

KLT-Bioautografi Ekstrak Etil Asetat Supernatan Hasil Fermentasi *Streptomyces G* Isolat Tanah Rumah Kompos Bratang Surabaya

Ifah Yulistiyani¹, Achmad Toto Poernomo², Isnaeni^{2*}

¹Program Studi Magister Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

²Departemen Ilmu Kefarmasian, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*Corresponding author: isnaeni@ff.unair.ac.id

Submitted: 16 Februari 2020

Accepted: 23 December 2020

Published: 27 April 2021

Abstract

Background: The rapid development of microorganisms behavior through various mechanisms reflected in various resistant strains, tolerant and persistent characters, such as Multi Drug Resistant (MDR), Extended Strain Beta Lactamase, MDR-Tuberculosis and Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*. Efforts to explore new antibiotics from various natural sources have been done to overcome problems related to the need for antibiotics that are responsible for handling infectious diseases. **Objectives:** This research focuses on the isolation of *Streptomyces sp.* from compost waste land in the Bratang area of Surabaya that were able to produce anti-bacterial compounds. **Methods:** The *Streptomyces sp.* was successfully isolated and identified as *Streptomyces G* by which fermentation process was performed in the International *Streptomyces Project-4* media. Thin Layer Chromatography-Bioautography method was used to evaluate the antibacterial activity of ethyl acetate extract of cell free fermentation broth (CFFB) against *Escherichia coli* ATCC 7890 and *Staphylococcus aureus* ATCC 23456. **Results:** The CFFB supernatant exhibited ability to inhibit the tested bacteria growth. The active compound was successfully extracted from the supernatant by ethyl acetate. The TLC-bioautogram using eluent of butanol : acetic acid : water (3: 2: 6, v/v) showed that two spots were good separately, one of those ($R_f = 0.56$) inhibited the tested bacteria with a weak potential category. **Conclusion:** Ethyl acetate extract of CFFB supernatant of *Streptomyces G* in ISP-4 media contained two different compounds and one of them showed growth inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Escherichia coli* ATCC 8739 based on the TLC-bioautogram.

Keywords: *Streptomyces sp-G*, compost, waste-soil, TLC-bioautography

Abstrak

Pendahuluan: Meningkatnya penggunaan antibiotika yang tidak rasional menyebabkan berkembangnya masalah resistensi obat anti infeksi. Perkembangan perilaku mikroorganisme yang luar biasa pesatnya melalui berbagai mekanisme telah melahirkan berbagai strain yang resisten, toleran dan persisten, antara lain, *Multi Drug Resistant* (MDR), *Extended Strain Betalactamase*, MDR-Tuberculosis dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Upaya untuk mengeksplor antibiotika baru dari berbagai sumber alam telah banyak dilakukan untuk mengatasi permasalahan terkait kebutuhan antibiotika yang handal dalam mengatasi penyakit infeksi. **Tujuan:** Penelitian ini berfokus pada isolasi *Streptomyces sp.* yang mampu menghasilkan senyawa anti bakteri dari tanah kompos buangan sampah di daerah Bratang Surabaya. **Metode:** *Streptomyces sp.* telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi sebagai *Streptomyces G* dan dilakukan proses dalam media ISP-4. Metode KLT-bioautografi digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat supernatan kaldu fermentasi terhadap *Escherichia coli* ATCC 7890 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 23456. **Hasil:** Supernatan menunjukkan kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji. Senyawa aktif berhasil diekstraksi dari supernatan dengan etil asetat dan KLT-bioautogram menggunakan eluen butanol-asam asetat-air (3:2:6, v/v) menunjukkan bahwa ada dua noda yang terpisah secara baik, salah satu dari noda dengan R_f 0,56 mampu menghambat bakteri uji dengan kategori potensi lemah. **Kesimpulan:** Ekstrak etil asetat supernatan kaldu fermentasi *Streptomyces G* dalam media ISP-4

mengandung dua senyawa yang berbeda dan satu diantaranya menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Escherichia coli* ATCC 8739 berdasarkan data KLT-bioautogram.

Kata kunci: *Streptomyces sp-G*, tanah kompos, aktivitas antibakteri

PENDAHULUAN

Actinomycetes termasuk bakteri berfilamen golongan Gram positif, saprofitik yang mampu hidup bebas di berbagai habitat, dan dikenal sebagai sumber berbagai antibiotik (Valli dkk., 2012; Al-Dhabi dkk., 2019) yang sebagian besar sudah digunakan di klinik. *Actinomycetes* ditemukan di laut, lingkungan muara, tanah dan air tawar (Gebreyohannes dkk., 2013), serta memiliki sifat antara bakteri dan jamur (Pandey dkk., 2004). *Actinomycetes* tercatat sebagai salah satu bakteri penghasil antibiotik selain fungi dan beberapa mikroba lainnya. Dari sekitar 11.900 jenis antibiotik yang ditemukan, kurang lebih 66% dihasilkan oleh *actinomycetes* dan hampir 80% dari jumlah tersebut ditemukan dalam *Streptomyces* spp., 22% dihasilkan oleh jamur, 12% dihasilkan oleh bakteri selain *actinomycetes*.

