik diproduksi setelah bakteri memasuki fase awal stasioner dan terakumulasi pada fase akhir stasioner⁽⁶⁾. Fase pertumbuhan suatu bakteri mempunyai waktu pertumbuhan yang variatif⁽⁷⁾. Waktu fase pertumbuhan antar bakteri yang bervariasi mempengaruhi waktu inkubasi yang diperlukan suatu bakteri dalam mencapai fase stasioner dimana bakteri mulai melakukan metabolisme sekunder yang menghasilkan metabolit sekunder, salah satunya senyawa antibiotik⁽⁸⁾. Optimasi waktu pertumbuhan dapat dilakukan berdasarkan serapan spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang 600 nm pada *Actinomycetes* yang diisolasi di lautan⁽⁹⁾.

Berdasarkan uraian-uraian tersebut, penelitian mengenai penentuan kurva pertumbuhan isolate bakteri Te.325 dan uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat metabolit sekundernya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Starter isolat Te.325 yang telah dilakukan isolasi dari rizosfer tanaman tebu (*Saccharum officinarum L*) di Madugondo, Desa Sitimulyo, Kecamatan Piyungan, Kabupaten Bantul, Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta (7°49'57.9"S 110°26'01.1"E), *Starch Nitrate Broth* (SNB)⁽¹⁰⁾, media *Brain heart infusion* (BHI), media Mueller Hinton, dan bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (*E. coli*).

METODE. Pembuatan Kultur Stater. Isolat Te.325 sebanyak 5 mL diinokulasi ke dalam media SNB sebanyak 50 ml pada erlenmeyer 100 ml (1:10) yang diinkubasi selama 5 hari pada suhu kamar dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer/shaker*⁽¹¹⁾.

Preparasi Kultur Uji. Starter sebanyak 50 ml dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 500 ml media SNB steril. Fermentasi dilakukan dengan diinkubasi selama 14 hari dengan agitasi menggunakan *magnetic stirrer*. Preparasi kultur uji ini dilakukan dengan cara aseptis di ruang *Laminar Air Flow* (LAF)⁽¹²⁾.

Pemisahan Biomassa Sel dengan Metabolit. Kultur dilakukan inkubasi 14 hari dan disampling setiap hari sebanyak 2 ml. Sampling cairan kultur disentrifuse selama 10 menit pada kecepatan 8000 rpm. Supernatan dipisahkan dari endapan biomassa sel dan dimasukkan dalam tabung *ependorf* baru dan disimpan dalam *freezer*⁽¹²⁾.

Pembuatan Suspensi Bakteri. Stok suspensi bakteri *S. aureus* dan *E. coli* disuspensikan kembali ke dalam 1 mL media cair BHI baru, diinkubasi selama 18 sampai 24 jam pada suhu 37°C. Sebanyak 100 µL, dimasukkan kedalam 1 mL BHI dan diinkubasi selama 4 sampai 8 jam pada suhu 37°C. Suspensi diencerkan menggunakan NaCl 0,9% hingga kekeruhan sesuai dengan standar Mc Farland (10⁸ CFU/mL)⁽¹³⁾.

Optimasi Pertumbuhan dengan Spektrofotometri UV-VIS. Penentuan kurva pertumbuhan isolat bakteri Te.325 berdasarkan serapan absorpsi spektromoter Ultraviolet-visible (Uv-Vis) yang dilakukan pada sampling kultur setiap hari selama 14 hari dan replikasi 3 kali.

Pemanenan dan Ekstraksi. Kultur uji yang telah diinkubasi selama 14 hari disaring menggunakan corong *buchner* kemudian filtrat dipisahkan pada suhu 50°C. Filtrat diekstraksi dengan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:1.

