



**Aktivitas Isolat Actinomycetes dari Rumput Laut
(*Eucheuma cottonii*) sebagai Penghasil Antibiotik terhadap
Staphylococcus aureus dan *Escherichia coli***

**(Activity of Actinomycetes Isolate from Seeweed
(*Eucheuma cottonii*) as Antibiotic Producer against
Staphylococcus aureus and *Escherichia coli*)**

NANIK SULISTYANI*, ACHMAD NURYADIN AKBAR

Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan
Kampus III: Jl. Prof. Dr. Soepomo Janturan Umbulharjo Yogyakarta 55164,

Diterima 27 Desember 2012 , Disetujui 22 September 2013

Abstrak: Actinomycetes merupakan kelompok mikrob yang paling banyak menghasilkan senyawa bioaktif sebagai antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi Actinomycetes dari rumput laut *Eucheuma cottonii* dan mengidentifikasi aktivitas Actinomycetes hasil isolasi sebagai penghasil antibiotik terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Selanjutnya, penelitian ini bertujuan mengetahui bercak kromatografi lapis tipis (KLT) yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S.aureus* dan *E. coli*. Isolasi Actinomycetes dari *E.cottonii* dilakukan dengan metode cawan sebar. Uji aktivitas isolat Actinomycetes sebagai penghasil antibiotik terhadap *S.aureus* dan *E.coli* dilakukan dengan metode sumuran.KLT bioautografi dilakukan dengan silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (2:3). Hasil menunjukkan bahwa isolat RL 6 dan RL 12 menghasilkan antibiotik terhadap *S.aureus* dan *E.coli*. Hasil KLT bioautografi ekstrak etil asetat dari kultur RL 6 dan RL12 terhadap *S.aureus* dan *E.coli* menunjukkan zona hambat masing-masing pada Rf 0,05 dan 0,22.

Kata kunci: Actinomycetes, kromatografi lapis tipis, bioautografi, *Euchemia cottonii*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Abstract: Actinomycetes are microbial group of the most widely produced bioactive compound as antibiotics. This study was intended to isolate Actinomycetes from seaweed *Eucheuma cottonii* and to identify the activity of isolated Actinomycetes as antibiotic producer against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Furthermore, the research was aimed to know the spots on thin-layer chromatography (TLC) which has antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli*. Isolation of Actinomycetes from *E. cottonii* was carried out with a spread plate method. The activity test of Actinomycetes as antibiotic producer against *S. aureus* and *E. coli* was performed by cup plate method. TLC bioautography was done with stationary phase of silica gel GF₂₅₄ and mobile phase of *n*-hexane : ethylacetate (2:3). The results showed that RL 6 and RL 12 isolate produced antibiotic against *S. aureus* and *E. coli*. The TLC bioautography result of ethyl acetate extracts of RL 6 and RL 12 cultures against *S. aureus* and *E. coli* showed a inhibition zone at Rf 0.05 and 0.22, respectively.

Keywords: Actinomycetes, kromatografi lapis tipis, bioautografi, *Euchemia cottonii*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

* Penulis korespondensi, Tlp. (0274) 563515 ext. 3107
e-mail: naniksulistyani@gmail.com



PENDAHULUAN

INDONESIA mempunyai keragaman hayati khususnya perairan yang sangat besar, termasuk di dalamnya mikrob, tanaman maupun hewan. Kondisi wilayah Indonesia yang berbentuk kepulauan, maritim dan iklim tropis yang mendukung, menjadikan Indonesia kaya akan keragaman hayati. Dua pertiga wilayah Indonesia merupakan daerah perairan⁽¹⁾.

Menurut Kelecom⁽²⁾ biodiversitas mikrob laut jauh lebih besar dibandingkan dengan teritorial. Hal yang sama dikatakan oleh Das *et al.* bahwa populasi mikrob laut sangat bervariasi⁽³⁾. Mikrob yang hidup di permukaan air laut, di dasar laut dalam, tanaman laut, batu karang dasar laut dan sedimen atau batu karang memiliki karakteristik yang bervariasi. Hal ini akan berpengaruh terhadap keragaman metabolit sekunder yang dihasilkan. Dengan demikian, peluang untuk mendapatkan mikrob potensial yang mampu menghasilkan metabolit sekunder masih sangat besar.

Penyakit akibat infeksi merupakan salah satu masalah dalam bidang kesehatan yang terus berkembang. Infeksi dapat ditularkan dari satu orang ke orang lain, dari hewan ke manusia. Beberapa mikroorganisme penyebab infeksi diantaranya bakteri, virus, jamur dan protozoa. Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*⁽⁴⁾.

Banyak bakteri yang mengalami resistensi terhadap antibiotik. Resistensi bakteri terhadap antibiotik merupakan masalah kesehatan masyarakat di seluruh dunia yang terus berkembang. Salah satu penyebab resistensi bakteri dalam tubuh manusia adalah karena penyalahgunaan antibiotik⁽⁴⁾. Banyaknya kejadian resistensi mendorong dilakukannya eksplorasi antibiotik baru sebagai upaya mengatasi masalah resistensi ini. Salah satu sumber utama penghasil antibiotik adalah Actinomycetes. Actinomycetes diisolasi dari berbagai sumber, salah satunya adalah sumber kelautan.

