

**PROFIL KLT-BIOAUTOGRAFI DAN DENSITOMETRI FRAKSI
TERAKTIF (Isolat Kp13) DARI BAKTERI RIZOSFER KAYU
PUTIH (Melaleuca leucadendron L.)**

**PROFILE OF TLC-BIOAUTOGRAPHY AND DENSITOMETRY OF
ACTIVE FRACTIONS (Isolate KP13) FROM RIZOSPHERE OF
WHITE WOOD (*Melaleuca leucadendron L.*) BACTERIA**

Alfian Syarifuddin^{1*}, Nanik Sulistyani², Kintoko²

¹. S1 Farmasi, Universitas Muhammadiyah Magelang, Jl. Mayjen Bambang Soegeng No.RT.02, Glagak, Sumberrejo, Kec. Mertoyudan, Magelang, Jawa Tengah 56172 Indonesia

². Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Jl. Prof. DR. Soepomo SH, Warungboto, Kecamatan Umbulharjo, Yogyakarta 55164. Indonesia.

Submitted: 01-10-2018

Revised: 4-12-2018

Accepted: 06-01-2019

*Corresponding author
Alfian Syarifuddin

Email:
alfiansy@umngl.ac.id

ABSTRAK

Angka kejadian infeksi yang disebabkan oleh bakteri khususnya di Indonesia masih tinggi. Pengobatan infeksi dengan menggunakan antibiotik terkendala dengan kasus resistensi terhadap antibiotik sehingga perlu dilakukan eksplorasi mikroorganisme-mikroorganisme yang dapat menghasilkan antibiotik. Antibiotik yang dihasilkan oleh isolat bakteri KP13 berpotensi sebagai antibiotik terhadap *Escherichia coli*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui profil KLT-Bioautografi menggunakan fase gerak Kloroform:Etilasetat:Metanol (4:1:0,5) dan analisis Densitometri fraksi teraktif dari isolat bakteri KP13 yang berpotensi sebagai antibiotik terhadap bakteri *Escherichia coli* serta mengetahui senyawa yang bertanggung jawab dalam aktivitas penghambatan terhadap bakteri tersebut. Senyawa aktif dianalisis menggunakan GC-MS. Hasil penelitian menunjukkan bercak aktif pada saat KLT-Bioautografi dengan nilai Rf 0,77. Senyawa yang diduga bertanggung jawab terhadap aktifitas antibiotik yang terdeteksi alat GC-MS pada nilai Rf 0,77 mempunyai kelimpahan yang tinggi, yaitu senyawa *cycloheptatriene* sebesar 89% dan *tetrahydrophyran* sebesar 74%.

Kata kunci : *Densitometri, Escherichia coli, Isolat KP13, KLT-Bioautografi*

	<p>ABSTRACT</p> <p>The rate of infection, especially in Indonesia is still high. Treatment of infections by using antibiotics is constrained by cases of resistance to antibiotics so that it is necessary to explore microorganisms that can produce antibiotics. Antibiotics produced by KP13 bacterial isolates have the potential as antibiotics against <i>Escherichia coli</i>. The purpose of this study was to determine the TLC-Bioautography profile using the mobile phase of chloroform : ethylacetate : methanol (4 : 1 : 0,5) and Densitometry analysis of the most active fraction of KP13 bacterial isolates which have the potential as antibiotics against <i>Escherichia coli</i> bacteria. The active compounds were analyzed using GC-MS. The results showed active spots during TLC-Bioautography with an Rf value of 0.77. Compounds that are thought to be responsible for antibiotic activity detected by GC-MS at an Rf value of 0.77 have similarities with the compounds of cycloheptatriene (89%) and tetrahydrophyran (74%).</p> <p>Keywords: Densitometry, <i>Escherichia coli</i>, KP13 Isolate, TLC-Bioautography.</p>
--	---