Uji Aktivitas Ekstrak Etil Asetat. Penapisan antibakteri ekstrak etil asetat isolat Te.325 dilakukan

pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Escherichia coli* dengan kertas cakram yang diberi 20 µl ekstrak etil asetat 40% isolat Te.325 dan ditempel pada permukaan media. Hasil perlakuan diinkubasi selama 18 sampai 24 jam pada suhu 37°C kemudian diamati dan diukur rata-rata diameter zona hambatnya⁽¹³⁾.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Ekstrak ditotolkan pada plat dengan bantuan pipa kapiler 5 µL. Ekstrak etil asetat sebanyak 8 mg dilarutkan dengan 40 µL metanol. Fase diam yang digunakan adalah silica gel F254. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform: metanol (7:3). Plat KLT dielusi, dikeringkan, kemudian diamati profil pemisahannya di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm kemudian hitung nilai Rf nya⁽¹²⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

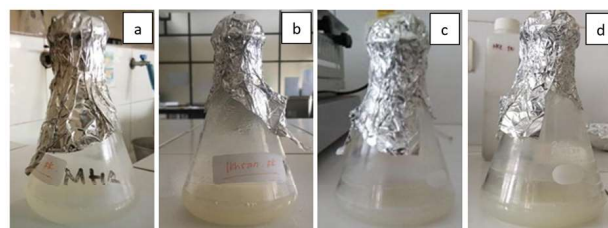
Pembuatan Kultur Starter. Kultur starter pada penelitian ini menggunakan media SNB (*Starch Nitrat Borth*) steril. Media SNB (*Starch Nitrat Borth*) digunakan karena terdapat nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri *Actinomycetes*. Media SNB (*Starch Nitrat Borth*) digunakan karena terdapat sumber karbon dan mineral yang berasal dari pati dan gliserol pada *soluble starch*. Media pertumbuhan yang baik adalah media yang dapat menyediakan sumber karbon dan mineral-mineral lain yang dibutuhkan isolate bakteri untuk pertumbuhan bakteri. Mineral-mineral lain tersebut adalah sumber nitrogen yang berasal dari NO₃, banyak isi sel, terutama protein, mengandung nitrogen dan aktivator enzim, mineral yang diperlukan sebagai aktivator enzim, seperti Mg, Fe, K, dan Ca⁽¹⁴⁾. Pembuatan kultur starter dilakukan dengan perbandingan (1:10) isolate Te.325 dan media SNB dan diinkubasi selama 5 hari dengan agitasi menggunakan *magnetic stirrer*⁽¹¹⁾. Inkubasi selama 5 hari dilakukan untuk membuat kultur starter agar ada proses penyesuaian dengan media yang digunakan dan telah mencapai fase log, yaitu fase dimana pertumbuhan sel secara optimal⁽¹³⁾.

Pembuatan Kultur Uji. Pembuatan kultur uji ini dilakukan dengan cara memasukkan 5 mL cairan kultur starter yang sudah diinkubasi selama 5 hari ke dalam erlenmeyer berisi 50 mL media SNB yang telah disterilkan⁽¹³⁾. Pindahan kultur uji ini dilakukan secara aseptis di dalam LAF agar tidak terjadi kontaminasi. Pembuatan kultur uji ini dilakukan dengan perbandingan antara kultur starter dengan media SNB dengan perbandingan 1:10. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 14 hari dengan pengadukan di atas hotplate stirrer⁽¹¹⁾. Selama masa inkubasi 14 hari terjadi perubahan warna dari warna putih keruh

menjadi kekuningan. Terjadinya perubahan warna cairan kultur ini karena *Actinomycetes* mengeluarkan pigmen warna yang mampu berdifusi maupun tidak pada media selama masa inkubasi yaitu 14 hari dengan suhu ruangan. Suhu ruangan dibutuhkan karena suhu optimum untuk pertumbuhan ini berkisar antara 25-35°C⁽¹⁵⁾. Pernyataan tersebut dapat menunjukkan bahwa perubahan warna yang terjadi pada cairan kultur isolat Te.325 disebabkan karena isolat Te.325 mengeluarkan pigmen warna dan bakteri mengalami pertumbuhan. Hasil pengamatan pada kultur yang diinkubasi mengalami perubahan warna pada kultur uji ditunjukkan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel 1. Perubahan warna inkubasi kultur isolat bakteri (Te.325) selama 14 hari.

