

## **Aktivitas Antibiotik Isolat Bakteri Kp13 dan Analisa Kebocoran Sel Bakteri *Escherichia coli***

### **(Activity of Antibiotic Bacterial Isolate Kp13 and Cell Leakage Analysis of *Escherichia coli* Bacteria)**

ALFIAN SYARIFUDDIN<sup>1\*</sup>, NANIK SULISTYANI<sup>2</sup>, KINTOKO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi S1 Farmasi, Universitas Muhammadiyah Magelang, Magelang, Indonesia

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia.

**Diterima 15 Maret 2018, Disetujui 10 September 2018**

**Abstrak:** Bakteri merupakan mikroorganisme yang dapat memproduksi metabolit sekunder, salah satunya antibiotik. Isolat KP13 adalah bakteri yang diisolasi dari rizosfer tanaman Kayu Putih. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibiotik fraksi teraktif isolat KP13 terhadap bakteri *Escherichia coli* dan kemampuan menyebabkan kebocoran pada sel bakteri *Escherichia coli*. Ekstraksi antibiotik menggunakan pelarut etil asetat dan dilakukan fraksinasi dengan gradien pelarut *n*-heksan-etilasetat dan pelarut metanol. Hasil fraksinasi dilakukan KLT untuk mengelompokkan kelompok fraksi berdasarkan nilai Rf nya. Kelompok fraksi dibandingkan aktivitas antibiotiknya dilanjutkan pengujian Kadar Hambat Minimum (KHM). Spektrofotometri UV digunakan untuk menguji kebocoran substansi sel bakteri meliputi asam nukleat dan protein serta Spektrofotometri Serapan Atom (SSA) untuk menguji pengeluaran kadar ion K<sup>+</sup> dan Ca<sup>2+</sup>. Hasil menunjukkan fraksi teraktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* adalah fraksi nomor 1 dengan nilai kadar hambat minimal (KHM) 5% dan dengan diameter zona hambat 7,33±0,58 mm.

**Kata kunci:** Ekstrak etil asetat Isolat KP13, *Escherichia coli*, fraksi teraktif, kebocoran sel.

**Abstract:** A bacterium is one of microorganisms that can produce secondary metabolite, such as antibiotic. KP13 isolate is a bacterium isolated from *Melaleuca leucadendron* L rhizosphere. The aim of this study is to know the effect of the most active fraction antibacterium of KP13 isolate toward *Escherichia coli* bacterium and the ability to caused cell leakage. Extraction of antibiotic was conducted by ethyl acetate. Extract is fractioned with a *n*-hexan-ethylacetate solvent gradient another uses a solvent methanol. Each fraction is done by KLT and grouped based on RF value. A fraction group is compare by inhibition effectiveness. Then, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) from the most active group is tested. Cell leakage analysis was performed using UV spectrophotometry to detect the release of nucleic acid and protein. Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS) was used to detect ion release of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> from. cell of bacteria. The results showed that the most active fraction against *Escherichia coli* was the fraction number 1 with MIC value of 5% and inhibition zone of 7.33±0.58 mm.

**Keywords:** Ethyl acetate extract KP13 isolate, an active fraction, cell leakage, *Escherichia coli*.

---

\*Penulis korespondensi: Hp :081804255898  
Email: alfiansyarifuddin08@gmail.com

## PENDAHULUAN

EKSPLORASI antibiotik dari metabolit sekunder dari suatu bakteri banyak dilakukan dan antibiotik tersebut mempunyai mekanisme penghambatan berbeda-beda. Salah satu mekanisme penghambatan yaitu adanya kerusakan membran sitoplasma, yaitu terjadinya kebocoran kandungan sitoplasma seperti ion  $K^+$ , dan peningkatan  $K^+$  diluar sel merupakan tanda kerusakan permeabilitas membran<sup>(1)</sup>. Ion  $Ca^{2+}$  mempengaruhi kestabilan dinding bakteri dan dengan adanya keluarnya ion tersebut dari sel menyebabkan kestabilan dinding sel terganggu yang sehingga dapat mengakibatkan kematian bakteri.

Mekanisme lain yang mungkin terjadi yaitu masuknya zat antibiotik ke dalam sel kemudian menempel pada organel sehingga mengganggu proses metabolisme seluler pada bakteri *Escherichia coli*. Permeabilitas membran yang tidak berfungsi dengan baik dapat mengakibatkan kebocoran sel dan keluarnya komponen sel<sup>(2)</sup>. Selain itu proses transkripsi dan translasi dapat terhambat dengan cara interkalasi senyawa aktif terhadap DNA/RNA. Kebocoran protein dan asam nukleat dapat terjadi melalui mekanisme interkalasi tersebut<sup>(3)</sup>.

