

OPTIMASI PRODUKSI SENYAWA ANTIMIKROBIA PADA *CELL FREE EXTRACT* HASIL FERMENTASI BAKTERI TERMOFILIK PASCA ERUPSI MERAPI

OPTIMIZATION OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCE PRODUCTION IN *CELL FREE EXTRACT* FROM THERMOPHYLIC BACTERIA FERMENTATION AFTER MERAPI ERUPTION

Evy Yulianti*, Anna Rakhmawati, dan Kartika Ratna Pertiwi

Jurusan Pendidikan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Yogyakarta

*email: evy_yulianti@yahoo.com

diterima 1 September 2015, disetujui 10 September 2015

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi medium dengan pH (6,7,9), kadar garam (0,5; 1; 2 %), dan waktu fermentasi (24 dan 48 jam) terhadap aktivitas *cell free extract* yang mengandung senyawa antimikrobia terhadap tiga mikrobia uji yaitu *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albican*. Penelitian meliputi tahapan produksi senyawa antimikrobia dengan medium yang berbeda pH, kadar garam, dan waktu fermentasi kemudian dilanjutkan dengan uji senyawa antimikrobia terhadap bakteri dan fungi patogen yaitu *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albican* menggunakan metode Kirby Bauer menggunakan paper disk. Kadar garam, pH dan lama fermentasi yang berbeda mempengaruhi kemampuan antimikrobia *cell free extract* yang dihasilkan. Perlakuan yang menghasilkan CFE dengan aktivitas antimikrobia terbaik adalah perlakuan dengan waktu fermentasi 24 jam, dengan pH 7 dan kadar garam 2% pada *S aureus* dan pH 6 kadar garam 1% pada *E coli*. *Cell free extract* yang dihasilkan tidak berpotensi sebagai antifungi terhadap *Candida albicans* kecuali CFE yang dihasilkan dari proses fermentasi bakteri termofilik pada pH 7 dan kadar garam 1% selama 1 hari dengan indeks zona hambat sebesar 1,17.

Kata kunci: *cell free extract*, antimikrobia, pH, kadar garam, lama fermentasi

Abstract

The aims of this study was to investigate the effect of medium with different pH (6,7,9), salt concentration (0,5; 1; 2 %) and fermentation periode (24 and 48 hr) to the antimicrobial activity of *cell free extract* to three pathogens, *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albican*. This study consists of antimicrobial compounds production with different medium and continued by antimicrobial tested to fungi and bacterial pathogens *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albican* by Kirby Bauer method with paper disk. Different salt concentration, pH and fermentation periode affected the antimicrobial activity potency of *cell free extract* yielded by thermophylic bacteria. Treatment which yielded CFE with the best antimicrobial activity was treatment with 24 hr fermentation, pH 7 and salt concentration 2% to *S aureus* and pH 6 salt concentration 1% to *E coli*. *Cell free extract* had no potency as antifungi to *Candida albicans* except CFE yielded by thermophylic bacteria fermented in medium with pH 7 and salt concentration 1% in 24 hr with inhibition zone index 1,17.

Keywords: *cell free extract*, antimicrobial, pH, salt concentration, fermentation period

Pendahuluan

Resistensi sel, bakteri patogen dan virus mengalami peningkatan dan beberapa obat terapi yang sudah ada tidak lagi efektif untuk mengatasinya. Produk alami memiliki potensi sebagai dasar agen terapi untuk permasalahan tersebut [1,2]. Mikroorganisme menggunakan berbagai macam cara untuk meningkatkan resistensinya terhadap obat. Bisa melalui transfer gen horisontal (plasmid, transposon and

bacteriophages), rekombinasi dengan DNA asing pada kromosom bakteri dan mutasi pada lokus kromosom yang berbeda [3].

Bakteri merupakan sumber senyawa kimiawi yang tidak habis-habisnya, yang menghasilkan berbagai macam metabolit sekunder aktif. Bakteri yang berasal dari laut biasanya merupakan target untuk bioteknologi industri karena memiliki sejumlah besar senyawa bioaktif. Produksi

senyawa bioaktif ini disebabkan karena tekanan lingkungan di mana tumbuhnya, seperti kompetisi, perlawanan terhadap predator dan reproduksi [4]. Setelah penemuan penicillin, mikrobia telah banyak digunakan sebagai sumber agen bioaktif. Aplikasi terapi dari metabolit yang dihasilkan mikrobia telah memberikan peluang untuk penemuan antibiotik lain seperti penicillin, erythromycin, streptomycin, amphotericin and polyketides [5].