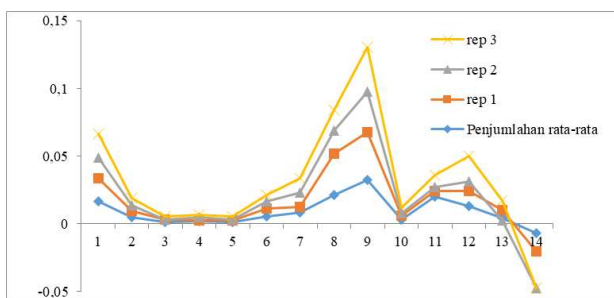
Hari	Warna	Hari	Warna
1.	Putih kekuningan	8.	Kuning keruh
2.	Putih kekuningan	9.	Kuning
3.	Putih kekuningan	10.	Kuning
4.	Putih kekuningan	11.	Kuning
5.	Putih kekuningan	12.	Kuning
6.	Putih kekuningan	13.	Kuning
7.	Kuning keruh	14.	Kuning



Gambar 1. Perubahan wana kultur selama masa inkubasi selama 14 hari. (a) Hari ke-1, (a) Hari ke-5, (c) Hari ke-10, (d) Hari ke-14.

Profil Pertumbuhan Bakteri *Actinomycetes* Isolate Te.325. Profil pertumbuhan bakteri *Actinomycetes* (Isolat Te.325) dihasilkan dari pemisahan antara supernatan dan endapan (biomassa sel) selama 14 hari. Supernatan digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri dan endapan (biomassa sel) digunakan untuk mengetahui profil pertumbuhan bakteri. Endapan dikeringkan dan ditimbang setiap harinya sehingga di peroleh grafik. Grafik yang diperoleh fase eksponensial tercapai pada hari ke-9. Penelitian penentuan fase pertumbuhan yang dilakukan oleh Dahlan dkk (2017) adalah dengan membuat sebuah grafik pertumbuhan, sehingga dapat mengetahui waktu tumbuh optimum (fase eksponensial) dari mikroba tersebut⁽¹⁶⁾. Hasil dari grafik pertumbuhan biomassa sel, yaitu semakin kecil kekeruhan maka biomassa sel semakin sedikit, sedangkan semakin besar kekeruhan maka biomassa sel semakin banyak. Pengujian untuk memperoleh profil pertumbuhan tersebut dilakukan dengan cara kultur uji yang telah diambil selama 14 hari disentrifus

dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit⁽¹⁷⁾. Hasil dari biomassa sel dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C kemudian di timbang menggunakan timbangan analitik dan didapatkan hasil berat sel. Grafik yang diperoleh sebagai pertumbuhan bakteri *Actinomyces* (isolat Te.325)⁽¹⁸⁾. Profil pertumbuhan isolat Te.325 ditunjukkan pada Gambar 2. Pertumbuhan bakteri terdapat empat fase, yaitu fase lag, fase log, fase stasioner, serta fase kematian. Fase lag bakteri *Actinomyces* isolat Te.325 dimulai pada hari ke-1 dimana pada hari ke-1 ini bakteri beradaptasi dengan lingkungan sekitar, seperti pH, suhu, nutrisi, dan lain sebagainya. Pada fase ini peningkatan jumlah sel bakteri berlangsung lambat. Fase kedua adalah fase Log, pertumbuhan bakteri berlangsung sangat cepat, pada fase ini suatu jenis mikroba memperbanyak diri dengan cara membelah diri menjadi dua, kemudian masing-masing membelah lagi menjadi dua sehingga pada setiap generasi jumlahnya menjadi dua kali populasi sebelumnya. Waktu yang dibutuhkan untuk terjadinya proses ini disebut waktu generasi⁽¹⁹⁾. Fase log isolat Te.325 dimulai pada hari ke-5 dimana bakteri mulai membelah diri dan memasuki masa pertumbuhan. Pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh media tempat tumbuh seperti pH dan kandungan nutrisi, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara. Fase Stasioner dimulai pada hari ke-9 dimana pertumbuhan dan kematian seimbang dan terdapat titik puncak, terjadi peningkatan yang signifikan sehingga dianggap telah mencapai fase stasioner jumlah sel tidak lagi mengalami peningkatan.