Isolasi mikroorganisme dari rizosfer tanaman Kayu Putih sebagai penghasil antibiotik dan mendapatkan isolat aktif sebagai antibiotik, yaitu KP13. Penelitian tersebut juga melakukan ekstraksi hasil kultur isolat dengan menggunakan pelarut etil asetat yang aktif dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Ekstraksi Antibiotik dari mikroorganisme di tanah dengan menggunakan pelarut etil asetat dan dilakukan analisis menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang menghasilkan 2 spot pada plat silica gel 7,6 x 2,4 cm<sup>(4)</sup>. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktifitas antibiotik fraksi teraktif dan menganalisis kebocoran sel menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan *Atomic Absorbance Spectrophotometer* (AAS). Analisa kebocoran sel dapat menunjukkan mekanisme aksi zat antibiotik tersebut dan tempat aksinya.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Bahan yang digunakan adalah media SNB, media Mueller Hinton, NaCl 0,9%, BHI, standard Mc Farland (108 CFU/mL), gliserol 25%, NaCl,  $KNO_3$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , *E.coli* ATCC 25922, *n*-heksan, etil asetat, etanol 70%, metanol, dan kloroform..

**METODE. Pembuatan Kultur Bakteri, Ekstraksi, dan Fraksinasi.** Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah Isolat bakteri hasil isolasi

dari rizosfer tanaman kayu putih (isolat KP13). Pembuatan starter dilakukan dengan cara mengambil seperempat bagian plate isolat KP13 dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL yang berisi media SNB steril sebanyak 50 mL<sup>(5)</sup>. Inkubasi pada suhu kamar selama 5 hari dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*<sup>(6)</sup>. Dilakukan kultur bertingkat hingga volume 3 liter. Kultur uji yang sudah diinkubasi selama 14 hari disaring menggunakan corong *buchner*, kemudian dipekatkan pada suhu 50 °C dan diekstraksi menggunakan etil asetat<sup>(4)</sup>. Pelarut yang digunakan dalam fraksinasi yaitu campuran *n*-heksan, etil asetat dengan perbandingan berturut-turut 9:1 (v/v), 8:2 (v/v), 7:3 (v/v), 6:4 (v/v), 5:5 (v/v) dan sebaliknya serta etil asetat:metanol 1:1 (v/v) dan metanol 100%. Hasil KLT masing masing fraksi dengan profil pemisahan yang sama dikelompokkan.

**Pembuatan Media MHA.** Sebanyak 19 g serbuk media MHA dilarutkan dalam akuades sebanyak 500 mL dengan dipanaskan dan diaduk sampai homogen. Setelah itu dituang pada cawan petri dan ditunggu sampai agar memadat.

**Pembuatan Suspensi Bakteri.** Mengambil 100  $\mu$ L stok bakteri dimasukkan dalam 1 mL BHI, diinkubasi selama 18-24 jam kemudian mengambil 100  $\mu$ L dimasukkan ke dalam BHI 1 mL, diinkubasi selama 3-5 jam di dalam inkubator. Kemudian mengambil 100  $\mu$ L bakteri diencerkan dengan NaCl 0,9% sampai kekeruhan sama dengan standar Mc Farland 108 CFU/mL<sup>(7)</sup>.

**Pembuatan Larutan Uji Ekstrak.** masing masing kelompok fraksi dibuat dalam konsentrasi 40% sebanyak 100  $\mu$ L replikasi 3 kali dengan kontrol negatif DMSO 10 % dan kontrol positif kloramfenikol 0,1%.

**Uji Kadar Hambat Minimum (KHM).** Fraksi teraktif ditentukan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) dengan kadar yang digunakan antara lain :40%, 30%, 20%, 10%, 5% dan 2,5%. Setiap lubang sumuran diisi larutan uji dengan konsentrasi yang sudah ditentukan sebanyak 50  $\mu$ L dengan menggunakan mikropipet lalu dibiarkan selama 2 jam, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C.

**Analisis Kebocoran Sel dengan Spektrofotometer Uv-Vis.** Suspensi bakteri uji umur 18-24 jam sebanyak 10 mL *disentrifuse* dengan kecepatan 3500 rpm selama 15-20 menit sehingga diperoleh biomassa sel berupa endapan. Endapan biomassa sel bakteri tersebut dicuci dengan *buffer phospat* pH 7,4 dan diulang sebanyak 2 kali. Endapan tersebut kemudian disuspensikan ke dalam 4 mL larutan *buffer phospat* pH 7,4. Kebocoran dinyatakan dengan terukurnya substansi yang terdapat pada supernatan bakteri uji setelah dikontakkan

dengan fraksi teraktif ekstrak etil asetat antibiotik dari isolat bakteri KP13 pada konsentrasi 5% dan 10% Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 260 dan 280 nm.