Antibiotika merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh organisme tertentu, yang dalam jumlah kecil mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan organisme lain. Antibiotika dapat diklasifikasikan menjadi antibakteri, anti jamur, anti amoeba dan lain lain. Beberapa antibiotik diperoleh dari berbagai mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan yang ekstrim, seperti daerah suhu tinggi, suhu rendah, laut bagian dalam, padang pasir, lapisan es, sumber air panas dan minyak [6].

Bakteri memproduksi antibiotika pada fase stasioner dalam siklus kehidupannya, karena pada fase ini mulai terjadi persaingan mendapatkan nutrisi. Untuk memenangkan persaingan, bakteri memproduksi antibiotik untuk menghambat/membunuh pertumbuhan mikroorganisme lainnya. Isolasi antibiotika, umumnya bakteri penghasil antibiotika ditanam (difermentasi) dalam medium cair tertentu sampai fase stasionernya. Proses fermentasi bakteri harus berlangsung pada kondisi optimal, baik kondisi nutrisi maupun kondisi lingkungannya. Supernatan dari cairan fermentasi dipisahkan dari sel bakteri melalui berbagai metode, seperti sentrifugasi, filtrasi atau melalui pengendapan [8]. Semakin diperlukannya senyawa antimikrobia baru yang lebih poten menyebabkan semakin banyak penelitian mengenai senyawa antimikrobia ini, seperti eksplorasi organisme penghasil antimikrobia, identifikasi senyawa antimikrobia yang dihasilkan sampai optimasi produksi senyawa antimikrobia. Penelitian ini akan difokuskan pada optimasi kondisi medium fermentasi yang dapat menghasilkan senyawa antimikrobia yang memiliki potensi paling besar dalam menghambat pertumbuhan 3 mikroba uji, yaitu *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albican*.

Metode Penelitian

Bahan yang digunakan antara lain adalah isolat bakteri termofilik yang diperoleh dari Kali

Gendol pasca erupsi Merapi, Medium Nutrient Broth (NB Oxoid), Nutrient Agar (NA Oxoid), Potato Dextrose Agar (PDA Oxoid), paper disk microbial test blank (Oxoid), NaCl (Merck), NaOH (Merck), HCl (Merck), kertas saring, tissue, tabung flakon, tabung 1,5 mL (Eppendorf)

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain adalah tabung reaksi (Pyrex), Timbangan analitik (AND HF-300), Laminar Air Flow (LAF Shimadzu type SCB-1000A), petridish (Pyrex), erlenmeyer (Pyrex), ose, mikropipet (Sibata), autoklaf (ALP-KT23), lemari es, sentrifuge (Kokusan type H-103), inkubator (Eyela type SLI-600N), jangka sorong, water bath, shaker, vortex (Sibata), hot plate (Eyela type BI-63).

Persiapan inoculum. Bakteri termofilik ditumbuhkan pada nutrient agar miring dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 24 jam. Reisolasi dilakukan untuk membuat kultur baru dengan menggunakan ose steril dan inkubasi dilakukan lagi pada 55°C selama 24 jam. Inokulum disiapkan pada medium Nutrien Broth 100 ml. Media disiapkan dalam erlenmeyer 250ml dan diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 15 menit. Dari NA diambil 1 ose dan dipindahkan ke medium NB.

Batch fermentation. Medium NB dibuat dengan pH yang berbeda (5,7,9) dan ditambah NaCl dengan konsentrasi 0,5%, 1% dan 2% dalam 1,5 liter akuades dan digunakan sebagai medium produksi. Medium yang sudah disterilisasi (200ml) dimasukkan dalam Erlenmeyer 250ml. Inokulum (10%) dimasukkan dalam erlenmeyer. Dan diinkubasi lagi pada suhu 55°C selama 24 dan 48jam. Setelah waktu inkubasi selesai, sampel dimasukkan tabung konikel 15 mL, disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 3.000 rpm untuk memperoleh supernatant yang tidak mengandung sel.

