

**KARAKTERISASI FRAKSI TERAKTIF SENYAWA ANTIBIOTIK
ISOLAT KP 13 DENGAN METODE DENSITOMETRI
DAN KLT-SEMPROT**

Alfian Syarifuddin^{1*}, Nanik Sulistyani²

¹Program Studi S1 Farmasi, Universitas Muhammadiyah Magelang, Magelang,
Indonesia

²Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia

*Email: alfiansyarifuddin08@gmail.com

Artikel diterima: 5 Desember 2018; Disetujui: 14 Maret 2019

ABSTRAK

Eksplorasi mikroorganisme Actinomycetes dapat menghasilkan senyawa antibiotik. Salah satu bakteri yang dapat menghasilkan senyawa antibiotik adalah isolat bakteri KP13. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui karakter fraksi teraktif senyawa antibiotik isolat KP13 menggunakan metode densitometri dan reaksi semprot/ pewarnaan hasil elusi kromatografi lapis tipis. Panjang gelombang yang digunakan untuk densitometri 210 nm serta pereaksi semprot yang digunakan meliputi *ninhidrin*, *Dragendorff*, *2,4-dinitrofenil hidrazin* (2,4-DNPH), dan anisaldehyd asam sulfat. Hasil penelitian menggunakan densitometri pada panjang gelombang 210 nm menunjukkan kromatogram puncak tertinggi pada Rf 0,78. Senyawa yang diduga bertanggung jawab pada nilai Rf 0,78 mempunyai karakteristik senyawa Terpenoid, alkaloid, dan karbonil.

Kata kunci: Densitometri, Isolat KP13, KLT-semprot

ABSTRACT

Exploration of microorganisms Actinomycetes can produce antibiotic compounds. One of the bacteria that can produce antibiotic compounds is the KP13 bacterial isolate. The purpose of this study was to determine the character of the fraction of KP13 isolates using the densitometry method and the spray / colouring reaction of thin layer chromatography elution. The wavelengths used for densitometry 210 nm and spray reagents used include ninhydrin, Dragendorff, 2,4-dinitrophenyl hydrazine (2,4-DNPH), and sulfuric acid anisaldehyde. The results of the study using densitometry at a wavelength of 210 nm showed the highest peak chromatogram at Rf 0.78. The compound that is thought to be responsible for the Rf value of 0.78 has the characteristics of Terpenoid compounds, alkaloids, and carbonyl.

Keywords: *Densitometry, Isolate KP13, TLC-spray reagents*

PENDAHULUAN

Eksplorasi mikroorganisme sebagai agen terapeutik sudah dimulai sejak abad ke-20. Kemampuannya menghasilkan senyawa antibiotik dapat bermanfaat dalam mengatasi berbagai penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen. Actinomycetes dapat menghasilkan senyawa bioaktif antibiotika (70%), fungi (20%) dan bakteri (10%) (Rante & Murti, 2010). Saat ini banyak penelitian difokuskan pada Actinomycetes yang diindikasikan sebagai bakteri yang mampu menghasilkan metabolit sekunder antibiotik persentase terbanyak.

Metabolit terbagi menjadi metabolit primer dan metabolit sekunder (Demain & Sanchez, 2009). Metabolit sekunder tidak bisa digunakan untuk kebutuhan hidup sel tersebut dan sebagai karakter spesifik kelompok organisme (Bérdy, 2005).

Antibiotik yang bersumber dari metabolit sekunder bakteri, menurut struktur dan jenis biosintesisnya dapat diklasifikasikan menjadi antibiotik derivat peptida, derivat poliketida dan golongan lainnya. Kandungan kimia dalam metabolit

sekunder Actinomycetes lainnya mengandung senyawa kimia dari beberapa jalur biosintesis, seperti asam amino dan alkaloid yang berasal dari jalur asam sikimat (*shikimate pathway*), senyawa poliketida, fenolik dan asam lemak yang berasal dari jalur asam asetat-malonat (*acetate/acylpolymalonate pathway*), dan senyawa terpenoid yang berasal dari jalur asam mevalonat (*mevalonic pathway*) dan senyawa lainnya yang berasal dari jalur biosintesis yang berbeda (Taddei *et al.*, 2006).