Beberapa penelitian yang dilakukan untuk memperoleh isolat aktif Actinomyces yang berasal dari laut diantaranya dilakukan oleh Rante yang telah menemukan isolat aktif Actinomycetes dari spons laut⁽⁵⁾. Isolat Actinomycetes yang termasuk *Streptomyces* sp. yang menghasilkan metabolit sekunder dan aktif terhadap bakteri *S.aureus* resisten antibiotik. Hong *et al.* telah menemukan isolat aktif Actinomycetes yang diisolasi dari mangrove dan bersifat menghambat berbagai macam bakteri, baik bakteri Gram positif maupun Gram negatif⁽⁶⁾.

Penelitian mengenai isolasi Actinomycetes penhasil antibiotik dari rumput laut belum banyak dilakukan. Selama ini eksplorasi Actinomycetes

di Indonesia masih sebatas Actinomycetes tanah dan sedimen laut. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan penapisan Actinomycetes laut penghasil antimikrob⁽¹⁾. Di Jepang, penelitian tentang isolasi Actinomycetes juga dilakukan. Isolasi dari rumput laut *Undaria pinnatifida* dihasilkan 87 isolat Actinomycetes yang salah satunya mampu menghasilkan antibiotik benzaldehid⁽⁷⁾.

Rumput laut yang berpotensi sebagai sumber Actinomycetes adalah *Eucheuma cottonii*. Rumput laut jenis *E. cottonii* merupakan salah satu rumput laut dari jenis alga merah (Rhodophyta). *E. cottonii* memiliki berbagai aktivitas biologi⁽⁸⁾. Lebih dari 20 kategori senyawa bioaktif dan nutrisi yang berbeda-beda telah ditemukan di dalam *E. cottonii*, seperti antivirus, antibiotik, antiinflamasi, antileukimia, insektisidal, sitotoksin, antihelmentik dan antikanker⁽⁸⁾. Senyawa dan nutrisi ini dimanfaatkan oleh mikrob yang hidup di sekitar rumput laut *E. cottonii* dan menghasilkan beberapa senyawa aktif seperti antibiotik.

Beberapa mikrob memiliki senyawa aktif untuk menghambat mikrob lain yang disebut antibiotik. Salah satu mikroorganisme tersebut adalah Actinomycetes. Actinomycetes merupakan kelompok mikrob yang paling banyak menghasilkan senyawa bioaktif antibiotika (70%), antifungi (20%) dan antibakteri (10%)⁽⁵⁾.

Rumput laut *E. cottonii* dari pantai Bangsal, Lombok, Nusa Tenggara Barat belum pernah diteliti dan dikembangkan selain untuk pertanian. Dengan keadaan pantai terlindung dari ombak yang kuat, tempat dan lingkungan perairan tidak mengalami pencemaran, arus laut yang relatif lambat, jauh dari muara sungai, perairan tidak mengandung lumpur dan airnya jernih sehingga rumput laut *E. cottonii* dapat tumbuh dengan subur sehingga memungkinkan Actinomycetes dapat hidup dengan baik. Berdasarkan latar belakang di atas, maka dilakukan penelitian eksplorasi untuk mendapatkan isolat Actinomycetes berasal dari rumput laut *E.cottonii* dari pantai Bangsal, Lombok, Nusa Tenggara Barat untuk mendapatkan antibiotik baru.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Media *Starch Nitrate Agar* (SNA), media *Starch Nitrate Broth* (SNB), media Mueller Hinton (MH), NaCl 0,9%, nistatin, BHI, standar Mc Farland (10^8 CFU/mL), gliserin 15% v/v, silika gel GF₂₅₄-n-heksan, etil asetat. Pelarut yang digunakan adalah air suling steril. Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* 25922.

Alat. Inkubator, autoklaf, mikropipet (Gilson),

oven, *shaker* (Heidolph) DUOMAX 2030, *encase* dan peralatan gelas yang umum digunakan di Laboratorium Mikrobiologi.

METODE. Pengambilan Sampel Rumput Laut *E. cottonii*. Sampel rumput laut berasal dari Pantai Bangsal, Lombok, Nusa Tenggara Barat. Sampel rumput laut *E. cottonii* dimasukkan ke dalam kantong plastik steril yang berisi air laut. Selanjutnya sampel disimpan dalam lemari es sampai perlakuan selanjutnya⁽⁹⁾.

Isolasi Actinomycetes yang Berasosiasi pada Rumput Laut *E. cottonii*. Sampel yang sudah siap ditimbang sebanyak 500 mg sebanyak tiga kali (sebagai replikasi dua kali), kemudian sampel dicuci menggunakan air laut steril sebanyak 100 sampai dengan 300 mL dan diulangi sebanyak tiga kali pencucian. Setelah dicuci, sampel rumput laut kemudian dipotong-potong menggunakan gunting steril dan pemotongan sampel ini dilakukan di dalam *incase*. Setelah sampel terpotong dimasukkan ke dalam mortir kecil untuk dilakukan panghalusan. Setelah sampel halus, sampel kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah steril dan ditambah dengan air laut steril sebanyak 4,5 mL. Setelah air laut steril masuk ke dalam tabung reaksi, kemudian tabung reaksi digojog kuat-kuat selama 2 sampai 5 menit, hal ini bertujuan untuk melepaskan Actinomycetes yang melekat di sampel rumput laut *E. cottonii*. Kemudian dilakukan replikasi sebanyak dua kali.