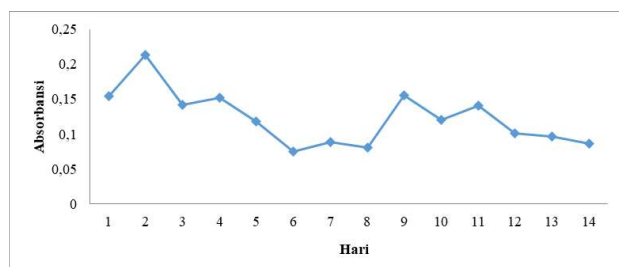
Gambar 2. Grafik pertumbuhan bakteri berdasarkan bobot sel.

Profil pertumbuhan bakteri *Actinomyces* (Isolat Te.325) dihasilkan dari pemisahan antara supernatan dan endapan (biomassa sel) selama 14 hari. Supernatan digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri dan endapan (biomassa sel) digunakan untuk mengetahui profil pertumbuhan bakteri. Endapan dikeringkan dan ditimbang setiap harinya sehingga di peroleh grafik. Grafik yang diperoleh fase eksponensial tercapai pada hari ke-9. Penelitian penentuan fase pertumbuhan yang dilakukan oleh Dahlan dkk (2017) adalah dengan membuat sebuah grafik pertumbuhan,

sehingga dapat mengetahui waktu tumbuh optimum (fase eksponensial) dari mikroba tersebut⁽¹⁶⁾. Hasil dari grafik pertumbuhan biomassa sel, yaitu semakin kecil kekeruhan maka biomassa sel semakin sedikit, sedangkan semakin besar kekeruhan maka biomassa sel semakin banyak. Pengujian untuk memperoleh profil pertumbuhan tersebut dilakukan dengan cara kultur uji yang telah diambil selama 14 hari disentrifus dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit⁽¹⁷⁾. Hasil dari biomassa sel dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C kemudian di timbang menggunakan timbangan analitik dan didapatkan hasil berat sel. Grafik yang diperoleh sebagai pertumbuhan bakteri *Actinomyces* (isolat Te.325)⁽¹⁸⁾. Profil pertumbuhan isolat Te.325 ditunjukkan pada Gambar 2. Pertumbuhan bakteri terdapat empat fase, yaitu fase lag, fase log, fase stasioner, serta fase kematian. Fase lag bakteri *Actinomyces* isolat Te.325 dimulai pada hari ke-1 dimana pada hari ke-1 ini bakteri beradaptasi dengan lingkungan sekitar, seperti pH, suhu, nutrisi, dan lain sebagainya. Pada fase ini peningkatan jumlah sel bakteri berlangsung lambat. Fase kedua adalah fase Log, pertumbuhan bakteri berlangsung sangat cepat, pada fase ini suatu jenis mikroba memperbanyak diri dengan cara membelah diri menjadi dua, kemudian masing-masing membelah lagi menjadi dua sehingga pada setiap generasi jumlahnya menjadi dua kali populasi sebelumnya. Waktu yang dibutuhkan untuk terjadinya proses ini disebut waktu generasi⁽¹⁹⁾. Fase log isolat Te.325 dimulai pada hari ke-5 dimana bakteri mulai membelah diri dan memasuki masa pertumbuhan. Pada fase ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh media tempat tumbuh seperti pH dan kandungan nutrisi, juga kondisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara. Fase Stasioner dimulai pada hari ke-9 dimana pertumbuhan dan kematian seimbang dan terdapat titik puncak, terjadi peningkatan yang signifikan sehingga dianggap telah mencapai fase stasioner jumlah sel tidak lagi mengalami peningkatan.