Uji antimikroba. Uji antimikroba dilakukan dalam dua langkah :

1. Uji antijamur.

Cell free extract dari masing-masing perlakuan diambil 10 µl lalu diteteskan pada paper disk dengan diameter 5 mm. PDA steril (20 ml) dibiarkan mengeras kemudian diinokulasi dengan 100 µl bibit jamur *Candida albicans* dan didiamkan selama 30-60 menit. Setelah itu dimasukkan keping paper disk yang telah diberi CFE. Diameter penghambatan di sekitar keping paper disk diukur setelah 24 jam pada suhu 37°C.

2. Uji antibakteri

Cell free extract dari masing-masing perlakuan diambil sekitar 10 µl lalu diteteskan pada paper disk dengan diameter 5 mm. NA steril (20 ml) dibiarkan mengeras kemudian diinokulasi dengan 100 µl bibit bakteri *E coli* dan *Staphylococcus aureus* dan didiamkan selama 30-60 menit. Setelah itu dimasukkan keping paper disk yang telah diberi CFE. Diameter penghambatan di sekitar keping paper disk diukur setelah 24 jam pada suhu 37°C.

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa masing-masing cell free extract yang dihasilkan dari inkubasi dengan medium yang berbeda-beda mempunyai aktivitas yang berbeda-beda terhadap 3 patogen yang diujikan. Hasil uji antimikrobia dapat dilihat pada Tabel 1.

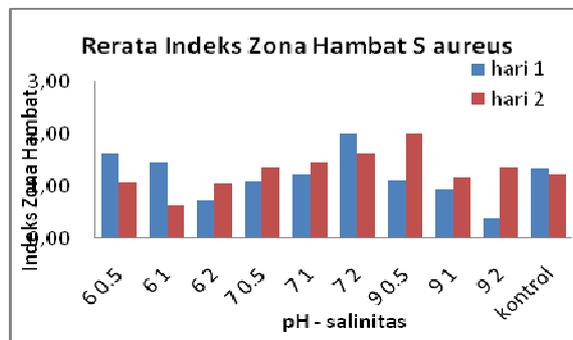
Tabel 1. Hasil Uji antimikrobia CFE hasil fermentasi dengan medium yang berbeda

Hari	pH	Kadar garam (%)	Rata-rata indeks zona hambat			
			SA	EC	CA	
1	6	0,5	1,64	0,49		
		1	1,47	0,98		
		2	0,73	0,83		
	7	0,5	1,09	0,61		
		1	1,22	0,63	1,17	
		2	2,01	0,51		
	9	0,5	1,13	0,69		
		1	0,95	0,74		
		2	0,39	0,58		
		kontrol		1,33	0,51	
	2	6	0,5	1,08	0,23	
			1	0,62	0,35	
2			1,06	0,68		
7		0,5	1,36	0,97		
		1	1,46	0,33		
		2	1,63	0,39		
9		0,5	2,00	0,56		
		1	1,16	0,81		
		2	1,36	0,34		
		kontrol		1,23	0,80	

Ket : SA = *Staphylococcus aureus*, EC = *Eschericia coli*, dan CA = *Candida albicans*

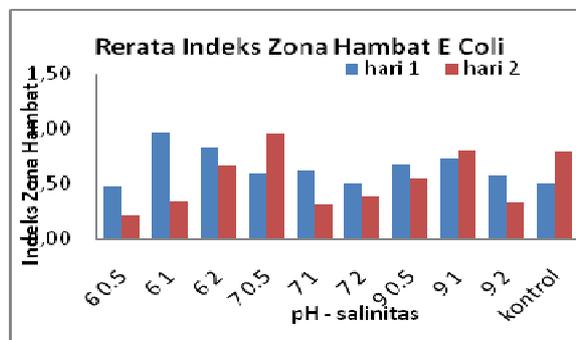
Berdasarkan Tabel 1, tampak bahwa semua cell free extract yang dihasilkan tidak berpotensi sebagai antifungi terhadap *Candida albicans* kecuali CFE yang dihasilkan dari proses

fermentasi bakteri termofilik pada pH 7 dan kadar garam 1% selama 1 hari dengan indeks zona hambat sebesar 1,17. Hasil uji aktivitas CFE hasil fermentasi dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.



Gambar 1. Indeks zona hambat pada *S aureus*

Dari Gambar 1 tampak bahwa perlakuan terbaik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S aureus* pada pH media 7 dengan kadar garam 2% dan waktu fermentasi 24 jam, sedangkan perlakuan yang menghasilkan kemampuan antimikrobia terhadap bakteri ini yang paling rendah perlakuan pH 9 dan kadar garam 2% dengan lama fermentasi 24 jam.