Ketiga tabung reaksi yang sudah berisi sampel tersebut, kemudian dipanaskan sampai suhu 68 °C selama 10 menit. Pemanasan ini dimaksudkan untuk mengurangi kontaminan yang ada dalam larutan sampel karena diharapkan bakteri lain selain Actinomycetes akan mati dan Actinomycetes akan tetap bertahan hidup, karena Actinomycetes mampu bertahan hidup sampai dengan suhu 68 °C. Kemudian diambil 5 tabung reaksi steril, masing-masing diisi dengan 4,5 mL air laut steril dengan pipet steril. Dimasukkan 0,5 mL suspensi dari pengenceran 10^{-1} ke salah satu tabung reaksi yang berisi 4,5 mL air laut steril, dan dikocok secara merata, suspensi ini mempunyai tingkat pengenceran 10^{-2} . Dengan cara yang sama, dibuat suspensi dengan tingkat pengenceran 10^{-3} , 10^{-4} dan 10^{-5} .

Inokulasi dan Inkubasi Actinomycetes. Sebanyak 100 µL dari tiap-tiap pengenceran dipanaskan 50 °C selama 10 menit. Kemudian setelah didinginkan, disebar menggunakan Ose pada media padat SNA yang komposisinya terdiri dari *soluble starch* 20 g, KNO_3 1 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, NaCl 0,5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, agar 20 g dalam 1 L pelarut (air suling : air laut = 1 : 3). Ke dalam media ini ditambahkan nistatin 50 µg/

mL⁽¹⁰⁾. Selanjutnya kultur diinkubasi pada suhu 28 °C selama ± 30 hari.

Identifikasi Isolat Actinomycetes. Koloni bakteri yang diduga sebagai Actinomycetes diidentifikasi dengan pengamatan morfologi hifa dan spora dengan pewarnaan langsung, bentuk koloni, bentuk tepian, elevasi, warna dan permukaan koloni.

Pemurnian Isolat Actinomycetes. Koloni bakteri yang dicurigai sebagai Actinomycetes dan berbeda satu sama lain, dipisahkan dan ditanam kembali dengan cara diambil 1 Ose isolat bakteri dan digoreskan pada media padat SNA dalam cawan Petri, kemudian diinkubasi pada suhu 28 °C selama ± 10 hari. Setelah itu diamati warna miselium udara, miselium vegetatif dan warna pigmen yang terbentuk terdifusi ke dalam media atau tidak.

Pengecatan Gram. Pengujian pewarnaan Gram dilakukan dengan cara kultur bakteri yang dicurigai sebagai Actinomycetes dioleskan pada gelas objek dengan jarum Ose dan difiksasi panas, kemudian ditetesi dengan kristal violet, dibiarkan selama ± 1 menit. Preparat selanjutnya dibilas dengan air suling dan dikering-udarkan. Preparat yang sudah kering ditetesi dengan larutan lugol iodine dan didiamkan selama ± 1 menit, kemudian dibilas kembali dengan air suling dan preparat selanjutnya ditetesi dengan alkohol 95% sebagai bahan pemucat selama ± 5 detik, dibilas kembali dengan air suling dan dikering-udarkan. Pewarnaan terakhir menggunakan safranin selama ± 30 detik dan dibilas kembali dengan air suling, lalu preparat dikering-udarkan. Bakteri yang telah diwarnai diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat. Bakteri dikelompokkan menjadi bakteri Gram positif, bila dapat mempertahankan zat warna ungu kristal dan tampak berwarna ungu tua. Kelompok bakteri Gram negatif akan terlihat berwarna merah^(4,11).

Pembuatan Kultur Starter. Sebanyak 2 *plug* isolat dimasukkan ke dalam 50 mL media SNB dan diinkubasi di suhu kamar selama 10 hari dengan penggojogan.

Inokulasi bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. 1 Ose bakteri diambil dan ditambah 1 mL BHI, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. 100 µL kultur diambil dan dimasukkan ke dalam tabung, kemudian ditambahkan 1 mL BHI, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3-5 jam. Selanjutnya diencerkan dengan NaCl 0,9% sampai kekeruhan bakteri sama dengan standar Mc Farland 10^8 CFU/mL.

Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Sumuran. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditanami (diusap dengan kapas steril) dengan *S. aureus* dan *E. coli* 10^8 CFU/mL, lalu dibuat sumuran dengan diameter 6 mm. Sumuran diberi 25 µL cairan kultur



(CK), kemudian disimpan pada lemari es selama 2 jam. Setelah itu, diinkubasi 18-24 jam suhu 37 °C dan diukur diameter zona hambat yang terbentuk⁽¹²⁾.

Optimasi Pelarut. Cairan kultur diambil 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Hal ini dilakukan sebanyak 3 kali. Selanjutnya setiap tabung diekstraksi menggunakan pelarut yang berbeda. Tabung 1 menggunakan etil asetat, tabung 2 menggunakan kloroform dan tabung 3 menggunakan *n*-heksan. Setelah itu, hasil ekstraksi diteteskan ke dalam *paper disc* sebanyak 100 µl kemudian ditanam di media Mueller Hinton yang sudah ditanami dengan bakteri, kemudian diinkubasi selama 17-24 jam dengan suhu 37 °C. Pelarut digunakan sebagai kontrol negatif.

Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder. Setelah fermentasi selama 11 hari, media pertumbuhan mikrob disaring untuk memisahkan biomassa dan cairan fermentasi. Cairan fermentasi disaring menggunakan kertas saring. Supernatan yang diperoleh diekstraksi 2 kali dengan pelarut etil asetat (1:1 v/v) dalam corong pisah dan dibiarkan selama 20 menit. Ekstrak yang diperoleh diuapkan hingga diperoleh ekstrak kering dan ditimbang, kemudian ekstrak kering tersebut dilarutkan kembali dengan etil asetat dan dimasukkan ke dalam tabung mikro (Eppendorf), lalu disimpan di dalam lemari es bersuhu 4 °C untuk diuji lebih lanjut.