Streptomyces sp. dikenal sebagai produsen antibiotik penting, menghasilkan tiga perempat dari semua antibiotik yang tersedia secara komersial. Pada penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa *Streptomyces* sp. memproduksi bermacam-macam antibiotik antara lain streptomisin, kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin, bleomisin, kanamisin, dan masih banyak lagi antibiotik lainnya (Hopwood, 2007). Perbedaan geografis lokasi menyebabkan variasi jenis tanah dan antibiotik yang dihasilkan oleh *Streptomyces* (Nampoothiri dkk., 2002).

Dalam *Actinomycetes*, *Streptomyces* termasuk genus yang terpenting dan lebih dari 1000 species telah ditemukan (Al-Ansari dkk., 2019). Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan melakukan penapisan daya antibakteri *Streptomyces* sp. dari tanah Rumah Kompos Bratang Surabaya (RKBS), salah satu tempat pengolahan sampah yang terletak di bagian selatan Kebun Bibit Bratang, Surabaya. Penelitian terkait isolasi *actinomycetes* khususnya *Streptomyces* telah banyak dilaporkan, antara Cuesta dkk. (2012) telah mengisolasi 49 *actinomycetes* dari kompos dan 12 di antaranya termasuk spesies *Streptomyces*. Identifikasi senyawa aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-bioautografi juga dilaporkan. Choma (2005) telah menyampaikan konsep teknik pemisahan, identifikasi

dan uji aktivitas senyawa aktif hasil isolasi dari bahan alam (Isnaeni dkk., 2017).

Telah melaporkan aktivitas antibakteri supernatan hasil fermentasi *Streptomyces* sp dan hasil ekstraksinya dengan butanol yang diisolasi dari tanah kebun sayur terhadap bakteri Gram positif, Gram negatif termasuk *Mycobacterium tuberculosis* (Isnaeni dkk., 2016).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Streptomyces G isolat tanah RKBS diperoleh dari Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 diperoleh dari Unit Layanan Pengujian Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Media *International Streptomyces project* (ISP-4) cair dan padat (Lampiran 1), media *Nutrient Broth* (Difco) (Lampiran 2), agar AA, streptomisin sulfat (Meiji), eritromisin stearat (Aditamaraya Farmindo), tetrasiklin hidroklorida (Interbat), NaCl p.a (Merck), air suling, metanol p.a.(Merck), etil asetat teknis (Merck), n-butanol p.a. (Merck), asam asetat p.a. (Merck), toluen p.a. (Merck), etanol p.a. (Merck), kalium permanganat (Merck), asam sulfat p.a. (Merck), anisaldehyd (Merck), dapar fosfat (Millipore).

Alat

Timbangan analitik (Sartorius), otoklaf (*Pressure Stem Sterilizer* 0,14 Mpa), pH meter (Schott), termometer, *Laminar Air Flow cabinet* (type pvc-750 APG seisa KHUSO LTD), inkubator (Meymert), cawan petri, jarum penanam (Öse), mikropipet (Socorex), jangka sorong (Tricle Brand), *hot plate*, Spectrophotometer UV-Vis (Lovibond Spectro PC 22), *Thermoshaker* (Gerhardt Laboshake), *rotavapour*, bejana kromatografi, *vortex*, lempeng kromatografi lapis tipis Silica Gel F₂₅₄ (Merck, Germany), pipa kapiler 2 µL.

Metode

Penyiapan starter *Streptomyces* G

Sebanyak satu Öse koloni *Streptomyces* G digesekkan dalam 8 mL kultur media ISP-4 agar miring, diinkubasi pada suhu 28°C selama 48 jam. Suspensi bakteri disiapkan dengan cara menanamkan satu Öse koloni *Streptomyces* G dalam media ISP-4 cair dan

diinkubasi pada suhu 28°C selama 48 jam, dikocok 150 rpm pada *Thermoshaker*. Jumlah bakteri dalam kaldu fermentasi *Streptomyces* G dihitung dengan Angka lempeng Total (ALT). Sebanyak 1 mL kaldu fermentasi dimasukkan tabung reaksi berisi 9 mL larutan steril 0,9% NaCl, suspensi divortex hingga homogen. Selanjutnya dilakukan pengenceran dari 10⁻¹ sampai 10⁻¹⁵. Dari masing-masing enceran diambil 1 mL menggunakan mikropipet, dicampur dengan 10 mL media ISP-4 Agar yang telah dicairkan suhu 45 - 50°C, divortex hingga homogen, kemudian dituang ke dalam cawan Petri dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 48 jam, percobaan dilakukan duplo. Cawan Petri yang mengandung koloni 30 - 300 digunakan sebagai dasar perhitungan ALT. Kaldu fermentasi *Streptomyces* G juga diukur transmitansnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Transmitans yang diperoleh akan digunakan sebagai dasar pemanenan biomassa atau starter pada proses fermentasi selanjutnya (Isnaeni dkk., 2016).