1. PENDAHULUAN

Prevalensi penyakit tingkat infeksi masih belum menunjukkan penurunan dari tahun ke tahun. Faktor yang menyebabkan tingginya kasus infeksi adalah penggunaan antibiotika yang tidak benar. Bakteri Gram negatif yang paling sering menyebabkan infeksi adalah *Escherichia coli*. Di Indonesia, bakteri gram negatif yang sering menjadi penyebab infeksi nosokomial cenderung resisten terhadap antibiotik yang digunakan [1]. Pengobatan menggunakan antibiotik masih mendapatkan kendala, yaitu adanya faktor resistensi bakteri terhadap antibiotik yang sudah ada. Oleh karena itu, perlu dilakukan eksplorasi galur-galur mikroba baru yang dapat menghasilkan antibiotik yang mempunyai potensi yang lebih tinggi dan potensi efek resistensi yang sangat rendah, contohnya dari rizosfer [2]. Actinomycetes dapat menghasilkan senyawa bioaktif antibiotika (70 %), fungi (20 %) dan bakteri (10%) [3].

Hasil penelitian isolasi salah satu isolat Actinomycetes yaitu isolat A16.1 yang berasal dari tanah NTT dilakukan pemisahan senyawa antibiotik dengan KLT menggunakan fase gerak kloroform:metanol dan fase diam silica gel yang menghasilkan 2 bercak. Bioautografi kemudian dilakukan terhadap kromatogram tersebut. Hasil bioautografi menunjukkan aktivitas antibiotik pada Rf 0,41 terhadap *Micrococcus lutens* dan *Staphylococcus aureus*. KLT Bioautografi terhadap 5 isolat dari rizosfer *Ficus carica* L., yaitu T19, T24, T25, T37, dan T43 diperoleh isolat T25 terdapat potensi antibiotik pada nilai Rf 0,91[4]. Fraksinasi ekstrak etil asetat isolat KP13 menggunakan gradien eluen heksan -etil asetat sehingga diperoleh fraksi teraktif dan menganalisis mekanisme molekuler dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* melalui kebocoran sel[5]. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa yang bertanggung jawab dalam aktivitas penghambatan tersebut melalui analisis profil KLT-Bioautografi, Densitometri, dan GCMS[5].

2. METODE

Penelitian Ini Merupakan Penelitian Eksperimental Di Bidang Mikrobiologi Farmasi. *Starch Nitrate* Agar/Broth, Nutrient Agar, *Mueller Hinton* Agar, *Escherichia coli* ATCC25922, ethyl

acetate, TLC plate, Densitometri CANMAG 4, Cawan Petri, Inkubator, Alat gelas. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah Isolat bakteri hasil isolasi dari rizosfer tanaman kayu putih (isolat KP 13). Pembuatan starter dilakukan dengan cara mengambil seperempat bagian plate isolat KP 13 dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL yang berisi media SNB steril sebanyak 50 mL [6]. Inkubasi pada suhu kamar selama 5 hari dengan pengadukan menggunakan magnetik stirer [7]. 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 [8].