Kromatografi Lapis Tipis. Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan meneteskan ekstrak pada pelat KLT dengan bantuan pipa kapiler, selanjutnya dielusi dengan larutan pengembang di dalam wadah tertutup rapat. Fase diam yang digunakan adalah silica gel GF₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksan : etil asetat (2:3). Setelah dielusi, plat kromatogram dikeringkan. Untuk melihat pola pemisahannya, kromatogram tersebut dideteksi dengan melihat langsung pola kromatogram (dibantu dengan penyemprotan pereaksi anisaldehyd asam sulfat), lampu UV 254 dan 366 nm, kemudian ditentukan nilai Rfnya⁽¹³⁾.

Analisis Bioautografi. Fraksi aktif dengan konsentrasi 1% ditotolkan pada plat silika gel GF₂₅₄ kemudian dikembangkan dengan fase gerak yang sesuai untuk pemisahan senyawa-senyawa yang terdapat dalam fraksi, dalam penelitian ini digunakan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (2:3). Kromatogram diletakkan dalam cawan Petri yang telah berisi biakan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Bercak-bercak pada kromatogram dijiplak ke cawan Petri, plat kromatogram dibiarkan menempel pada medium agar selama 30 menit. Setelah 30 menit, plat kromatogram diangkat dengan hati-hati, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah 24 jam diinkubasi, dilakukan pengamatan dengan melihat zona hambat

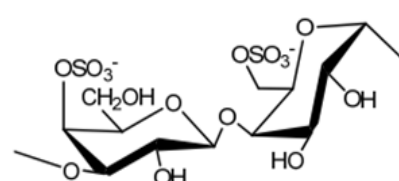
yang terbentuk sebagai daerah terang yang tidak ditumbuhi bakteri⁽¹⁴⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah rumput laut *E. cottonii*. Rumput laut tersebut diperoleh dari penangkaran rumput laut di Pantai Bangsal, Lombok, Nusa Tenggara Barat pada bulan Februari 2012. Sampel rumput laut diambil dari ke dalaman 175 cm dari permukaan air laut. Sampel rumput laut diambil dari tiga titik yang berbeda, dengan masing-masing jarak terpaut 100 meter.

Rumput laut jenis *E. cottonii* merupakan salah satu rumput laut dari jenis alga merah (Rhodophyta). Rumput laut jenis ini memiliki talus yang licin dan silindris, berwarna hijau, hijau kuning, abu-abu dan merah. Umumnya *E. cottonii* tumbuh dengan baik di daerah pantai terumbu (*reef*). Habitat khasnya adalah daerah yang memperoleh aliran air laut yang tetap, variasi suhu harian yang kecil dan substrat batu karang mati.

Selain itu di dalam rumput laut *E. cottonii* juga mengandung banyak nutrisi yang bisa digunakan sebagai sumber hidup bagi mikroorganisme yang ada di laut seperti Actinomycetes. Contoh dari nutrisi tersebut adalah *carrageenan* yang merupakan senyawa polisakarida yang memiliki senyawa sulfat di strukturnya⁽⁸⁾. Struktur *carrageenan* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur *carrageenan*⁽⁸⁾.

Carrageenan adalah senyawa polisakarida⁽⁸⁾. Polisakarida merupakan gula, yang sangat diperlukan bagi kelangsungan hidup Actinomycetes, sebagai sumber karbon dan sumber energi. Selain kandungan *carrageenan*, *E. cottonii* juga kaya akan protein⁽¹⁵⁾. Actinomycetes memerlukan protein yang berguna untuk pembentukan enzim, sintesis DNA dan RNA. Selain itu juga memerlukan unsur-unsur logam seperti Na, Ca, Mg, K, Fe, Zn⁽¹⁵⁾ yang berguna sebagai aktivator enzim. Enzim yang telah ada tidak dapat langsung bekerja. Untuk dapat bekerja, enzim-enzim memerlukan aktivator, sehingga Actinomycetes sangat memerlukan ion-ion logam tersebut.

Inkubasi pada proses isolasi Actinomycetes dilakukan pada suhu kamar, yaitu sekitar 28 °C. Ini





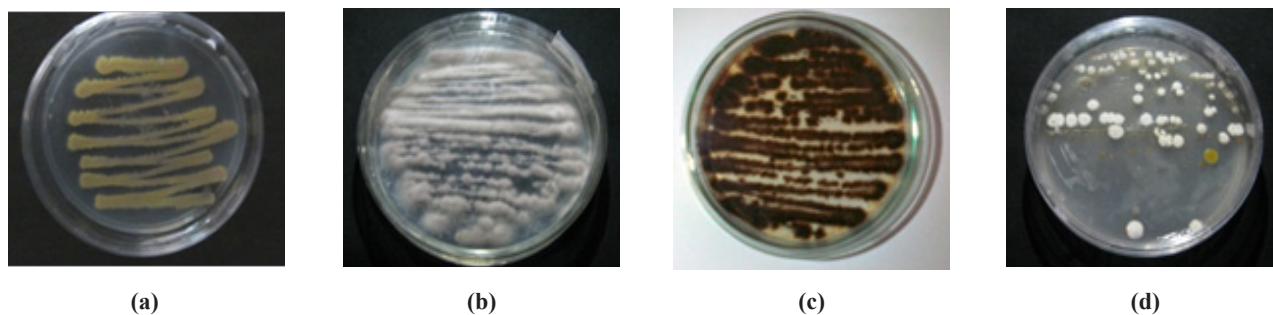
bertujuan untuk menyamakan kondisi isolasi dengan kondisi lingkungan asli dari Actinomycetes. Koloni Actinomycetes muncul perlahan, menunjukkan konsistensi berbutuk dan melekat erat pada permukaan agar.