Fermentasi *Streptomyces* G

Sebanyak 25 mL suspensi *Streptomyces* G dipindahkan dari starter ke 250 mL media ISP-4 cair, kemudian dikocok pada *Thermoshake* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 28°C selama 48 jam. Fermentasi dilakukan selama 10 hari. Pengambilan sampel selama fermentasi dilakukan setiap 24 jam, miselium bakteri dipisahkan dari kaldu hasil fermentasi dengan cara sentrifugasi 5000 rpm selama 10 menit (Awad dkk., 2009). Parameter yang diamati adalah aktivitas antibakteri, pH, dan berat sel kering (Yücel & Yamaç, 2010). Untuk menentukan berat sel kering, miselium isolat *Streptomyces* G dikeringkan pada 105°C selama 18 - 24 jam sampai diperoleh berat konstan (Yücel & Yamaç, 2010).

Isolasi metabolit antibakteri

Supernatan dari kaldu fermentasi yang diperoleh diekstraksi dengan etil asetat 1:1 (v/v), dikocok selama 1 jam untuk menyempurnakan ekstraksi. Fase etil asetat dipisahkan dari fase air dan diuapkan sampai kering menggunakan *rotavapour* pada suhu 37°C dan residu yang diperoleh ditimbang. Ekstrak yang diperoleh digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan untuk identifikasi dengan KLT-bioautografi (Singh & Pandey, 2009; Kharat dkk., 2009).

Penentuan aktivitas antibakteri

Penyiapan bakteri uji

Sebanyak satu Öse koloni *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 masing-

masing dibiakkan dalam 8 mL kultur media *Nutrient Agar* miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Penyiapan inokulum bakteri uji

Mikroba uji pada agar miring 24 jam ditambah dengan 10 mL larutan steril 0,9% NaCl, kemudian dikocok sampai koloni di permukaan Agar terlepas dan tersuspensi dalam larutan 0,9% NaCl. Inokulum tersebut selanjutnya diukur transmitannya pada panjang gelombang 580 nm dengan spektrofotometer. Transmittan suspensi diatur sampai 25% (Isnaeni dkk., 2017).

Penyiapan media uji

Disiapkan Petri yang diisi dengan media *Nutrient Agar* 12 mL sebagai *base layer*. Selanjutnya diambil masing-masing 8 µL inokulum *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (T 25%) dimasukkan ke dalam 8 mL media *Nutrient Agar* sebagai *sheed layer* (Warsito dkk., 2017). Agar dicetak dengan perforator untuk membuat sumur pencadang dengan diameter 0,7 cm dan kedalaman 1 cm.

Uji potensi antibakteri

Aktivitas antibakteri ditentukan dengan metode difusi agar. Ekstrak kering etil asetat supernatan hasil fermentasi *Streptomyces* G dilarutkan dalam 1 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 7.0). Dipipet 100 µL larutan ekstrak dimasukkan ke dalam sumur agar, setelah seluruh pencadang terisi larutan uji, selanjutnya petri diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar pencadang diukur diamati dan diukur menggunakan jangka sorong (Nampoothiri dkk., 2002).

Optimasi fase gerak KLT

Dibuat beberapa macam sistem eluen dengan berbagai perbandingan. Sebanyak 10 µL larutan sampel dan antibiotik standar 200 ppm ditotolkan pada pelat KLT silica gel F₂₅₄, kemudian dieluasi dengan masing-masing eluen. Pelat KLT hasil eluasi dikeringkan dan noda yang terbentuk diamati di bawah lampu UV dengan atau tanpa penampak noda. Noda yang tampak diberi tanda dan nilai R_f dihitung (Warsito dkk., 2017).

Penapisan daya antibakteri fase gerak

Ditotolkan sebanyak 10 µL fase gerak, antibiotik standar, dan etil asetat sebagai blanko pada pelat KLT. Selanjutnya pelat KLT diletakkan di atas permukaan media *Nutrient Agar* yang telah ditanami bakteri uji, kemudian disimpan di dalam lemari es selama dua jam. Cawan petri dikeluarkan dari lemari es. Selanjutnya pelat KLT diangkat dari permukaan agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona jernih

yang terbentuk pada posisi noda diamati dan diukur diameternya dengan jangka sorong (Warsito dkk., 2017).