**Analisis Kadar Ion Logam  $K^+$  dan  $Ca^{2+}$  dengan Atomic Absorbance Spectrophotometer (AAS).** Preparasi sampel seperti pada pengamatan kebocoran sel dengan spektrofotometri Uv-Vis. Kebocoran dinyatakan dengan terukurnya ion-ion logam  $K^+$  dan  $Ca^{2+}$  yang dideteksi dengan menggunakan AAS (*Atomic Absorption Spectrometer*).

**Analisis Data.** Data zona hambat pada uji Kadar Hambat Minimum dan data kebocoran sel diuji homogenitas dengan uji *Kolmogorov-smirnov* dan uji normalitas. Jika data terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan uji *one way* Anova dan LSD dengan taraf kepercayaan 95%, kemudian dilakukan uji korelasi dengan uji Pearson. Jika data tidak terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney*, kemudian dilakukan uji korelasi dengan uji *Spearman*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Ekstraksi dan Fraksinasi.** Kultur sebanyak 3 liter selama 14 hari dengan 3 kali perlakuan<sup>(8)</sup>. Kultur disaring dan filtrat diekstraksi menggunakan etil asetat (1:1) dan mendapatkan rendemen 15,82 g. Ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat dari 1 L kultur mendapatkan ekstrak etil asetat sebanyak 350 mg<sup>(9)</sup>.

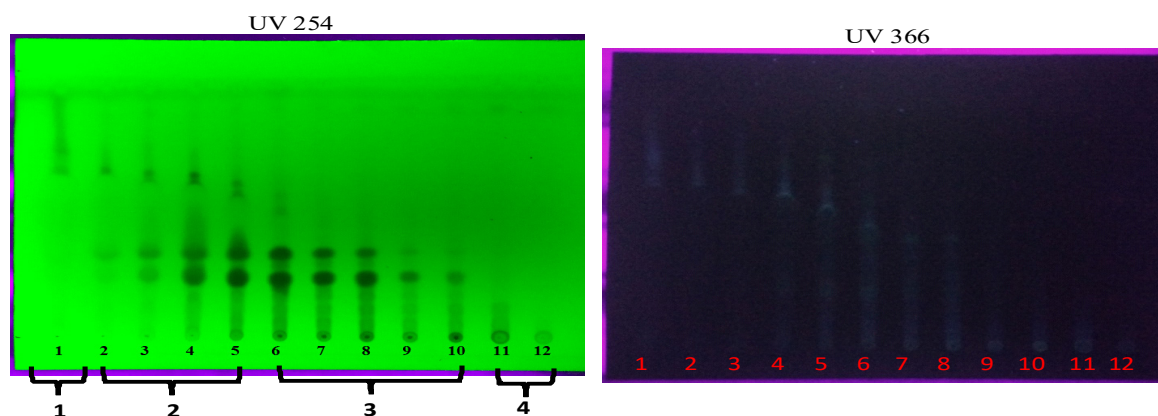
Ekstrak etil asetat yang diperoleh selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan gradien pelarut (*n*-heksan:etilasetat), dilanjutkan menggunakan perbandingan pelarut etilasetat:metanol (1:1) dan metanol. Proses fraksinasi dengan pelarut organik yang berbeda tingkat kepolarannya dapat mempengaruhi

jenis dan kadar senyawa yang tersari di dalamnya<sup>(10)</sup>. Fraksinasi ekstrak etil asetat isolat KP13 ini menggunakan metode partisi padat-cair. Ekstrak etil asetat sebanyak 8387,3 mg. Masing-masing pelarut yang digunakan 100 mL dengan masing-masing 3 kali pengulangan, setiap pengadukan selama 1 jam.

Setelah diperoleh berat kering dari hasil fraksinasi, melakukan KLT dengan cara masing-masing fraksi yang dihasilkan dengan konsentrasi 40% ditotolkan pada plat KLT silika gel F254 yang sebelumnya telah diaktifkan pada oven dengan suhu 105 °C selama ±10 menit. Masing-masing fraksi ditotolkan sebanyak 10 µL menggunakan pipa kapiler 5 µL. Profil spot yang terbentuk mempunyai karakteristik sama yang ditinjau dari nilai  $R_f$  nya dikelompokkan menjadi satu kelompok, sehingga diperoleh 4 kelompok fraksi. Masing-masing mempunyai karakteristik yang sama seperti pada Gambar 1.

Fraksi kelompok 1 menunjukkan adanya potensi aktivitas antibiotik yang ditunjukkan adanya zona bening di sekitar lubang sumuran yang menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan sebesar 12,33±0,28 mm, sedangkan kelompok fraksi 2 juga menunjukkan adanya potensi aktivitas antibiotik terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 7,67±0,58 mm. Kelompok fraksi nomor 3 dan 4 tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Berdasarkan Tabel 1, dapat disimpulkan, kelompok fraksi teraktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* adalah kelompok fraksi nomor 1 dengan nilai rata-rata diameter zona hambat 12,33±0,28 mm.