Berdasarkan hasil pengamatan, koloni isolat Actinomycetes yang muncul memperlihatkan bentuk pada umumnya yaitu bulat dengan elevasi timbul dan cembung, tepian rata dan tidak beraturan serta permukaan yang licin dan kasar atau keriput. Menurut Alexander, permukaan bertepung merupakan kumpulan hifa yang terdiri dari banyak spora⁽¹⁶⁾. Morfologi ini terjadi pada koloni Actinomycetes dewasa sedangkan koloni yang masih muda hanya terdiri dari hifa. Koloni Actinomycetes yang masih muda tampak seperti bakteri pada umumnya yaitu permukaan bulat, cembung dan licin serta melekat kuat pada media agar. Setelah 1 bulan, mulai muncul ciri-ciri Actinomycetes, yaitu terlihat beberapa koloni yang permukaannya sudah kering, maka dilanjutkan dengan isolasi koloni yang diduga sebagai Actinomycetes.

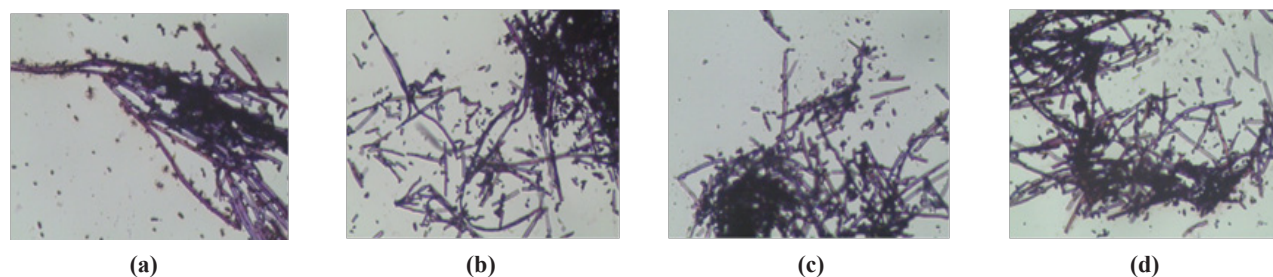
Dari penelitian ini diperoleh 12 isolat Actinomycetes. Namun yang berhasil ditumbuhkan kembali hanya 4 isolat, yaitu RL 6, RL 8, RL 11 dan RL 12. Hasil isolasi dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan hasil pewarnaan Gram, isolat Actinomycetes mempunyai morfologi sel batang dan warna ungu (Gram positif) yang merupakan ciri-ciri dari Actinomycetes. Foto hasil pewarnaan Gram disajikan pada Gambar 3.

Produksi senyawa metabolit dari Actinomycetes dapat dilakukan pada media produksi padat dan cair. Senyawa metabolit yang dihasilkan oleh Actinomycetes akan berdifusi ke dalam media produksi selama waktu inkubasi 7-14 hari. Pada penelitian ini media yang digunakan adalah media SNB. Komposisi dari media ini sama seperti media SNA kecuali agar, karena media yang akan dibuat dalam bentuk cair sehingga tidak perlu ditambah agar sebagai pematat, dan pelarut yang digunakan adalah campuran antara air laut dengan air suling dengan perbandingan 2 : 1. Fermentasi dilakukan dalam media SNB dan diinkubasi pada suhu 28°C dan di goyang dengan *shaker* pada laju 48 goyangan per menit selama 11 hari. Pada medium cair yang digoyang, koloni Actinomycetes tumbuh dengan tipe miselium yang berbentuk butiran atau gumpalan dan pada penelitian ini miselium yang terbentuk juga berupa butiran dan gumpalan yang berwarna putih agak keabuan⁽¹⁾.

Uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini dilakukan dengan metode sumuran pada media MH, sumuran tersebut dibuat menggunakan *cork borer* dengan diameter 6 mm. kemudian sumuran diberi 25 µl cairan fermentasi isolat Actinomycetes RL 6, RL 8, RL 11, RL 12. Setelah itu cawan Petri dimasukkan ke dalam lemari es dengan suhu 5 °C selama dua jam. Hal ini dilakukan agar cairan fermentasi tersebut berdifusi ke dalam media agar uji. Selanjutnya diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37 °C. Hasil uji aktivitas dapat dilihat pada Tabel 1, Gambar 4 dan Gambar 5.