Kromatografi lapis tipis

Sebanyak 10 μL ekstrak etil asetat hasil fermentasi *Streptomyces G* dan antibiotik standar 200 ppm ditotolkan pada pelat KLT silica gel F_{254} . Pelat KLT dibuat dua bagian, bagian pertama digunakan untuk bioautografi dan bagian lainnya untuk menentukan profil kromatogram KLT. Pelat dieluasi dengan fase gerak hasil optimasi. Pelat KLT yang telah dieluasi dikeringkan dan noda yang terbentuk diamati di bawah lampu UV 365 nm dengan atau tanpa penampak noda. Noda yang tampak diberi tanda dan nilai R_f dihitung.

KLT-Bioautografi

Bioautogram dibuat dengan cara meletakkan hasil KLT di atas permukaan media *Nutrient Agar* yang mengandung bakteri uji, kemudian disimpan di dalam lemari es (4°C) selama dua jam supaya proses difusi antibiotik dalam noda kromatogram ke media *Nutrient Agar* sempurna. Cawan petri dikeluarkan dari lemari es, pelat KLT diangkat dari permukaan agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona jernih yang terbentuk pada posisi noda diamati dan diukur diameternya dengan jangka sorong.

Uji stabilitas terhadap panas

Larutan ekstrak diuji stabilitasnya terhadap panas dengan meletakkan pelat KLT yang telah berisi ekstrak etil asetat pada suhu 60°C selama 30 menit dan 100°C selama 5 menit. Selanjutnya pelat KLT digunakan untuk uji bioautografi. Zona jernih yang diperoleh dibandingkan dengan larutan tanpa perlakuan panas (Yucel & Yamac, 2009).

Penentuan KHM

Ekstrak kering etil asetat dilarutkan dalam metanol 10% (persentase ini diperoleh dari hasil penelitian pendahuluan dan pada konsentrasi ini pelarut tidak memberikan daya hambat terhadap bakteri uji). Penentuan KHM ini dilakukan menggunakan 96 – well plate steril. Pada penentuan KHM dilakukan seri pengenceran yaitu dari konsentrasi 5000 ppm sampai 10 ppm. Larutan hasil pengenceran disaring dengan membran filter steril Millipore $0,45 \mu\text{m}$ (Yucel & Yamac, 2009). Kemudian sebanyak 100 μL masing-masing filtrat ke dalam well yang telah diisi 20 μL

suspensi bakteri uji. Selanjutnya plate diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Sebanyak 10 μL resazurin ditambahkan ke dalam masing-masing well, kemudian diinkubasi dilanjutkan pada suhu 37°C selama 3 jam. Perubahan warna yang terjadi dinilai secara visual. Setiap perubahan warna dari ungu ke merah muda dicatat sebagai hasil positif (Yucel & Yamac, 2009). Konsentrasi terendah yang menyebabkan terjadinya perubahan warna dicatat sebagai nilai KHM, yaitu konsentrasi minimum yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji.

HASIL DAN DISKUSI

Penetapan ALT starter *Streptomyces G*

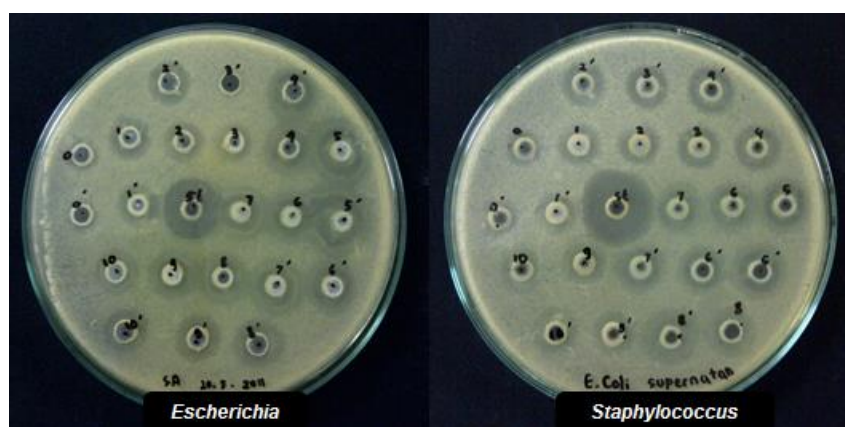
Seri pengenceran suspensi *Streptomyces G* dari 10^{-1} sampai 10^{-15} dilakukan untuk menentukan jumlah *Streptomyces G* yang digunakan selama proses fermentasi. Dari hasil perhitungan angka lempeng total diperoleh jumlah koloni dalam suspensi *Streptomyces G* yang digunakan adalah 50×10^{15} cfu/mL dan menghasilkan transmittan 3,5% pada 530 nm. Tahap ini dilakukan untuk mendapatkan jumlah biomassa yang cukup untuk proses fermentasi dan untuk mendapatkan kondisi yang reproduksibel, fermentasi dilakukan pada fase pertumbuhan atau logaritmik.