Syarifuddin & Sulistyani (2018) telah melakukan uji aktivitas antibiotik isolat KP13 terhadap bakteri *Escherichia coli* dan melakukan analisis mekanisme molekuler antibiotik isolat KP13 dengan meninjau dari kebocoran sel pada bakteri tersebut. Selain itu, Syarifuddin & Sulistyani (2018) melakukan uji KLT-bioautografi fraksi teraktif isolat KP13 dan memperoleh bercak aktif pada Rf 0,77. Oleh karena itu, dalam penelitian ini perlu dianalisis karakter senyawa aktif dan analisis kualitatif senyawa tersebut.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan adalah: ose, mikropipet, *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, alat gelas, timbangan analitik, lampu bunsen, *magnet stirrer*, *hooter plate*, mikro pipet, *cotton but* steril, inkubator, enkas, autoklaf, plat KLT silika gel F 254, Densitometri, GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*), lampu UV.

Bahan yang digunakan adalah media SNB, media *Mueller Hinton*, NaCl 0,9%, BHI, Standard Mc Farland (10^8 CFU/mL), Gliserol 25%, NaCl, KNO₃, K₂HPO₄, MgSO₄.7H₂O, FeSO₄.7H₂O, *E.coli* ATCC 25922, Heksan, Etil asetat, Etanol 70%, dan metanol.

Tahapan Penelitian

Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan cara menotolkan ekstrak pada plat dengan bantuan pipa kapiler 5 µL. Ekstrak etil asetat sebanyak 8 mg dilarutkan dengan metanol 40 µL. Selanjutnya, dielusi dengan larutan pengembang di dalam wadah tertutup rapat. Fase diam yang digunakan adalah silika gel F₂₅₄. Fase

gerak yang digunakan adalah kloroform :etil asetat : metanol (4:1:0,5). Sebelum memasukkan plat KLT ke dalam *chamber*, fase gerak/eluen dibiarkan hingga jenuh di dalam *chamber*. Setelah dielusi, plat KLT dikeringkan. Untuk melihat pola pemisahannya, kromatogram tersebut dideteksi dengan lampu UV 254 nm dan 366 nm, kemudian ditentukan nilai Rfnya (Moncheva *et al.*, 2012). Fraksi yang mempunyai profil spot dengan nilai Rf yang sama, digabung dan dikelompokkan menjadi satu kelompok.

Analisis Densitometri dan

Identifikasi Senyawa Kimia

Kromatogram kemudian dianalisis menggunakan Densitometer CANMAG-4 kemudian disemprot menggunakan beberapa pereaksi, antara lain ninhidrin, Dragendorff, 2,4-dinitrofenil hidrazin (2,4-DNPH) dan anisaldehyd asam sulfat. Setelah itu dikeringkan dengan oven pada suhu 105°C kemudian amati perubahan bercak.