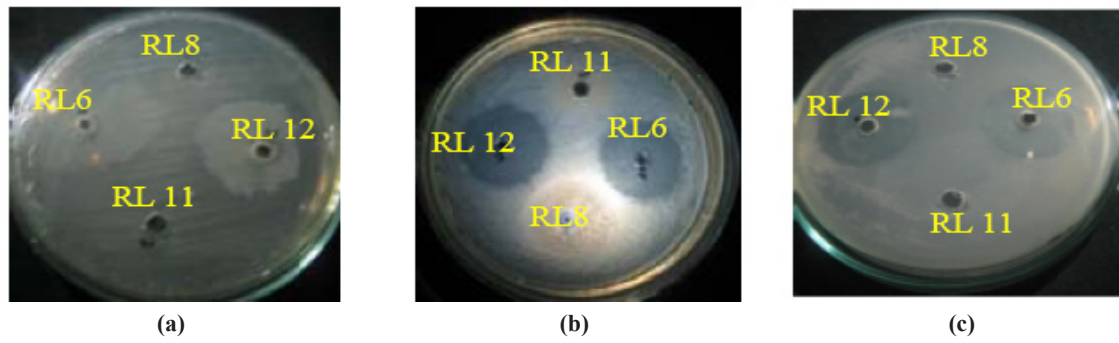
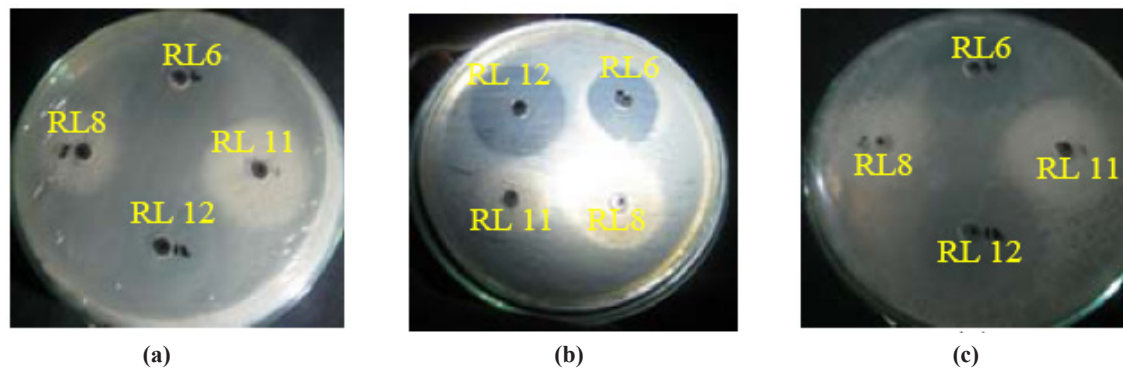


Gambar 2. Hasil purifikasi isolat Actinomycetes, (a) RL 6, (b) RL 8, (c) RL 11, (d) RL 12.



Gambar 3. Hasil pewarnaan Gram isolat Actinomycetes, (a) RL 6, (b) RL 8, (c) RL 11, (d) RL 12.



Gambar 4. Hasil uji aktivitas cairan kultur dengan umur (a) 3hari, (b) 5 hari, (c) pada bakteri *E. coli*.Gambar 5. Hasil uji aktivitas cairan kultur dengan umur (a) 3 hari, (b) 5 hari, (c) pada bakteri *S. aureus*.Tabel 1. Hasil uji aktivitas antimikrob isolat Actinomycetes terhadap *E. coli* dan *S. aureus*.

Hari ke-	Diameter zona hambat (mm)							
	<i>S. aureus</i>				<i>E. coli</i>			
	RL 6	RL 8	RL 11	RL 12	RL 6	RL 8	RL 11	RL 12
3	-	-	-	-	-	-	-	-
5	26	-	-	32	27	-	-	30
10	30	-	-	34	29	-	-	31

Keterangan: Diameter yang diukur termasuk dengan diameter sumuran 6 mm.

Tabel 2. Hasil optimasi pelarut.

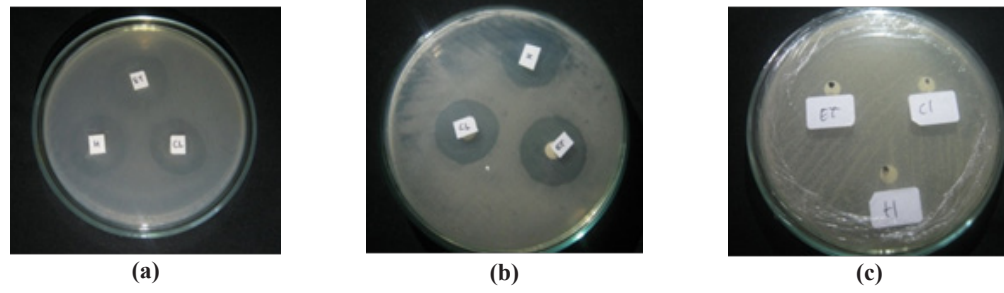
Kode isolat	Pelarut	Diameter zona hambat (mm)
RL 6	etil asetat	26
	<i>n</i> -heksan	23
	kloroform	23,5
RL 12	etil asetat	26,5
	<i>n</i> -heksan	24
	kloroform	25

Setelah uji aktivitas cairan kultur atau cairan fermentasi dilakukan, maka dilanjutkan dengan tahap berikutnya yaitu optimasi pelarut. Optimasi pelarut dilakukan untuk mengetahui pada pelarut yang sesuai untuk mengambil metabolit sekunder dari cairan kultur dengan jumlah yang banyak. Dari hasil optimasi

pelarut, jika dilihat dari data pada Tabel 2 dan Gambar 6, pelarut etil asetat mampu mengambil metabolit sekunder dengan jumlah paling banyak dari cairan kultur. Sehingga pada penelitian ini digunakan pelarut etil asetat untuk mengekstraksi senyawa metabolit sekunder pada cairan kultur.

Proses ekstraksi pada penelitian ini dilakukan pada hari ke-11 dengan cara ekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan hingga diperoleh ekstrak kering dan ditimbang sehingga bobot rendemen yang diperoleh yaitu pada RL 6 sebesar 7,5 mg/20 mL dan RL 12 sebesar 6,3 mg/20 mL, kemudian dikonversikan menjadi 37,5 mg/100 mL dan 31,5 mg/100 mL atau 0,038 % b/v dan 0,032 % b/v. Selanjutnya ekstrak kering tersebut dilarutkan kembali dengan etil asetat dan dimasukkan dalam tabung mikro (Eppendorf), lalu disimpan di dalam lemari es bersuhu 4 °C untuk diuji lebih lanjut.