Fermentasi isolat *Streptomyces G*

Pertumbuhan dan aktivitas *Streptomyces G* diamati setiap 24 jam selama 10 hari. Puncak aktivitas tercapai pada hari ke-5 (Tabel 1, Gambar 1). Berdasarkan diameter zona yang diperoleh (10 - 15 cm), senyawa aktif dikategorikan lemah). Selanjutnya proses fermentasi dihentikan untuk produksi metabolit aktif. Aktivitas ini spesifik tergantung spesies *Streptomyces*. Hasil ini sesuai dengan hasil yang dilaporkan oleh Singh & Pandey (2009) yang melakukan fermentasi *Streptomyces sp.* selama 3 - 5 hari pada pH 6,9 - 7,0. Pada penelitian ini pH fermentasi berkisar 6,0 - 8,2. Zothanpuia dkk. (2018) melakukan fermentasi *Streptomyces spp.* dari sedimen dalam media LB yang dimodifikasi untuk isolasi senyawa antimikroba dan penapisan aktivitas, dilakukan selama 7 - 15 hari. Kondisi fermentasi untuk memperoleh senyawa aktif penting dioptimasi baik media, pH, suhu dan kecepatan agitasi.

Tabel 1. Profil pertumbuhan dan aktivitas antibakteri supernatan hasil fermentasi *Streptomyces* sp. G dalam media ISP-4 cair

Hari ke-	Diameter zona hambat (mm)		pH	Berat sel kering (x 10 ⁻³ g/10 mL)
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 8739		
0	9,30	9,35	7,16	18,10
1	11,75	12,24	5,99	8,00
2	12,26	13,21	5,96	12,60
3	11,70	13,14	6,04	8,60
4	11,83	12,06	6,55	20,50
5	14,39	13,73	7,25	33,80
6	10,29	11,93	7,61	30,00
7	11,21	13,15	7,95	23,70
8	10,88	13,18	8,01	14,40
9	9,73	10,21	8,16	20,00
10	10,23	9,75	8,16	22,40



Gambar 1. Aktivitas antibakteri supernatan hasil fermentasi *Streptomyces* G terhadap *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 pada hari ke-1 sampai dengan ke-10 inkubasi

Isolasi metabolit antimikroba

Sebanyak 1 L kaldu fermentasi *Streptomyces* G diekstraksi dengan 1 L etil asetat (1:1) dan dikeringkan dengan *rotavapor*, sehingga didapatkan ekstrak kering seberat 830,4 mg. Etil asetat digunakan dengan tujuan mengisolasi senyawa aktif. Solvent yang digunakan untuk ekstraksi tergantung pada karakteristik senyawa aktif yang diisolasi. Singh & Pandey (2009) menggunakan metanol:kloroform untuk melakukan *gradient* elusi menggunakan kromatografi kolom.

Optimasi fase gerak KLT

Hasil optimasi fase gerak diperoleh toluen : etanol (8 : 2) sebagai eluen terpilih, karena menghasilkan nilai R_f 0,2 - 0,8 (Tabel 2 dan Tabel 3) dan diperoleh dua noda yang terpisah. Harga Resolusi (R_s) kedua noda dapat dioptimasi untuk kesempurnaan pemisahan. Nilai R_s ini penting dipertimbangkan untuk analisis lanjut, terutama dengan KLT-bioautografi, karena ada faktor difusi senyawa aktif pada media uji.

Tabel 2. Hasil optimasi fase gerak KLT ekstrak etil asetat supernatan hasil fermentasi *Streptomyces* G

No.	Sistem Fase Gerak	R _f noda	
		Noda 1	Noda 2
I	Metanol : air : etanol (75:20:5)	0	0,93
II	Toluen : etanol : asam asetat (50:40:10)	0,92	-
III	n-butanol : asam asetat (80:20)	0,87	-
IV	Toluen : etanol (8 : 2)	0,48	0,58

Tabel 3. Hasil Pengamatan R_f pada kromatogram KLT menggunakan eluen toluen:etanol (8:2)

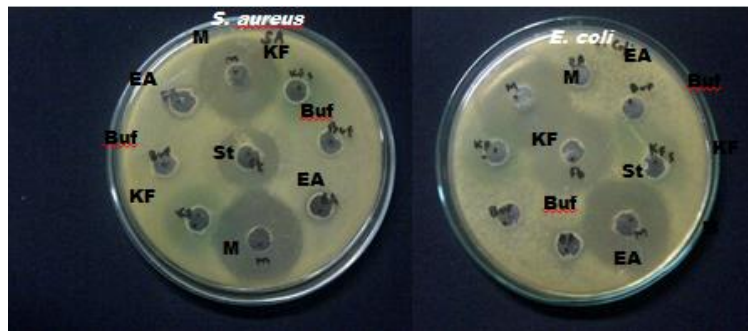
Nama Sampel	Nilai R _f	
	Noda 1	Noda 2
Streptomisin *	-	-
Eritromisin	0,15	-
Tetrasiklin	0	-
Ekstak etil asetat	0,56	0,67
<i>Streptomyces G</i>		