Gambar 2. Indeks zona hambat pada *E coli*

Gambar 2 menunjukkan bahwa perlakuan terbaik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E coli* pada media pH 6 dengan kadar garam 1% dan waktu fermentasi 24 jam, sedangkan perlakuan yang menghasilkan kemampuan antimikrobia terhadap bakteri ini yang paling rendah adalah perlakuan media dengan pH 6 dan kadar garam 0,5% dengan lama fermentasi 48 jam.

Secara umum aktivitas CFE dengan berbagai perlakuan menghasilkan aktivitas antimikrobia yang lebih tinggi pada *S aureus* bila dibandingkan dengan *E coli* seperti yang terlihat pada Gambar 1

dan 2. Perlakuan yang memberikan CFE dengan sifat antibakteri terbaik pada kedua bakteri uji adalah perlakuan dengan waktu fermentasi 24 jam, dengan pH 7 dan kadar garam 2% pada *S aureus* dan pH 6 kadar garam 1% pada *E coli*.

Faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan mikrobia antara lain nutrisi, kelembaban, suhu, pH, tekanan osmotik, tekanan barometrik, dan komposisi atmosfer. Produk alami dari mikrobia merupakan sumber yang sangat menjanjikan untuk penemuan antibiotik. Penelitian antibiotika baru atau pencarian strain baru yang dapat menghasilkan antimikrobia merupakan program penelitian utama di seluruh dunia karena adanya peningkatan resistensi patogen dan terjadinya adanya toksisitas pada beberapa antibiotik kimia yang sudah ada. Telah diketahui sebelumnya bahwa desain medium fermentasi yang cocok adalah hal yang sangat penting dalam produksi senyawa metabolit sekunder. Adanya pengetahuan dan pengalaman dalam mengembangkan medium dasar sangat penting untuk optimasi medium. Produksi metabolit sekunder melalui proses fermentasi melibatkan berbagai faktor lingkungan, termasuk nutrisi (sumber nitrogen, fosfat dan karbon), kecepatan pertumbuhan, kontrol feedback, inaktivasi enzim dan bermacam kondisi (suplai oksigen, suhu, cahaya dan pH).

Agen antimikrobia bekerja dengan menggunakan lima macam mekanisme umum, antara lain dengan menghambat sintesis dinding sel, merusak membran sel, menghambat sintesis asam nukleat (sintesis DNA atau RNA), menghambat sintesis protein, menghambat aktivitas enzim. Senyawa antimikrobia dapat membunuh bakteri patogen dengan baik karena memiliki struktur seluler dan jalur metabolisme yang berbeda, sehingga bakteri patogen dapat mati tanpa merusak sel inangnya yang berupa sel eukariotik. Ada dua macam senyawa antibakteri, yaitu bakterisidal yang dapat membunuh bakteri dan bakteristatik yang menghambat pertumbuhan bakteri.

Antibiotik merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroorganisme pada fase stasioner siklus pertumbuhan mikrobia, memiliki bermacam struktur kimia yang berbeda-beda dan memiliki aktivitas biologis yang berbeda-beda. Salah satu jenis antibiotik yang ditemukan dalam cell free extract hasil fermentasi adalah berupa Antimicrobial Peptide (AMP).

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa AMP, baik yang sintetis maupun alami bisa

meningkatkan sistem imun dan berpotensi sebagai antibiotik yang potensial. Adanya ikatan elektrostatik antara komponen bakteri yang bermuatan negatif dan AMP yang bermuatan positif dipercaya berperan penting untuk membuat ikatan yang kuat dan selektif di dalam merusak membran sel bakteri. Sebagian besar AMP dapat membunuh bakteri baik yang gram positif maupun gram negatif. Peptida yang ditemukan memiliki kemampuan dalam menetralkan lipopolisakarida (LPS) dan kemampuan untuk meningkatkan respon imun adaptif (Hoskin, D. W. and Ramamoorthy, A., 2008).