Analisis statistiknya pada pengujian untuk menentukan kelompok fraksi teraktif dengan uji *One Sampel Kolmogrov-Smirnov Test* terdistribusi normal tetapi tidak homogen pada uji homogenitas yang



Gambar 1. Fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak kloroform : etil asetat : metanol (4 : 1 : 0,5), hasil elusi KLT dilihat pada UV 254 nm dan 366 nm.

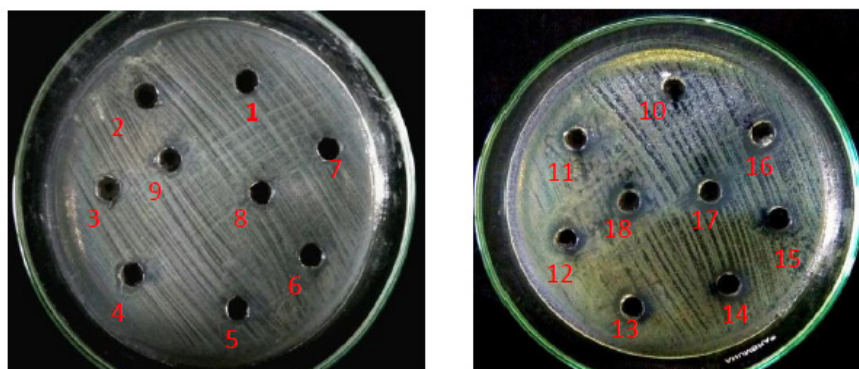
Tabel 1. Rata-rata zona hambat uji aktivitas kelompok fraksi terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Kelompok fraksi	Replikasi	Zona hambat (mm)	Rata-rata zona hambat (mm)±SD
Kelompok 1 40% 50µL (20mg)	1	12,50	12,33±0,28*
	2	12,00	
	3	12,50	
Kelompok 2 40% 50µL (20mg)	1	8,00	7,67±0,58
	2	8,00	
	3	7,00	
Kelompok 3 40% 50µL (20mg)	1	6,00	6,00±0,00
	2	6,00	
	3	6,00	
Kelompok 4 40% 50µL (20mg)	1	6,00	6,00±0,00
	2	6,00	
	3	6,00	
Kontrol negatif (DMSO 10%)	1	6,00	6,00±0,00
	2	6,00	
	3	6,00	
Kontrol positif (kloramfenikol 0,1%)	1	35,3	37,06±2,17
	2	39,5	
	3	36,4	

ditandai dengan nilai sig=0,001, sehingga <0,005. Oleh karena itu diuji non parametrik dengan dilakukan analisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Berdasarkan uji *Kruskal-Wallis* diperoleh *mean rank* dari keempat kelompok fraksi, fraksi kelompok 1 menduduki nilai *mean rank* pertama dari keempat kelompok fraksi, sehingga dapat ditarik kesimpulan kelompok fraksi teraktif adalah fraksi kelompok 1 yang digunakan untuk pengujian tahap berikutnya.

**Uji Kadar Hambat Minimum (KHM).** Fraksi teraktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri

*Escherichia coli* diuji untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM), yaitu dari kelompok fraksi nomor 1 dengan menggunakan metode sumuran (*Cup-plate technique*), dengan cara memasukkan kelompok fraksi nomor 1 dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30% dan 40% sebanyak 50 µL dalam lubang sumuran yang berdiameter 6 mm<sup>(1)</sup>. Dari hasil pengujian KHM tersebut, didapatkan nilai Kadar Hambat Minimum kelompok fraksi nomor 1 terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi 5% yang ditunjukkan pada Gambar 2, dan mempunyai rata-rata

Gambar 2. Hasil uji kadar hambat minimum fraksi teraktif terhadap *Escherichia coli*.

Keterangan :

1-3 = 2,5% 50µL (1,25 mg); 4-6 = 5% 50µL (2,5 mg); 7-9 = 10% 10µL (5 mg); 10-12 = 20% 50µL (10mg); 13-15 = 30% 50µL (15mg); 16-18 = 40 % 50µL (20mg).



**Tabel 2. Rata-rata zona hambat uji kadar hambat minimum kelompok fraksi teraktif terhadap bakteri *Escherichia coli*.**

Konsentrasi (%)	Replikasi	Zona hambat (mm)	Rata-rata zona hambat (mm)±SD
40	1	12,00	12,08±0,14
	2	12,25	
	3	12,00	
30	1	11,75	11,42±0,38
	2	11,50	
	3	11,00	
20	1	10,00	10,58±0,52
	2	11,00	
	3	10,75	
10	1	8,00	7,33±0,58
	2	7,00	
	3	7,00	
5	1	8,00	7,33±0,58*
	2	7,00	
	3	7,00	
2,5	1	6,00	6,00±0,00
	2	6,00	
	3	6,00	

diameter zona hambat sebesar 7,33±0,58 mm yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Penelitian mengenai aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri oleh *Actinomycetes* dari tanah di India terhadap bakteri *Escherichia coli*, metabolit sekunder ekstra selulernya mulai menunjukkan aktivitas antibiotiknya pada konsentrasi 0,06 mg/mL<sup>(12)</sup>.