*) noda tidak nampak sehingga R_f tidak dapat dihitung

Kromatografi lapis tipis

Uji aktivitas antibakteri fase gerak terpilih dilakukan untuk mengetahui pengaruh fase gerak terhadap pertumbuhan bakteri uji. Hasil pengamatan (Gambar 2) menunjukkan bahwa fase gerak yang terpilih memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri

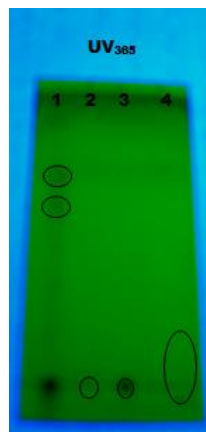
uji. Selanjutnya, perlu dilakukan pemanasan untuk menghilangkan sisa fase gerak dari pelat KLT sebelum dilakukan uji bioautografi. Hasil uji stabilitas terhadap panas menunjukkan bahwa noda stabil terhadap perlakuan panas.



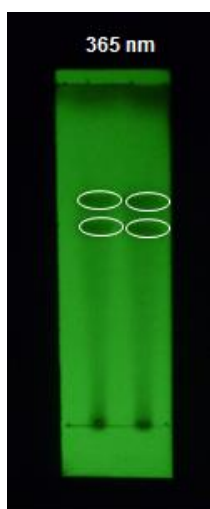
Gambar 2. Penapisan daya hambat ekstrak etil asetat supernatan hasil fermentasi *Streptomyces G* dalam dapar fosfat 0,2 M pH 7,0 terhadap *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; M = ekstrak etil asetat *Streptomyces G* dalam buffer fosfat 0,2 M pH 7,0; EA = etil asetat; Buf = dapar fosfat 0,2 M; KF = kaldu fermentasi (sebelum diekstraksi); St = antibiotik standar (streptomisin 200 ppm)

Berdasarkan data kromatogram dapat dinyatakan bahwa senyawa dalam ekstrak etil asetat hasil fermentasi *Streptomyces G* tidak sama dengan antibiotik standar yang digunakan (Gambar 3). Selanjutnya noda yang dihasilkan ekstrak etil asetat yang diamati di

bawah lampu UV pada panjang gelombang yang berbeda menunjukkan bahwa pada λ₂₅₄ hanya terdeteksi satu noda, sedangkan pada λ₃₆₅ teramati dua noda (Gambar 4).



Gambar 3. Kromatogram KLT di bawah sinar UV₃₆₅ dan dengan penampak noda larutan anisaldehyd 1 = ekstrak etil asetat hasil fermentasi *Streptomyces G*; 2 = streptomisin; 3 = tetrasiklin; 4 = eritromisin

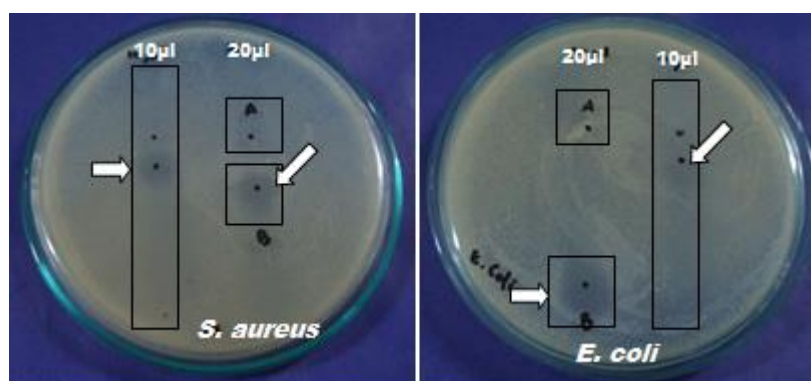


Gambar 4. Kromatogram KLT ekstrak etil asetat supernatan hasil fermentasi *Streptomyces G* menggunakan fase gerak toluen:etanol (8:2) di bawah sinar UV 365 nm