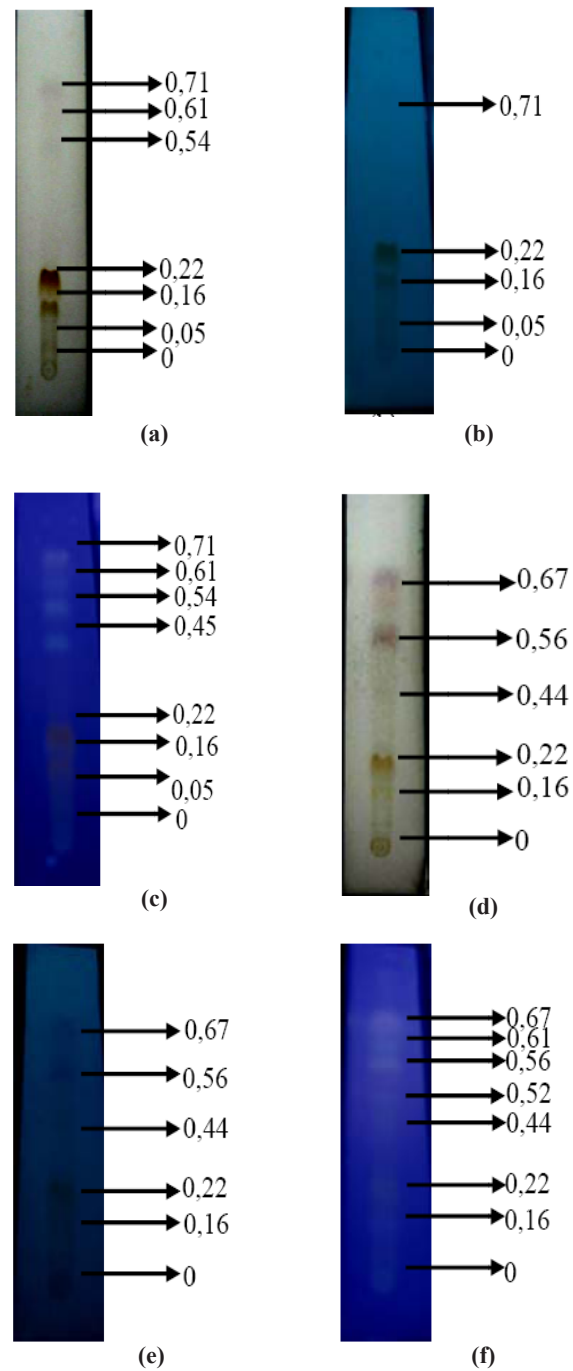




Gambar 6. Hasil optimasi pelarut (a) RL 6, (b) RL 12, (c) kontrol pelarut.

Tabel 3. Hasil pengamatan warna pada lempeng KLT.

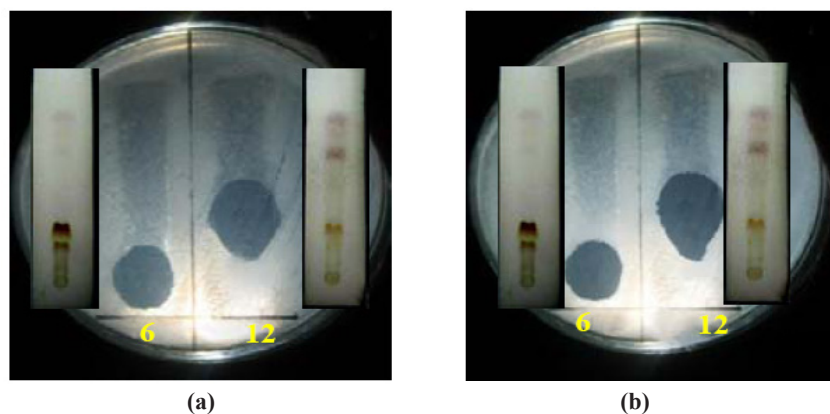
Kode isolat	Pengamatan	Rf	Warna bercak	
RL 6	Visibel	0,00	coklat	
		0,05	coklat	
		0,16	coklat	
		0,22	coklat	
		0,54	ungu	
		0,61	ungu	
		0,71	ungu	
	UV 254 nm	0,00	coklat	
		0,16	coklat	
		0,22	coklat	
		0,71	ungu	
		UV 366 nm	0,00	biru terang
			0,16	merah
			0,22	merah
0,45	biru terang			
0,54	biru terang			
0,61	biru terang			
0,71	biru terang			
RL 12	Visibel	0,00	kuning kecoklatan	
		0,16	kuning tipis	
		0,22	kuning kecoklatan	
		0,44	kuning tipis	
		0,56	ungu	
		0,67	ungu	
		UV 254 nm	0,00	kuning
	0,16		kuning	
	0,22		kuning	
	0,44		kuning tipis	
	0,56		ungu	
	0,67		ungu	
	UV 366 nm		0,00	biru terang
		0,16	biru kemerahan	
0,22		biru		
0,44		biru		
0,52		biru		
0,56		biru terang		
0,61		biru terang		
0,67	biru terang			



Gambar 7. Hasil kromatografi lapis tipis: (a), (b), (c): RL 6; (d), (e), (f): RL 12; (a), (d): secara visibel; (b), (e): UV 254 nm; (c), (f): UV 366 nm.