Analisis statistik menunjukkan bahwa diameter zona hambat pada pengujian Kadar Hambat Minimal (KHM) dengan analisis *One sample Kolmogorov-smirnov* terdistribusi normal, tetapi pada uji homogenitas mendapatkan hasil tidak homogen. Hasil analisis tidak homogen perlu dilakukan uji *Kruskall-Wallis* yang mendapatkan nilai p-value 0,002<0,005 dapat ditarik kesimpulan perlakuan penambahan fraksi kelompok 1 memberikan pengaruh bermakna terhadap zona hambat yang ditimbulkan.

Ditinjau dari *mean rank*, pada penambahan konsentrasi 2,5% mempunyai nilai yang sama terhadap kontrol negatif. Sedangkan nilai dari penambahan konsentrasi 5% mempunyai nilai *mean rank* lebih tinggi dibanding dengan kontrol negatif dan penambahan fraksi kelompok 1 dengan konsentrasi 2,5%, tetapi nilai *mean rank* yang ditimbulkan pada penambahan konsentrasi 5% sama dengan

penambahan 10% fraksi kelompok 1. Hasil pengujian dengan uji *Mann-Whitney* pada penambahan 2,5% fraksi kelompok 1 tidak ada perbedaan bermakna diameter zona hambat yang dihasilkan ditunjukkan dengan nilai p>0,05, sedangkan hasil uji *Mann-Whitney* konsentrasi 5% mempunyai nilai p<0,05 jadi sudah mulai terjadi perbedaan bermakna pada penambahan 5% fraksi kelompok 1. Uji korelasi Spearman menunjukkan adanya korelasi sempurna dengan nilai sig<0,05 dan mempunyai nilai koefisien korelasi 0,969. Nilai koefisien korelasi tersebut berada pada rentang 0,75-0,99.

Fraksi kelompok 1 tidak ada perbedaan bermakna diameter zona hambat yang dihasilkan ditunjukkan dengan nilai p>0,05, sedangkan hasil uji *Mann-Whitney* konsentrasi 5% mempunyai nilai p<0,05 jadi sudah mulai terjadi perbedaan bermakna pada penambahan 5% fraksi kelompok 1. Uji korelasi Spearman menunjukkan adanya korelasi sempurna dengan nilai sig<0,05 dan mempunyai nilai koefisien korelasi 0,969. Nilai koefisien korelasi tersebut berada pada rentang 0,75-0,99.

**Analisis Kebocoran Sel Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis dan Atomic Absorbance Spectrophotometer (AAS).** Mikroba bersifat sensitif apabila pertumbuhan bakteri dan kematian mikroba

tersebut terhambat. Mekanisme penghambatan atau kematian mikroba terhadap paparan senyawa aktif dapat diketahui dengan adanya kebocoran sel, gangguan metabolisme, dan perubahan morfologi sel.

Peningkatan nilai absorbansi pada sel yang diukur mengindikasikan peningkatan jumlah isi sel yang dikeluarkan dari sel. Komponen isi sel yang bocor keluar sel dapat diukur pada panjang gelombang 260 nm adalah DNA meliputi purin, pirimidin, dan ribonukleotida, sedangkan pada panjang gelombang 280 nm dapat mengukur tirosin dan triptopan<sup>(13)</sup>. Hasil perhitungan kebocoran sel bakteri diperlihatkan pada Tabel 3.

Metode untuk mengoreksi adanya asam nukleat bisa dikembangkan dengan mengukur rasio absorbansi pada 280 dan 260 nm. Rasio tersebut dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah protein yang juga terdapat kandungan asam nukleat. Terdapat ketetapan rasio yang mengindikasikan jumlah protein. Konsentrasi DNA genom dan RNA dihitung berdasarkan rumus yang dikembangkan oleh<sup>(14)</sup>.

Analisis statistik menunjukkan bahwa data kadar DNA dan RNA pada kebocoran sel terdistribusi normal tetapi tidak homogen. Pada uji analisis *Kruskal-Wallis* kadar DNA dan RNA pada penambahan konsentrasi 5% dan 10% fraksi kelompok 1 menunjukkan nilai  $p < 0,05$  sehingga memberikan pengaruh bermakna terhadap kadar DNA dan RNA pada kebocoran sel. Uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa penambahan fraksi kelompok 1, 5% dan 10% keduanya memberikan nilai  $p < 0,05$  pada kadar DNA dan RNA sehingga menunjukkan perbedaan kadar DNA dan RNA pada kebocoran sel. Uji korelasi Spearman menunjukkan

nilai koefisien korelasi kadar DNA dan RNA pada kebocoran sel masuk pada rentang 0,75-0,99 yang menunjukkan ada korelasi positif yang sangat kuat, sehingga dengan peningkatan pemberian konsentrasi fraksi kelompok 1, maka semakin tinggi kadar DNA dan RNA pada kebocoran sel.