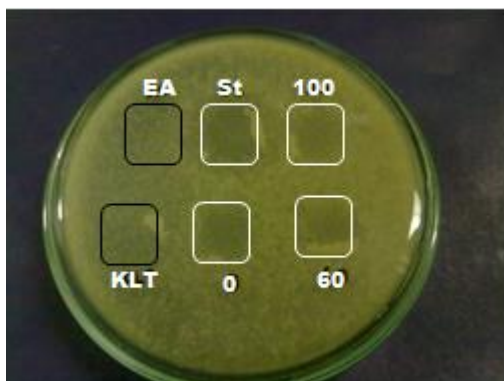
KLT-bioautografi

Pada uji bioautografi noda yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji hanya noda dengan R_f 0,56. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona jernih pada bioautogram (Gambar 5). Bioautogram ekstrak etil asetat setelah perlakuan panas menunjukkan daya hambat, yang menunjukkan stabilitas senyawa aktif dalam ekstrak (Gambar 6). Teknik analisis yang banyak dibahas oleh Choma (2005) ini sangat menguntungkan, terutama untuk memisahkan campuran antibiotika, karena minimal diperoleh tiga informasi dari teknik ini, (1) jumlah senyawa, (2) aktivitas senyawa secara kualitatif, dan (3) potensi aktivitasnya. KLT-densitometri dapat digunakan untuk mendeteksi campuran analit dalam

kromatogram, tetapi tidak mampu memberikan informasi aktivitasnya. Sebagai contoh gentamisin yang terdiri dari tiga komponen yang dapat dipisahkan dengan KLT dan diamati dengan densitometer (Isnaeni dkk., 2016), namun tidak dapat diketahui perbandingan aktivitas antibakteri ketiga komponen tersebut. Validasi metode KLT-bioautografi untuk penentuan kadar streptomisin sulfat telah dilakukan Warsito dkk. (2017) dan memberikan hasil yang memenuhi parameter validasi. Bakteri uji perlu diperbanyak untuk representasi aktivitas antimikroba senyawa yang terdeteksi pada kromatogram. Senyawa yang tidak aktif dengan mikroba uji yang digunakan pada penelitian ini dapat diujikan dengan galur atau spesies mikroba uji lain baik bakteri maupun jamur patogen.



Gambar 5. Profil KLT-bioautogram ekstrak etil asetat *Streptomyces G* terhadap *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (tanda panah menunjukkan noda yang aktif menghambat bakteri uji)

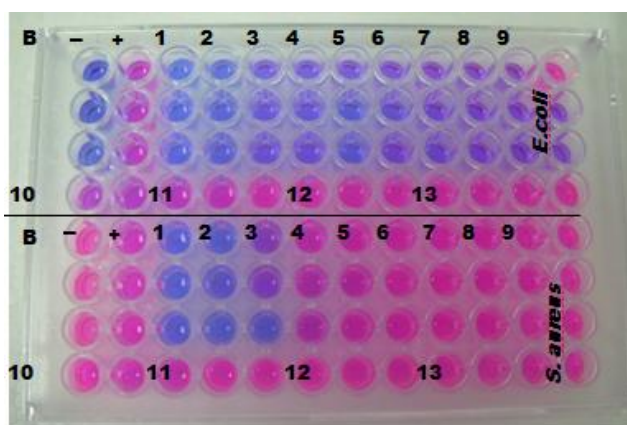


Gambar 6. Profil KLT-bioautogram ekstrak etil asetat supernatan hasil fermentasi *Streptomyces* G setelah perlakuan panas. EA = etil asetat; KLT = pelat KLT, St = standar tetrasiklin; 0 = Sampel tanpa perlakuan panas; 60 = Sampel setelah dipanaskan 60°C selama 30 menit; 100 = Sampel setelah dipanaskan 100°C selama 5 menit

Penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM)

Pada penentuan KHM menggunakan uji modifikasi resazurin, aktivitas antibakteri ditandai dengan terbentuknya perubahan warna dari ungu menjadi merah muda (Gambar 7). Warna ungu atau biru menggambarkan adanya aktivitas antibakteri, sehingga bakteri uji tidak dapat tumbuh. Warna merah muda

mengindikasikan adanya pertumbuhan bakteri uji. Berdasarkan data yang diperoleh ekstrak etil asetat hasil fermentasi *Streptomyces* G memiliki nilai KHM 128,75 ppm dan 2575 ppm masing-masing terhadap *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gambar 7).



Gambar 7. Konsentrasi hambat minimum ekstrak metanol 10% supernatan hasil fermentasi *Streptomyces* G terhadap *Escherichia coli* ATCC 8739 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 menggunakan resazurin sebagai indikator. B = blanko (media *Nutrient Broth*); - = kontrol negatif (metanol 10%); + = streptomisin 202 ppm (kontrol positif); 1 = ekstrak dalam metanol 10% (5150 ppm); 2 = ekstrak dalam metanol 10% (2575 ppm); 3 = ekstrak dalam metanol 10% (1030 ppm); 4 = ekstrak dalam metanol 10% (772,5 ppm); 5 = ekstrak dalam metanol 10% (515 ppm); 6 = ekstrak dalam metanol 10% (257,5 ppm); 7 = ekstrak dalam metanol 10% (206 ppm); 8 = ekstrak dalam metanol 10% (128,75 ppm); 9 = ekstrak dalam metanol 10% (103 ppm); 10 = ekstrak dalam metanol 10% (77,25 ppm); 11 = ekstrak dalam metanol 10% (51,5 ppm); 12 = ekstrak dalam metanol 10% (25,75 ppm); 13 = ekstrak dalam metanol 10% (10,3 ppm)