AMP secara umum bersifat kationik (memiliki muatan pada pH netral antara +2 sampai +9) dan bersifat amfipatik, yang memungkinkan peptida ini berinteraksi dengan membran dan merusak lipid membran. Sebagian besar AMP memiliki struktur yang pendek, hanya terdiri dari 5 sampai 40 residu asam amino, dan sedikit jumlahnya yang memiliki panjang sampai lebih dari 40 residu. Residu yang mempunyai muatan positif seperti Lys dan Arg dan sebagian mempunyai residu yang bersifat hidrofobik (~30% atau lebih) biasanya ditemukan pada peptida ini. Sifat penting yang dimiliki oleh AMP, seperti tritripticin, lactoferricins dan indolicidin, mereka kaya akan residu Trp dan Arg residues. Studi telah menunjukkan bahwa semua analog D-amino-acid memiliki aktivitas yang identik, tetapi memiliki khiralitas yang berkebalikan dengan semua L-peptida; sifat ini digunakan untuk mendesain AMP yang tahan terhadap degradasi proteolitik. Tidak seperti antibiotik konvensional yang biasanya berinteraksi hanya dengan target khusus, sebagian besar kationik AMP memiliki target membran sel dari mikroorganisme yang menyerang, dan menyebabkan sel lisis dan mati (Hoskin, D. W. and Ramamoorthy, A., 2008).

Dalam penelitian ini, pengaruh kadar garam dan pH dalam produksi antimikrobia adalah dengan mempengaruhi stabilitas protein antimikrobia yang dihasilkan. Dalam memproduksi suatu senyawa antimikrobia, melibatkan bermacam enzim yang bekerjanya sangat dipengaruhi oleh pH. pH medium akan mempengaruhi kestabilan senyawa antimikrobia yang dihasilkan dan disekresikan keluar sel oleh bakteri termofilik. Karena dengan pH dapat merubah muatan yang ada pada asam amino penyusun senyawa antimikrobia. Sehingga dapat menyebabkan aktivitasnya berubah. Untuk itu

setiap senyawa antimikrobia membutuhkan pH yang sesuai untuk menjaga kestabilan struktur aktifnya. Pengaruh kadar garam dalam penelitian ini adalah mempengaruhi tekanan osmotik sel bakteri termofilik. Setiap bakteri memiliki kemampuan untuk bertahan hidup pada kadar garam yang berbeda. Pada tingkat salinitas tertentu bakteri dapat bertahan hidup

Simpulan

Kadar garam, pH medium dan lama fermentasi mempengaruhi kemampuan antimikrobia cell free extract yang dihasilkan. Perlakuan yang menghasilkan CFE dengan aktivitas antimikrobia terbaik adalah perlakuan dengan waktu fermentasi 24 jam, dengan pH 7 dan kadar garam 2% pada *S aureus* dan pH 6 kadar garam 1% pada *E coli*. Cell free extract yang dihasilkan tidak berpotensi sebagai antifungi terhadap *Candida albicans* kecuali CFE yang dihasilkan dari proses fermentasi bakteri termofilik pada pH 7 dan kadar garam 1% selama 1 hari dengan indeks zona hambat sebesar 1,17.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih peneliti ucapkan kepada Fakultas MIPA yang telah memberikan dana untuk pelaksanaan penelitian ini.

Pustaka

- [1] Fawzy G A, Al-Taweel A M and Melake N A. (2011) *In Vitro* Antimicrobial and Anti-Tumor. Activities of Intracellular and Extracellular extracts of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* var. *columinaris*. *J. Pharm. Sci. & Res.* 3(1), 980-987.
- [2] Strobel G And Daisy B. (2003) Bioprospecting For Microbial Endophytes

- And Their Natural Products. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* P. 491–502
- [3] Alam M. J. Awal M. R, Sharifuzzaman M. A, Fatema K and Sultana M. S. (2013) Antibioqram and plasmid profiling of *E. coli* isolates and assessment of antibacterial activity of their extracellular synthesized silver nanoparticles. *Current Research in Microbiology and Biotechnology* 1, 5 :245-250
 - [4] Gómez V L J., Soria-I E., Rivas G G- and Sánchez A N E. (2010) Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface, *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45 (2), 267-275
 - [5] Phonnok S., Tanechpongamb W U Wongsatayanon B T. (2010) Anticancer and apoptosis-inducing activities of microbial metabolites. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458 DOI: 10.2225/vol13-5
 - [6] Sulistiyaningsih. (2008) Identifikasi Isolat Bakteri Penghasil Zat Antibakteri Dari Cairan Kantung Tanaman Kantong Semar (*Nepenthes ampullaria*, Jack). *Laporan Penelitian Mandiri*. Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran. Bandung
 - [7] Hoskin, D. W. and Ramamoorthy, A. (2008) Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial Peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2008 February ; 1778(2): 357–375