Struktur dinding sel bakteri gram negatif *Escherichia coli* terdiri dari tiga lapisan yaitu membran sitoplasma, membran luar, dan lapisan diantara keduanya, yaitu lapisan tipis peptidoglikan. Membran luar sel terdiri dari lipopolisakarida, fosfolipid, dan lipoprotein. Kekompakan lapisan lipopolisakarida (LPS) distabilkan oleh interaksinya dengan ion  $Ca^{2+}$  serta ion divalen lainnya. Kestabilan permeabilitas membran sel bakteri ini juga dipengaruhi oleh konsentrasi ion  $K^+$  pada cairan sitoplasma<sup>(15)</sup>.

Fraksi kelompok 1 dari ekstrak etil asetat isolat KP13 telah menunjukkan aktivitas antibiotik terhadap bakteri *Escherichia coli*. Selain itu, telah ditentukan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM). Mengacu potensi aktivitas antibiotik tersebut dapat diketahui dampak yang terjadi terhadap mekanisme kematian sel bakteri *Escherichia coli*. Analisa kebocoran sel tersebut dengan menggunakan alat AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*). Adanya ion  $K^+$  dan  $Ca^{2+}$  yang terbaca pada Spektrofotometri Serapan Atom menunjukkan bahwa terjadi pengeluaran ion  $K^+$  dan  $Ca^{2+}$  pada sampel kelompok fraksi 1 terhadap bakteri *Escherichia coli*. Penambahan kelompok fraksi 1 terhadap bakteri uji menggunakan 3 konsentrasi, yaitu 0%, 5% dan 10%. Hasil kebocoran ion diperlihatkan pada Tabel 4.

**Tabel 3.** Hasil perhitungan kebocoran isi sel bakteri *Echerichia coli* akibat penambahan fraksi kelompok 1 isolat KP13 yang terbaca pada panjang gelombang 260 dan 280 nm.

Parameter	0%	5%	10%
OD280/260	0,723±0,046	0,759±0,001	0,825±0,002
Asam Nukleat (%)	9,333±2,309	8,00	6,00±0,000
Faktor koreksi	0,506±0,075	0,550	0,630±0,000
Protein (µg/ml)	0,002±0,001	0,097±0,001	0,225±0,003
Konsentrasi DNA (µg/ml)	2,667±0,577	232±1.000*	433.333±7.572*
Konsentrasi RNA (µg/ml)	2,133±0,461	185.600±0.8*	346.667±6.057*

Keterangan: \* signifikan ( $p \text{ value} < 0,05$ ) terhadap konsentrasi 0%.

**Tabel 4. Hasil uji kebocoran ion  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{K}^+$  *Escherichia coli* akibat penambahan kelompok fraksi nomor 1 dari ekstrak etil asetat isolat KP13.**

Konsentrasi	Parameter	Hasil pengukuran kadar ion logam (ppm)			Rata-rata(Ppm)
		I	II	III	
0%	$\text{Ca}^{2+}$	0,148	0,170	0,148	0,155±0,013
	$\text{K}^+$	792,026	783,395	792,026	789,149±4,983
5%	$\text{Ca}^{2+}$	0,459	0,459	0,481	0,466±0,012*
	$\text{K}^+$	766,132	783,395	774,764	774,764±8,63*
10%	$\text{Ca}^{2+}$	0,281	0,304	0,259	0,281±0,022*
	$\text{K}^+$	731,607	740,238	740,238	737,361±4,983*

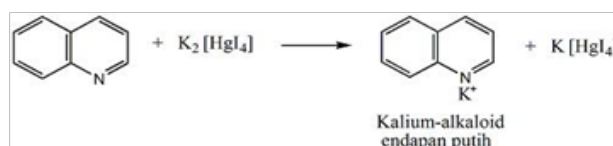
Keterangan: \* signifikan (p value<0,05) terhadap konsentrasi 0%.