Pada kromatografi lapis tipis fase diam yang digunakan pada penelitian ini adalah silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksan : etil asetat (2:3), sedangkan volume ekstrak etil asetat isolat





Gambar 8. Hasil KLT bioautografi (a) pada bakteri *E. coli*, (b) pada bakteri *S. aureus*. Bercak aktif RL 6 pada Rf 0,05 dan bercak aktif RL 12 pada Rf 0,22.

Actinomycetes yang ditotolkan pada silika gel GF₂₅₄ adalah 100 µL. Untuk melihat pola pemisahannya, kromatogram tersebut dideteksi dengan deteksi visibel (dengan mata langsung), lampu UV 254 nm dan 366 nm. Untuk membantu penglihatan dengan visibel, maka lempeng silika gel GF₂₅₄ disemprot menggunakan anisaldehyd asam sulfat, kemudian setelah disemprot dipanaskan di dalam oven dengan suhu 105 °C selama 5 menit. Hasil pengamatan kromatogram KLT disajikan pada Gambar 7 dan Tabel 3.

Bercak aktif yang terdapat pada kromatogram KLT dideteksi secara bioautografi di atas media Mueller Hinton yang telah ditanami bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Plat KLT ditanam selama 30 menit, bertujuan agar senyawa aktif yang terdapat pada plat KLT mampu berdifusi pada agar. Hasil pengujian KLT Bioautografi RL 6 menunjukkan bahwa Rf 0,05 memiliki aktivitas sebagai antibakteri, dan hasil pengujian KLT Bioautografi RL 12 menunjukkan bahwa Rf 0,22 memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Foto hasil uji bioautografi disajikan pada Gambar 8.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa isolat Actinomycetes RL 8 dan RL 11 tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E. coli* dan *S. aureus*, sedangkan RL 6 dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan diameter zona hambat sebesar 30 mm dan *E. coli* sebesar 29 mm. Adapun RL 12 menghasilkan diameter zona hambat pada *S. aureus* sebesar 34 mm dan *E. coli* sebesar 31 mm. Diameter penghambatan dari isolat RL 6 dan RL 12 dikategorikan sangat kuat. Hasil KLT ekstrak etil asetat cairan kultur isolat Actinomycetes RL 6 pada fase diam silika GF₂₅₄ dan fase gerak *n*-heksan : etil asetat (2:3) menghasilkan 7 bercak dengan Rf

0,16; 0,22; 0,45; 0,54; 0,61; dan 0,71. Adapun pada RL 12 menghasilkan 8 bercak dengan Rf 0,16; 0,22; 0,44; 0,52; 0,56; 0,61; dan 0,67. Hasil bioautografi menunjukkan adanya aktivitas antibakteri RL 6 pada Rf 0,05 dan RL 12 pada Rf 0,22.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sunaryanto R, Marwoto B, Matsuo Y. Isolasi Actinomycetes laut penghasil metabolit sekunder yang aktif terhadap sel kanker A549. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 2010. 5(2):111-116.
2. Kelecom A. Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2002.74(1): 151–170.
3. Das S, Lyla PS, Khan SA. Marine microbial diversity and ecology: Importance and future perspectives. [Research Report]. India: Annamalai University. 2006.
4. Pratiwi ST. Mikrobiologi farmasi. Fakultas Farmasi UGM. Yogyakarta: Penerbit Erlangga. 2008. 17-18, 165-175.
5. Rante H, Wahyono, Murti YB, Alam G, Purifikasi dan karakterisasi senyawa antibakteri dari Actinomycetes asosiasi spons terhadap bakteri patogen resisten. *Majalah Farmasi Indonesia*. 2010. 21(3):158 – 165.
6. Hong K, Gao AH, Xie QY, Gao H, Zhuang L, Lin HP, et al. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar. Drugs*. 2009. 7:24-44.
7. Cho JY, Kim MS. Antibacterial benzaldehydes produced by seaweed-derived *Streptomyces atroviens* Pk288-21, *Fish Sci*. 2012. 78:1065-1073.
8. Jiao G, Junzeng GY, Zhang, Ewart HS. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs*. 2011. 9:196-223.
9. Nofiani R, Nurbetty S, Sapar A. Aktifitas antimikrob ekstrak metanol bakteri berasosiasi spons dari Pulau Lemukutan Kalimantan Barat. *Ilmu dan Teknologi*. 2009.1(2):33-41.
10. Oskay M, Tamer AU, Azeri C. Antibacterial activity



Vol 12, 2014

Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia 9

- of some Actinomycetes isolated from farming soil of Turkey. African Journal of Biotechnology.2004. 3(9): 441-446.
11. Pelczar MJ, Chan ECS. Dasar-dasar mikrobiologi. Jilid 2. Jakarta: UI Press. 2006. 83.
 12. Oskay M. Antifungal and antibacterial compounds from Streptomyces strains. African Journal of Biotechnology. 2009; 8(13):3007-3017.
 13. Gritter RJ, Bobbitt JM, Schwarting AE. Pengantar kromatografi. Penerjemah Padmawinata K. Bandung: ITB; 1991. 107-155.
 14. Salni, Marisa H, Mukti RW. Isolasi senyawa antibakteri dari daun jengkol (*Pithecolobium lobatum* Benth) dan penentuan nilai KHM-nya. Jurnal Penelitian Sains. 2011. 14(1D):14109-38 - 14109-41.
 15. Matanjan P, Mohamed S, Mustapha NM, Muhammad K. Nutrient content of tropical edible seaweeds, *Eucheuma cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*. J Appl Phycol.2008. 21:75–80.
 16. Alexander M. Introduction to soil microbiology. 2nd Ed. Malabar: Krieger Publishing Company; 1977. 467.