Analisis *Actinomyces* dengan Spektrofotometri UV-VIS. Analisis Spektrofotometri UV-VIS merupakan salah satu metode pengukuran biomassa sel. Hasil pembacaan ditunjukkan pada Gambar 3. Fase pertumbuhan bakteri *Actinomyces* isolat Te.325 berdasarkan serapan pada spektrofotometri UV-VIS dilakukan menggunakan cairan yang disampling per hari selama 14 hari, dimana semakin keruh maka nilai absorbansinya semakin tinggi. Hal tersebut ada peningkatan jumlah sel bakteri sehingga meningkatkan kekeruhan. Kurva pertumbuhan terdiri dari fase lag, fase log, fase stasioner. Tujuan dari pengukuran biomassa sel adalah untuk mengetahui kurva pertumbuhan dari isolat bakteri yang diperoleh

bakteri yang bermultiplikasi pada media cair SNB akan menyebabkan media menjadi keruh. Semakin keruh media maka pertumbuhan bakteri *Actinomyces* akan semakin tinggi. Aquadest digunakan sebagai larutan standar kemudian dilakukan pengujian dengan supernatan yang telah dipisahkan dengan endapan (biomassa sel) dengan pengambilan sampel selama 14 hari dari panjang gelombang maksimal 275,5 nm kemudian dari data yang diperoleh ini menjadi standar untuk pembuatan kurva pertumbuhan bakteri *Actinomyces* isolat Te.325. Penelitian yang dilakukan oleh Khoiriyah dan Ardiningsih (2014) dinyatakan bahwa hasil pengukuran isolat 16IM7 pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm berada dalam fase log dimulai pada hari ke-2 waktu inkubasi hingga hari ke-11 dan fase stasioner dimulai hari ke-14⁽¹⁹⁾. Isolat Te.325 memiliki perbedaan fase pertumbuhan karena *Actinomyces* mempunyai waktu pertumbuhan yang sangat variatif.

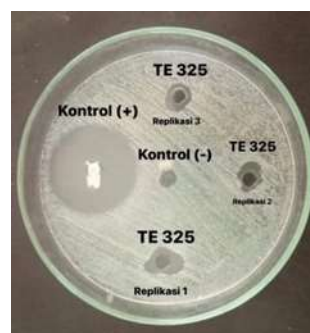


Gambar 3. Profil Pertumbuhan Bakteri Actinomyces Isolat Te.235 Berdasarkan Serapan Pada Spektrofotometri UV-VIS.

Bakteri melakukan proses adaptasi terhadap kondisi lingkungannya Pada fase lag seperti: pH, suhu, nutrisi, Peningkatan jumlah sel bakteri pada fase ini berlangsung lambat. Fase lag ini dimulai dihari ke-3. Fase log, dimana pada fase ini pertumbuhan bakteri sangat cepat dimulai pada hari ke-6. Pada fase ini bakteri memperbanyak diri, fase stasioner berada pada hari ke-9. Dimana pada fase ini tidak terjadi penambahan jumlah bakteri yang tumbuh karena bakteri yang tumbuh dan yang mati jumlahnya seimbang⁽¹⁹⁾.

Profil pertumbuhan bakteri *Actinomyces* isolat TE325 yang di uji menggunakan spektrofotometri UV-VIS sebanding dengan profil pertumbuhan bakteri *Actinomyces* isolat Te.325 yang di uji berdasarkan bobot sel. Banyaknya biomassa sel *Actinomyces* didalam larutan uji sebanding dengan besarnya absorbansi yang di peroleh. Semakin besar absorbansi larutan yang di peroleh, maka biomassa sel di dalam larutan semakin banyak, pada awal pengukuran, terbentuk daerah kurva yang konstan antara absorbansi dengan panjang gelombang. Daerah ini digunakan untuk menentukan nilai puncak panjang gelombang dari hari 1-14.