Ion Kalium ( $\text{K}^+$ ) merupakan kation utama yang terkandung dalam sitoplasma pada sel yang sedang tumbuh dan mempengaruhi kestabilan permeabilitas membran sel bakteri<sup>(15)</sup>. Ion  $\text{K}^+$  memiliki peran penting dalam mengaktivasi enzim sitoplasma untuk menjaga tekanan turgor serta mengatur stabilitas pH dalam sitoplasma. Ion  $\text{K}^+$  pada bakteri memiliki peranan penting dalam fungsinya menjaga kesatuan ribosom. Keberadaan ion logam  $\text{K}^+$  dalam sel mempunyai peran penting dalam stabilisasi RNA. Sehingga, keluarnya ion logam dari sel dapat mempengaruhi permeabilitas membran dan atau dinding sel bakteri<sup>(16)</sup>. Kerusakan yang terjadi pada membran sitoplasma ditandai dengan terjadinya kebocoran isi dari sitoplasma, seperti ion  $\text{K}^+$ , sehingga terjadi peningkatan ion  $\text{K}^+$  diluar sel mengindikasikan terjadi kerusakan permeabilitas membran sel bakteri<sup>(1)</sup>.

Kebocoran ion logam  $\text{K}^+$  diindikasikan dengan peningkatan konsentrasi  $\text{K}^+$  terdapat kebocoran sel, tetapi pada penelitian kali ini berbanding terbalik. Dengan adanya peningkatan konsentasi fraksi kelompok 1 yang diberikan terjadi penurunan konsentrasi ion logam  $\text{K}^+$ .Kemungkinan pada senyawa aktif terdapat senyawa yang dapat mengikat dan mengendapkan ion  $\text{K}^+$ , yaitu alkaloid. Senyawa alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam<sup>(17)</sup>. Nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam  $\text{K}^+$  membentuk kompleks kalium-alkaloid kemudian mengendap<sup>(18)</sup>. Sebagai pendekatan oleh hasil ion  $\text{K}^+$  berbanding terbalik oleh konsentrasi sampel yang ditambahkan, yaitu pada uji alkaloid dengan pereaksi mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam  $\text{K}^+$  membentuk kompleks kalium-alkaloid kemudian mengendap<sup>(19)</sup>. Persamaan reaksi diperlihatkan pada Gambar 3 berikut:

Pada reaksi menggunakan reagen *Dragendroff*,

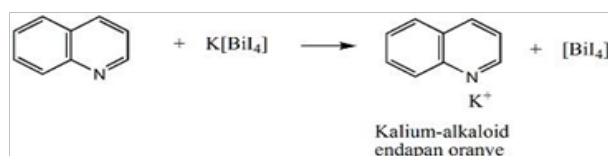
ion logam  $\text{K}^+$  membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan alkaloid sehingga membentuk kompleks



**Gambar 3. Reaksi  $\text{K}^+$  terhadap senyawa alkaloid dengan pereaksi mayer.**

kalium-alkaloid yang mengendap<sup>(19)</sup>. Persamaan reaksi diperlihatkan pada Gambar 4 berikut:

Oleh karena itu, dengan adanya peningkatan konsentrasi fraksi kelompok 1 yang dipaparkan, maka senyawa alkaloid juga meningkat, sehingga



**Gambar 4. Reaksi  $\text{K}^+$  terhadap senyawa alkaloid dengan pereaksi Dragendroff.**

pembentukan kompleks kalium-alkaloid yang mengendap juga meningkat antara fraksi kelompok 1 dengan ion logam  $\text{K}^+$ , sehingga ion logam  $\text{K}^+$  pada supernatan sampel yang terbaca oleh Spektrofotometri Serapan Atom juga menurun.

Ion logam  $\text{Ca}^{2+}$  terdapat di bagian sitosol yaitu cairan sitoplasma dan juga ditemukan pada dinding sel yang ikut berperan dalam aktivitas enzim<sup>(20)</sup>. Ion  $\text{Ca}^{2+}$  tersebut berfungsi menghubungkan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri gram negatif sehingga berfungsi untuk menjaga kestabilan dinding bakteri. Keluarnya ion dari sel yang disebabkan karena ada paparan senyawa lain dari luar dapat mempengaruhi kestabilan dinding sel yang kemudian dapat mengakibatkan kematian bakteri. Hasil penelitian dapat disimpulkan

oleh bahwa adanya peningkatan kadar logam  $K^+$  yang berada di luar sel mengindikasikan adanya kerusakan permeabilitas membran, sedangkan dengan adanya peningkatan ion logam  $Ca^{2+}$  menandakan rusaknya dinding sel<sup>(21)</sup>.

### SIMPULAN

Fraksi Kelompok 1 isolat KP13 dapat menyebabkan kebocoran sel *Escherichia coli* yang ditandai dengan kebocoran sel yang terabsorpsi pada 260 dan 280 nm (asam nukleat, protein, DNA, RNA) dan dengan kebocoran ion  $Ca^{2+}$ .