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. Sebanyak 19 gram serbuk media MHA dilarutkan dalam akuades sebanyak 500 ml dengan dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Sterilisasi dilakukan menggunakan autoklav pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu dituang pada Cawan Petri dan ditunggu sampai agar memadat. Stok bakteri diambil sebanyak 100 µL dilarutkan dalam 1 mL BHI, diinkubasi selama 18-24 jam. Setelah itu diambil 100 µL dimasukkan ke dalam BHI 1 mL, dan diinkubasi selama 3-5 jam di dalam inkubator. Kemudian sebanyak 100 µL bakteri diambil dan diencerkan dengan NaCl 0,9% sampai kekeruhan sama dengan standar *Mc Farland* 10⁸ CFU/mL [9]. Fraksi teraktif, heksan: etil asetat (9:1) yang ditotolkan pada plat silika gel F₂₅₄, kemudian dikembangkan dengan fase gerak yang sesuai untuk pemisahan senyawa-senyawa yang terdapat dalam fraksi, dalam penelitian ini digunakan fase gerak kloroform : Etilasetat : Metanol (4:1:0,5). Kromatogram diletakkan pada media *Mueller Hinton* yang telah ditanami bakteri *Escherichia coli*. Plat kromatogram dibiarkan menempel pada media selama 30 menit, setelah 30 menit plat kromatogram diangkat. Kemudian dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37⁰ C selama 24 jam. Setelah 24 jam diinkubasi, dilakukan pengamatan dengan melihat zona hambat yang terbentuk sebagai daerah terang yang tidak ditumbuhi bakteri [10]. Analisis Densitometri menggunakan instrumen Densitometri CANMAG 4 pada panjang gelombang 254 nm. Kandungan senyawa antibiotik dalam fraksi dari ekstrak etil asetat di analisis dengan *Gass Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis komponen senyawa antibiotik dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). KLT merupakan metode pemisahan senyawa kimia secara kimia-fisika berdasarkan perbedaan kecepatan migrasi atau rasio distribusi dari komponen campuran dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak [11]. Penelitian ini menggunakan sampel kelompok fraksi teraktif dengan konsentrasi 40% sebanyak 10 µL sehingga totalan mengandung (4mg). Fase diam yang digunakan pada penelitian ini adalah silika gel F₂₅₄ optimasi fase gerak dan diperoleh fase gerak optimal Kloroform : Etilasetat : Metanol (4:1:0,5). Cara untuk melihat pola pemisahannya, kromatogram tersebut dideteksi dengan lampu UV 254 nm, kemudian ditentukan nilai Rfnya [12]. Uji biotografi menunjukkan potensi aktivitas antibiotik yang menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada nilai Rf 0,77 (**Gambar 2**).

Penelitian bioautografi lainnya pada 5 isolat yang digunakan, yaitu T19, T24, T25, T37 dan T41 pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* hanya isolat T25 yang mempunyai spot yang aktif menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dengan nilai Rf 0,91 [4]. Hasil pembacaan KLT-densitometri dengan panjang gelombang 254 nm menunjukkan pada nilai Rf 0,76 diduga sebagai bercak yang aktif/ berpotensi sebagai antibiotik yang ditinjau dari kedekatan antara nilai Rf hasil *scanning* dengan nilai Rf hasil uji bioautografi. Dari hasil pengujian KLT Bioautografi diperoleh spot/ bercak yang aktif menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada spot yang mempunyai nilai Rf 0.77. Hasil tersebut menguatkan dugaan puncak pada analisis KLT-Densitometri bahwa puncak yang dominan dan muncul pada kisaran Rf 0,7-0,8 pada masing-masing panjang gelombang yang digunakan (**Gambar 1**). Hasil analisis menggunakan panjang gelombang 254 nm, menghasilkan 6 *spot*. Profil kromatogram dan nilai Rf yang diperoleh dari masing-masing *track* pada (**Tabel I**). Kandungan senyawa antibakteri dalam fraksi etil asetat di

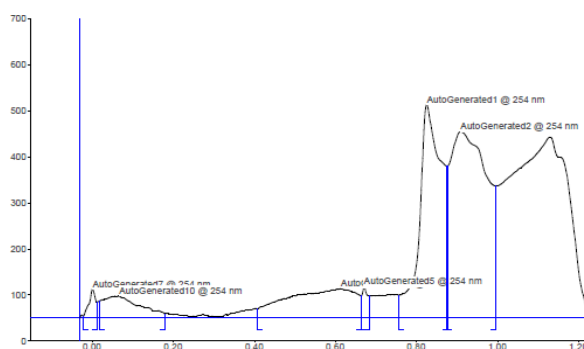
analisis dengan *Gass Chromatography- Mass Spectroscopy* (GC-MS). Senyawa aktif yang terdapat dalam fraksi diisolasi dengan menggunakan KLT preparatif dengan fase diam aluminium silika gel F₂₅₄. Plat KLT yang telah di elusi diamati secara langsung dan di bawah lampu UV254, kemudian ditandai bagian spot yang dapat menghambat penghambatan bakteri *Escherichia coli* dengan meninjau nilai Rf pada uji bioautografi, kemudian bagian tersebut dikerok dan dilarutkan dalam etil asetat serta disaring. Filtrat hasil saringan dilakukan analisis GC- MS. Senyawa yang dicurigai hasil analisis GC MS yang berpotensi sebagai antibiotik adalah *cycloheptatriene* dan *Tetrahydrophyran* (Tabel III).