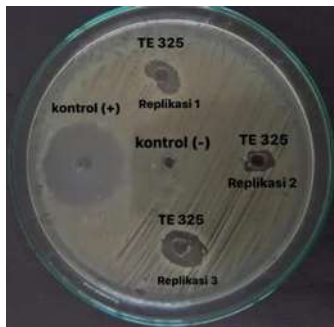
Uji Aktivitas Antibakteri. Uji antibakteri dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak etil asetat isolat Te.325 terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *E.coli*. Metode yang digunakan dalam pengujian ini, yaitu metode difusi sumuran yang direplikasi sebanyak 3 kali. Hasil pengamatan berupa diameter zona bening disekeliling sumuran. Pengukuran diameter zona hambat dapat menggunakan penggaris atau jangka sorong. Proses pembuatan suspensi bakteri terdapat dua tahap inkubasi. Inkubasi yang pertama dilakukan selama 18-24 jam tujuannya untuk mendapatkan banyak bakteri yang tumbuh, sedangkan inkubasi yang kedua dilakukan selama 3-5 jam tujuannya untuk mempertahankan bakteri pada fase log dimana pada fase log ini merupakan metabolisme yang paling aktif⁽²¹⁾. Hasil uji aktivitas Ekstrak etil asetat isolat *Actinomyces* TE325 terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* disajikan pada Gambar 4 – 5 serta Tabel 2 – 3. Berdasarkan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat isolat TE325 menunjukkan adanya daya hambat yang berbeda-beda terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *E.coli* adanya zona hambat dikedua bakteri menunjukkan bahwa isolat *Actinomyces* (isolat Te.3325) memiliki aktivitas antibakteri spektrum luas. Potensi antibakteri diperoleh dengan pengukuran diameter zona hambat dan dibagi ke dalam 4 kategori kekuatan daya hambat, yaitu sangat kuat (zona hambat > 20 mm), kuat (zona hambat 10-20 mm), sedang (zona hambat 5-10 mm) dan lemah (zona hambat < 5 mm). Berdasarkan kategori tersebut dapat dilihat bahwa ekstrak etil asetat isolat TE325 memiliki aktivitas penghambatan sedang karena memiliki kemampuan menghambat pada *S. ureus* dan *E. coli* dengan rata rata 8,04 mm dan 9,035 mm.



Gambar 4. Diameter zona hambat bakteri Staphylococcus aureus.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Hasil dari analisis KLT ekstrak etil asetat isolat *Actinomyces* (isolat Te.325) setelah dielusi dan dilihat pada sinar UV 254 dan 366 dapat dilihat pada Gambar 6.

Penapisan senyawa antibiotik dapat dilihat pada bercak yang ada pada lempeng. Hasil pada sinar UV



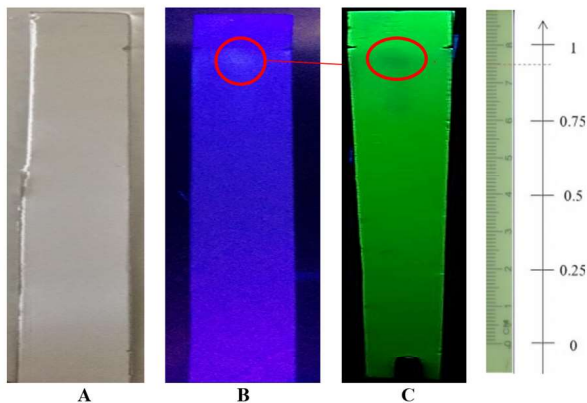
Gambar 5. Diameter zona hambat bakteri *E. coli*.

Tabel 2. Respon hambat ekstrak etil asetat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Perlakuan	Mean
Kontrol positif (Kloramfenikol)	27,06 mm
Kontrol negatif (DMSO 10%)	-
Isolat <i>Actinomyces</i> (isolat Te.325)	8,04 mm

Tabel 3. Respon hambat ekstrak etil asetat terhadap bakteri *E.coli*.

Perlakuan	Mean
Kontrol positif (Kloramfenikol)	27,06 mm
Kontrol negative (DMSO 10%)	-
Ekstrak isolat Te.325	9,035 mm



Gambar 6. Hasil KLT ekstrak isolat *Actinomyces* Te.325, A: Pengamatan Visual, B: Lampu UV 366, C: Lampu UV 254.