KESIMPULAN

Ekstrak *Streptomyces* G mengandung 2 senyawa yang berbeda dan hanya ada satu senyawa (R_f 0,53) yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 serta *Escherichia coli* ATCC 8739.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Research Group Isolasi senyawa aktif dari *Streptomyces* sp., *outbound Students program* yang telah memfasilitasi penelitian ini bekerjasama dengan UITM.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Ansari, M., Alkubaisi, N., Vijayaragavan, P. & Murugan, K. (2019). Antimicrobial Potential of *Streptomyces* Sp. to the Gram Positive and Gram Negative Pathogens. *Journal of Infection and Public Health*; 12; 861–866.
- Al-Dhabi, N. A., Ghilan, A. M., Esmail, G. A., Arasu, A. V., Duraipandiyani, V. & Ponmurugan, K. (2019). Bioactivity Assessment of the Saudi Arabian Marine *Streptomyces* Sp. Al-Dhabi-90, Metabolic Profiling and Its in Vitro Inhibitory Property against Multidrug Resistant and Extended-Spectrum Beta-Lactamase Clinical Bacterial Pathogens. *Journal of Infection and Public Health*; 12; 549–56.
- Awad, H. M., El-Sahed, K. & El-Nakkadi, A. (2009). Isolation, Screening and Identification of Newly Isolated Soil *Streptomyces* (*Streptomyces* Sp. NRC-35) for b-Lactamase Inhibitor Production. *World Applied Sciences Journal*; 17; 637–646.
- Choma, I. (2005). The Use of Thin-Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis. *Chromatography Online*; 18; 482–488.
- Cuesta, G., García-de-la-Fuente, G., Abad, M. & Fornes, F. (2012). Isolation and Identification of Actinomycetes from a Compost-Amended Soil with Potential as Biocontrol Agents. *Journal of Environmental Management*; 95; S280–S284.
- Gebreyohannes, G., Moges, F., Sahile, S. & Raja, N. (2013). Isolation and Characterization of Potential Antibiotic Producing Actinomycetes from Water and Sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; 3; 426–435.
- Hopwood, D. A. (2007). *Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers*. Oxford; University Press.
- Isnaeni, Astuti, A. & Yuwono, M. (2017). Validation of Thin-Layer Chromatography-Bioautographic Method for Determination of Streptomycin. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*; 4; 34–38.
- Isnaeni, Kusumawati, I., Warsito, M. F., Darmawati, A. & Mertaniasih, N. M. (2016). Antimicrobial Activity of *Streptomyces* Sp. Isolates from Vegetable Plantation Soil. *Berkala Penelitian Hayati*; 21; 69–74.
- Kharat K. R., Kharat A. & Hardikar, B. P. (2009). Antimicrobial and Cytotoxic Activity of *Streptomyces* sp. from Lonar Lake. *African Journal of Biotechnology*; 8; 6645–6648.
- Nampoothiri, K. M., Ramachandran, S., Soccol, C. R. Pandey, A. (2002). Advances in Fermentation Technology. *International Sugar Journal*; 104; 493–499.
- Pandey, B., Prakash, G. & Vishwanath, P. A. (2004). Studies on the Antibacterial Activity of the Actinomycetes Isolated from the Khumbu Region of Nepal. *Journal of Applied Microbiology*; 12; 421–423.
- Singh, P. N. N. & Pandey, A. (2009). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Dordrecht: Springer.
- Valli, S., Suvathi, S. S., Aysha, O. S., Nirmala, P., Kumar, P. V. & Reena, A. (2012). Antimicrobial Potential of Actinomycetes Species Isolated from Marine Environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; 2; 469–473.
- Warsito, M. F., Nasution, N. E., Merthaniasih, N. M., Poernomo, A. T., Fairuz, D. & Hanifah, A. (2017). Antibacterial Activity of Butanol Extract from Cell Free Fermentation Broth of *Streptomyces* Sp. Isolated from Vegetable Plantation Soil. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*; 8; 1921–1927.
- Yücel, S. & Yamaç, M. 2010. Selection of *Streptomyces* Isolates from Turkish Karstic Caves against Antibiotic Resistant Microorganisms. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*; 23; 1–6.
- Zothanpuia, A., Passari, K., Preeti, C., Vineet, K., Mishra, B. K. & Bhim, P. S. (2018). Production of Potent Antimicrobial Compounds from *Streptomyces cyaneofuscatus* Associated with Fresh Water Sediment. *Frontier Microbiology*; 10; 1681.