Senyawa – senyawa aromatik yang mempunyai cincin benzene akan menyerap sinar UV pada panjang gelombang 254 nm (Caims, 2008). Salah satu senyawa yang terdeteksi pada analisis GC-MS adalah *Cycloheptatriene* yang mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi atau molekul kromofor. Oleh karena itu, fraksi kelompok 1 dari isolat KP 13 yang mengalami pemadaman pada bercak hasil elusi pada KLT mengandung ikatan rangkap terkonjugasi dari senyawa *cycloheptatriene*. sintesis dan ujiaktivitas amin dan imin yang berikatan dengan fragmen *Cycloheptatriene* menghasilkan *N*-Benzylidene- 4-(1-cyclohepta-2,4,6-trienyl)aniline, *N*-(4-methoxyphenylmethylene)-4¹-(1-yclohepta- 2,4,6-trienyl)aniline, dan *N*-benzylidene-4-(5-dibenzo[α,d]cyclohepten-5-yl) aniline dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi >1000 μ g/ml. Sedangkan, komponen *N*-benzylidene-4-(1-cyclohepta-2,4,6trienyl)aniline dan 4-(5-dibenzo[α, d] cyclohepten-5-yl)aniline pada konsentrasi 1000 μ g/ml dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *candida albicans* [13]. Jadi fragmen *cycloheptatriene* yang berikatan dengan amin atau imin lebih bagus dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* dan jamur *Candida albicans* daripada bakteri gram positif/ *Staphylococcus aureus*.

Tabel 1. Hasil pengamatan visual bercak hasil elusi pada lampu UV 254 dan 366

peak	Rf track	Rf track	Rf track
	1(254nm)	2(254nm)	3(254nm)
1	0,66	0,66	0,66
2	0,75	0,75	0,75
3	0,77	0,77	0,77
4	0,8	0,8	0,8
5	0,94	0,94	0,94

Sumber: Data yang diolah (2018)



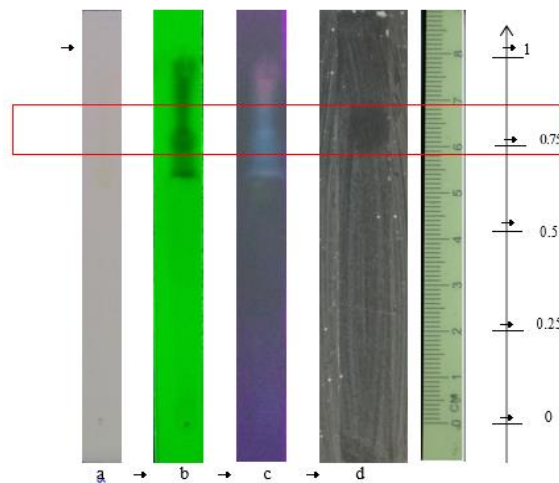
Sumber: Data yang diambil (2018)

Gambar 1. Analisis kromatogram hasil elusi KLT fraksi kelompok 1 menggunakan CANMAG-4 Scanner pada panjang gelombang 254 nm

Tabel 2. Analisis hasil elusi KLT fraksi kelompok 1 menggunakan CANMAG-4 Scanner pada panjang gelombang 254 nm

Peak	Rf	Area (%)	λ_{max} (nm)
1	-0.02	1.34	289
2	0.02	5.64	282
3	0.41	13.69	200
4	0.67	1.21	200
5	0.76	31.81	200
6	0.88	46.31	200

Sumber: Data yang diolah (2018)



Sumber: Data yang diambil (2018)

Gambar 2. Hasil Uji Bioautografi Kelompok Fraksi Teraktif Terhadap *Escherichia coli*

Tabel 3. Data GC-MS fraksi kelompok 1 isolat KP 13

Waktu Retensi (menit)	Senyawa	Kelimpahan (%)	Kemiripan (%)
1.378	Air	0.36	94
1.431	2-Propanol (CAS) Isopropyl alcohol	0.61	98
1.475	BETA.-D4-Tetrahydropyran	60.54	74*
1.642	1,2,4,5-Tetrabromo 3,6 dihexyloxybenzene	0.36	60
1.682	Ethyl acetate	1.53	94
1.833	1,3,5-Cycloheptatriene	36.40	89*