254 memperlihatkan satu bercak yang berfluoresensi menjadi warna hitam yang dilihat secara langsung dengan nilai Rf sebesar 0,95. Penyerapan sinar UV disebabkan karena adanya molekul kromofor yang terdiri ikatan rangkap dua atau ikatan rangkap 3 dan ikatan rangkap tersebut terkonjugasi. Hasil pada sinar UV 366 memperlihatkan satu bercak yang berfluoresensi menjadi warna pink ungu yang dilihat secara langsung dengan nilai Rf sebesar 0,95. Fluoresensi atau berpendarnya bercak pada sinar lampu UV 366 nm karena adanya interaksi lampu UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh ausokrom⁽²²⁾.

Tujuan dari penggunaan metode KLT adalah untuk penapisan senyawa antibiotik dengan meninjau bercak pada nilai Rf yang dihasilkan^(23,24). Berdasarkan hasil analisis menggunakan KLT hanya terdapat satu bercak yang diduga sebagai antibiotik. bercak yang aktif sebagai antibiotik dapat terbaca pada sinar UV 254 nm dan sinar UV 366 nm pada Rf 0,95 dari masing-masing panjang gelombang. Penelitian yang dilakukan oleh Syarifuddin et al., (2019) uji KLT biotografi ekstrak etil asetat isolat AL6 didapatkan senyawa pada nilai Rf 0,94 dengan konsentrasi 40% memiliki aktivitas antibiotik⁽²¹⁾. Isolat dan AL6 dan Te.325 merupakan isolat *Actinomyces* dari hasil isolasi rizosfer tanah tebu. Identifikasi nilai Rf isolat AL6 memiliki nilai yang hampir sama dengan isolat Te.325 maka, senyawa tersebut dapat dikatakan memiliki kemungkinan karakteristik senyawa yang sama jika ditinjau dari nilai Rf nya.

SIMPULAN

Fase pertumbuhan isolat Te.325 memasuki fase log pada hari ke-5 dan fase stasioner pada hari ke-9. Aktivitas antibiotik ekstrak etil asetat Te.325 pada bakteri *S. aureus* dan *E. coli* tergolong dalam potensi sedang.

DAFTAR PUSTAKA

- Ramadhan H. Isolasi actinomycetes penghasil antibiotik terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dari tanah sawah. In Prosiding Seminar Nasional dan Presentasi Imiah Perkembangan Terapi Obat Herbal Pada Penyakit Degeneratif. 2011;1(1):50–64.
- Wulandari W, Rahayu T. Aktivitas antibakteri isolat *Actinomyces* dari sampel pasir Gunung Merapi dengan lama fermentasi yang berbeda terhadap bakteri *Escherichia coli* multiresisten antibiotik. Bioeksperimen: Jurnal Penelitian Biologi. 2015;1(2):53–9.
- Jakubiec-Krzesniak K, Rajnisz-Mateusiak A, Guspiel A, Ziemska J, Solecka J. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. Polish Journal of Microbiology. 2018;67(3):259–72.
- Pujiati P. Isolasi actinomycetes dari tanah kebun sebagai bahan petunjuk praktikum mikrobiologi. Florea : Jurnal Biologi dan Pembelajarannya. 2018;1(2):42–6.
- Wulandari W. Aktivitas antibakteri isolat actinomycetes dari sampel pasir Gunung Merapi dan Bromo dengan lama fermentasi yang berbeda terhadap bakteri *Escherichia coli* multiresisten antibiotik. Doctoral dissertation, Universitas Muhammadiyah Surakarta. 2014.
- Harir M, Bendif H, Bellahcene M, Fortas Z, Pogni R. Streptomyces secondary metabolites. Basic biology