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih saya ucapkan kepada Dr. Nanik Sulistyani, M. Si., Apt. dan Dr. Kintoko, M. Sc., Apt. yang telah membimbing penelitian ini dan pihak-pihak yang menunjang penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

1. S. Cox, C. Mann, J. Markham, J. Gustafson, J. Warmington, Dan S. Wyllie, "Determining the antimicrobial actions of tea tree oil," *Molecules*, Vol. 6, No. 12, 2001. Hlm. 87–91.
2. A. Giacometti, O. Cirioni, M.S. Del Prete, F. Barchiesi, Dan G. Scalise, "Short-term exposure to membrane active antibiotics inhibits *Cryptosporidium parvum* infection in cell culture," *antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 44, No. 12. 2000. Hlm. 3473–75.
3. H. Engelberg-Kulka, S. Amitai, I. Kolodkin-Gal, Dan R. Hazan, "Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria," *Plos Genet.*, Vol. 2, No. 10. 2006. Hlm. E135.
4. Department Of Microbiology, Hindushtan College Of Arts And Science, Coimbatore-28, India Dan H. N, "Purification of secondary metabolites from soil actinomycetes," *Int. J. Microbiol. Res.*, Vol. 3, No. 3. 2011. Hlm. 148–156.
5. J. Widada Dan W. Asmara, "Antifungal production of a strain of *Actinomycetes* Spp isolated from the rhizosphere of cajuput plant: selection and detection of exhibiting activity against tested fungi," Hlm. 10.
6. X. Wang, L. Huang, Z. Kang, H. Buchenauer, Dan X. Gao, "Optimization of the fermentation process of *Actinomycete* strain Hhs.015 T," *J. Biomed. Biotechnol.*, Vol. 2010, Hlm. 1–10.
7. Mulyadi Dan N. Sulistyani, "Aktivitas cairan kultur 12 isolat *Actinomycetes* terhadap bakteri resisten," *J. Kesehat. Masy. J. Public Health*, Vol. 7, No. 2. 2013.
8. L.S. Singh, H. Sharma dan NC. Talukdar, "Production of potent antimicrobial agent by *Actinomycete*, *Streptomyces sannanensis* strain Su118 isolated from Phoomdi in Loktak lake of Manipur, India," *Bmc Microbiol.*, Vol. 14, No. 1. 2014.
9. H. Rante Dan Y.B. Murti, "Purifikasi dan karakterisasi senyawa anti-bakteri dari *Actinomycetes* asosiasi Spons terhadap bakteri patogen resisten". 2010. Hlm. 8.
10. V.T. Suratmo Dan Rurini Retnowati, "Fraksi semi polar dari daun Mangga Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm)," *Kim. Stud. J.*, Vol. 1, No. 1. 2015. 778–84.
11. Pratiwi ST, Mikrobiologi farmasi. Fakultas Farmasi Ugm, Yogyakarta: Erlangga; 2008.
12. A. Pandey, I. Ali, K.S. Butola, T. Chatterji, V. Singh, D. Division. Isolation and characterization of *Actinomycetes* from soil and evaluation of antibacterial activities of *Actinomycetes* against pathogens. Hlm. 9.
13. P. S. Park. J Dan Park H.W., "Inactivation kinetics of food poisoning microorganisms by carbon dioxide and high hydrostatic pressure," *J Foodsci*, Vol. 68, No. 3. 2003. 976-81.
14. L.Vazquez, A.MJ, Rueda. Quantification of DNA, Dalam Isaac, G., Ingram, D.S., (Eds.). *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals*. Chapman And Hall: London. Weinheim, New York. Tokyo. Melbourne. Madras; 1998. 18-21.
15. M.E. Madigan, J. Parker, "Brock biology of microorganisms", 9<sup>th</sup> ed. p. 6.
16. B. Butel, J.SG. F., J. Morse, S.A, A. Melnick. Mikrobiologi kedokteran. 23<sup>rd</sup> ed. Diterjemahkan Hartanto. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran Egc, 2007.
17. J. M. R.C Fay, Chemistry, Edisi Keempat. Belmont: Pearson Education International, 2004.
18. D. Dillasamola. Perbandingan pengaruh pemberian ekstrak etanol *defatting* dan ekstrak etanol daun Benalu Kopi *Scurrula ferruginea* (Jack) Danser terhadap kadar glukosa darah. 2015. 5(2):7.
19. S.D. Marlina, V. Suryanti, S. Suyono, "The phytochemical screenings and thin layer chromatography analysis of chemical compounds in ethanol extract of Labu Siam fruit (*Sechium edule* Jacq. Swartz.)," *Biofarmasi J. Nat. Prod. Biochem*. 2005. 3(1):26–31.
20. A. Ultee, "Bactericidal action of carvacrol towards the food pathogen *Bacillus cereus*: a case study of a novel approach to mild food preservation," s.n., S.l., 2000.
21. S. Aziz. Aktivitas antibakteri ekstrak etanolik daun dan umbi *Crinum asiaticum* L. terhadap bakteri penyebab jerawat. 2010. 6.