2.000	1,2,4,5 Tetrabromo 3,6 dihexyloxybenzene	0.21	60
-------	--	------	----

Sumber: Data yang diolah (2018)

4. KESIMPULAN

Bercak yang berpotensi antibiotik dengan perbandingan fase gerak heksan:etil asetat:metanol (4:1:0,5) yaitu pada nilai Rf 0,77 dan senyawa yang berpotensi sebagai antibiotik yang dicurigai dari hasil analisis GC-MS mempunyai kemiripan terhadap *cycloheptatriene* dan *Tetrahydrophyran*.

5. CONFLICT OF INTEREST

The author declares that there no competing conflicts of interest.

6. DAFTAR PUSTAKA)

- [1] B. C. P. Indrayudha dan M Kuswandi, "Chudlori, B., Kuswandi, M., Indrayudha, P., 2012, Pola Kuman dan Resistensinya Terhadap Antibiotika dari Spesimen PUS di RSUD Dr. Moewardi Tahun 2012, Pharmacon," *Pharmaceutical Journal of Indonesia*, vol. 13, no. 2, hlm. 1411–4283, 2012.
- [2] T. Rahayu, "MULTIRESISTEN BACTERIA," *J. Penelit. Sains Teknologi.*, vol.7, no. 2, hlm. 81-91, 2006.
- [3] H. Rante dan Y. B. Murti, "Purifikasi dan karakterisasi senyawa anti- bakteri dari actinomycetes asosiasi spons terhadap bakteri patogen resisten," hlm. 8, 2010.
- [4] I. Narwanti dan N. Sulistyani, "TLC-Bioautography Profile of Ethyl Acetate Extract of 5 Bacteria Isolated from Ficus carica L Rhizosphere," *Int. J. Public Health Sci. IJPHS*, vol. 4, no. 2, hlm. 81, Jun 2015.
- [5] A. Syarifuddin dan N. Sulistyani, "Activity of Antibiotic Bacterial Isolate Kp13 and Cell Leakage Analysis of Escherichia coli Bacteria," *J. Ilmu Kefarmasian Indones.*, vol. 16, no. 2, hlm. 137–144, Okt 2018.
- [6] 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," *Indones. J. Biotechnol.*, vol. 16, no. 1, hlm. 1–10, 2011.
- [7] 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, 2010.
- [8] Department of Microbiology, Hindustan 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, hlm. 148–156, Des 2011.
- [9] Mulyadi dan N. Sulistyani, "AKTIVITAS CAIRAN KULTUR 12 ISOLAT ACTINOMYCETES TERHADAP BAKTERI RESISTEN," *J. Kesehat. Masy. J. Public Health*, vol. 7, no. 2, Des 2013.
- [10] H. Marisa, "Isolasi Senyawa Antibakteri Dari Daun Jengkol (*Pithecolobium lobatum* Benth) dan Penentuan Nilai KHM-nya," *J. Penelit. Sains*, vol. 14, no. 1, hlm. 38–41, 2011.
- [11] E. Kusumaningtyas dan E. Astuti, "Sensitivitas Metode Bioautografi Kontak dan Agar Overlay dalam Penentuan Senyawa Antikapang," vol. 6, hlm. 6, 2008.
- [12] P. Moncheva, S. Tishkov, N. Dimitrova, V. Chipeva, S. Antonova-Nikolova, dan N. Bogatzevska, "CHARACTERISTICS OF SOIL ACTINOMYCETES FROM ANTARCTICA," *J. Cult. Collect.*, vol. 3, hlm. 3–14, 2002.

- [13] L. P. Y. G. A. Aleksandrova dan T. A. Akent'eva, "Synthesis and Antimicrobial Activity of Amines and Imines with a Cycloheptatriene Fragment," *Pharmaceutical Chemistry Journal*, vol. 46, no. 12, 2013.