- and applications of actinobacteria. 2018;6:99-122.
7. Rolfe MD, Rice CJ, Lucchini S, Pin C, Thompson A, Cameron AD, Alston M, Stringer MF, Betts RP, Baranyi J, Peck MW. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of bacteriology*. 2012;194(3):686-701.
 8. Kumari M, Myagmarjav BE, Prasad B, Choudhary M. Identification and characterization of antibiotic-producing actinomycetes isolates. *American journal of Microbiology*. 2013;4(1):24.
 9. Pudi N, Varikuti GD, Badana AK, Gavara MM, Kumari S, Malla R. Studies on optimization of growth parameters for enhanced production of antibiotic alkaloids by isolated marine actinomycetes. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016;6(10):181-8.
 10. Aini NN, Sulistyani N. Isolation of actinomycetes from sugarcane (*Saccharum officinarum*) rhizosphere and the ability to produce antibiotic. In 2019 Ahmad Dahlan International Conference Series on Pharmacy and Health Science (ADICS-PHS 2019) 2019; 131-6.
 11. Ramadhani MA, Sulistyan N. Uji aktivitas isolat actinomycetes (Kode Gst, Kp, Kp11, Kp16, T24, dan T37) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. 2018;01:29–37.
 12. Syarifuddin A, Sulistyani N. Karakterisasi fraksi teraktif senyawa antibiotik isolat kp 13 dengan metode densitometri dan KLT-semprot. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*. 2019;4(1):156-66.
 13. Mulyadi M, Sulistyani N. Aktivitas cairan kultur 12 isolat actinomycetes terhadap bakteri resisten. *Kes Mas: Jurnal Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Ahmad Dahlan*. 2013;7(2):89–96.
 14. Syarifuddin A, Sulistyani N, Kintoko K. Activity of antibiotic bacterial isolate kp13 and cell leakage analysis of *Escherichia coli* bacteria. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2018;16(2):137-44.
 15. Syarifuddin A, Sulistyani N, Kintoko. Profil KLT-bioautografi dan densitometri fraksi teraktif (isolate kp13) dari bakteri rizosfer kayu putih (*Melaleuca leucadendron* L.). *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis*. 2019;5(1):27–33.
 16. Dahlan A, Wahyuni S, Ansharullah. Morfologi dan karakterisasi pertumbuhan bakteri asam laktat (um 1.3a) dari proses fermentasi wikau maombo untuk studi awal produksi enzim amilase. *Jurnal Sains dan Teknologi Pangan*. 2017;2(4):657–63.
 17. Setiawati S, Yusan RT. Actinomycetes as A source of potential antimicrobial and antibiofilm agents. *Medical and Health Journal*. 2022;2(1):50-70.
 18. Warsi W, Sulistyani N. The optimization of secondary metabolite production time and screening antibacterial activity of actinomycetes isolate from tin plant rizosfer (*Ficus carica*). *Jurnal Teknologi Laboratorium*. 2018;7(1):15.
 19. Khoiriyah H, Ardiningsih P. Penentuan waktu inkubasi optimum terhadap aktivitas bakteriosin *Lactobacillus sp.* RED4. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 2014;3(4):52-6.
 20. Fitriana, Rusli. Penentuan waktu optimum produksi metabolit sekunder isolat bakteri actinomycetes dari tanah rizosfer akar tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) terhadap bakteri patogen. *As-Syifaa*. 2018;10(1):74–82.
 21. Syarifuddin A, Kamal S, Yuliasuti F, Pradani MPK, Septianingrum NMAN. Ekstraksi dan identifikasi metabolit sekunder dari isolat al6 serta potensinya sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia*. 2019;6(2):210-8.
 22. Nuthan BR, Rakshith D, Marulasiddaswamy KM, Rao HY, Ramesha KP, Mohana NC, Siddappa S, Darshan D, Kumara KK, Satish S. Application of optimized and validated agar overlay TLC–bioautography assay for detecting the antimicrobial metabolites of pharmaceutical interest. *Journal of chromatographic science*. 2020;58(8):737-46.
 23. Setyaningsih D, Murti YB, Fudholi A, Hinrichs WL, Mudjahid R, Martono S, Hertiani T. Validated TLC method for determination of curcumin concentrations in dissolution samples containing *Curcuma longa* extract. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2017;14(2):147-57.
 24. Cita YP; Radjasa OK; Sudharmono P. Aktivitas Antibakteri isolat bakteri X2 yang berasosiasi spon *Xestospongia testudinaria* dari Pantai Pasir Putih Situbondo terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2017;14(2):206-11.