Analisis Data

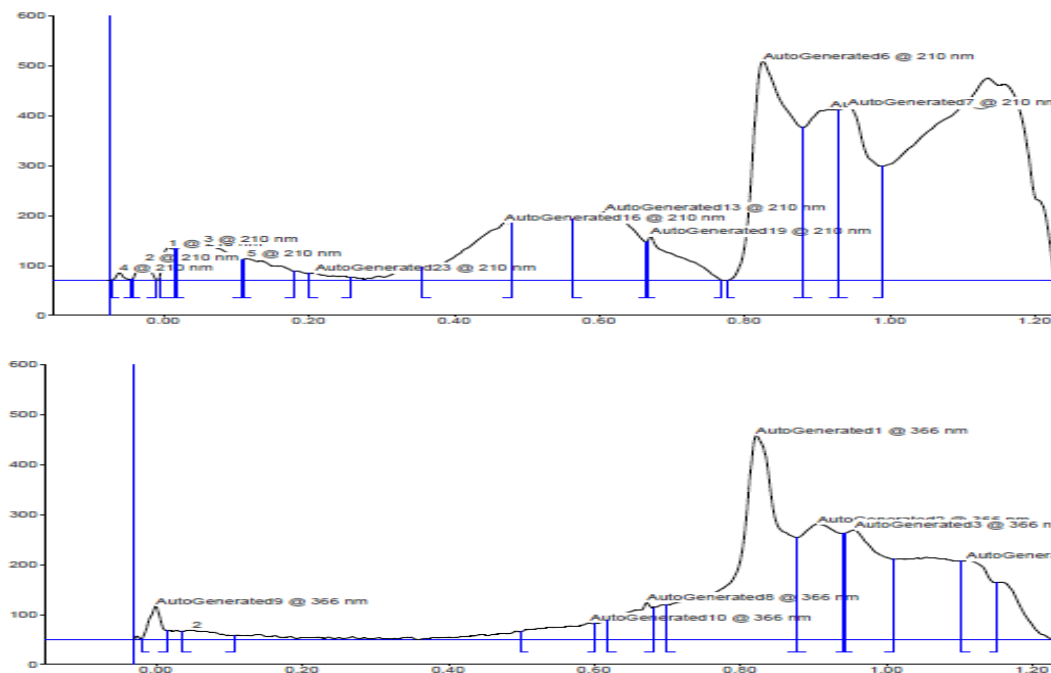
Untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri dari isolat

Actinomycetes pada sampel pasir Gunung Slamet terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* dilakukan dengan cara menganalisis zona hambat yang dihasilkan oleh masing-masing bakteri. Analisis potensiantibakteri menurut Lee, J., and Hwang, (2002), dibedakan menjadi 3 kategori yaitu kategori kuat dengan ukuran diameter hambat lebih dari atau sama dengan 20 mm, kategori sedang dengan ukuran diameter 10-19 mm, dan kategori

lemah dengan ukuran diameter 5-9 mm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis hasil elusi KLT menggunakan densitometer CANMAG 4 scanner dengan menggunakan panjang gelombang 210 nm dan 366 nm. Pada panjang gelombang 210 nm menghasilkan 12 *spot* yang ditunjukkan pada Gambar 1 dan Tabel 1.



Gambar 1. Analisis kromatogram hasil elusi KLT fraksi kelompok 1 menggunakan CANMAG-4 Scanner pada panjang gelombang 210 dan 360 nm

Hasil pembacaan KLT-densitometri dengan panjang gelombang 210 nm pada Rf 0,78

menunjukkan% area 27,92% diduga bercak yang berpotensi sebagai antibiotik ditinjau dari nilai Rf yang

mendekati nilai Rf hasil bioautografi dan nilai% areanya . Hal tersebut diperkuat dengan hasil bioautografi yang disajikan pada Gambar 1. Bercak aktif hasil uji bioautografi mempunyai nilai Rf 0,77.

Berdasarkan dari hasil analisis menggunakan KLT-Densitometer CANMAG 4-Scanner, bercak yang aktif sebagai antibiotik dapat terbaca pada panjang gelombang 210 nm tetapi tidak terbaca pada panjang gelombang 366 nm. Puncak tertinggi/dominan pada profil kromatogram yang dihasilkan dari hasil pembacaan pada panjang gelombang 210nm diduga sebagai puncak senyawa yang berpotensi sebagai antibiotik. Puncak tersebut muncul pada kisaran Rf 0,7-0,8 dari

masing-masing panjang gelombang yang digunakan. Hal tersebut diperkuat dengan hasil bioautografi pada Gambar 1 yang menunjukkan bercak aktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* muncul pada nilai Rf 0,775. Selain itu, pemisahan senyawa aktif yang dihasilkan belum menghasilkan senyawa murni ditunjukkan dengan data% area pada bercak yang diduga sebagai antibiotik dengan nilai tidak mendekati angka100% dan masih muncul bercak-bercak dari zat pengotor yang terbaca dari hasil scanning selain senyawa yang aktif sebagai antibiotik pada hasil elusi plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Tabel 1. Analisis hasil elusi KLT fraksi kelompok 1 menggunakan CANMAG-4 Scanner pada panjang gelombang 210 nm.

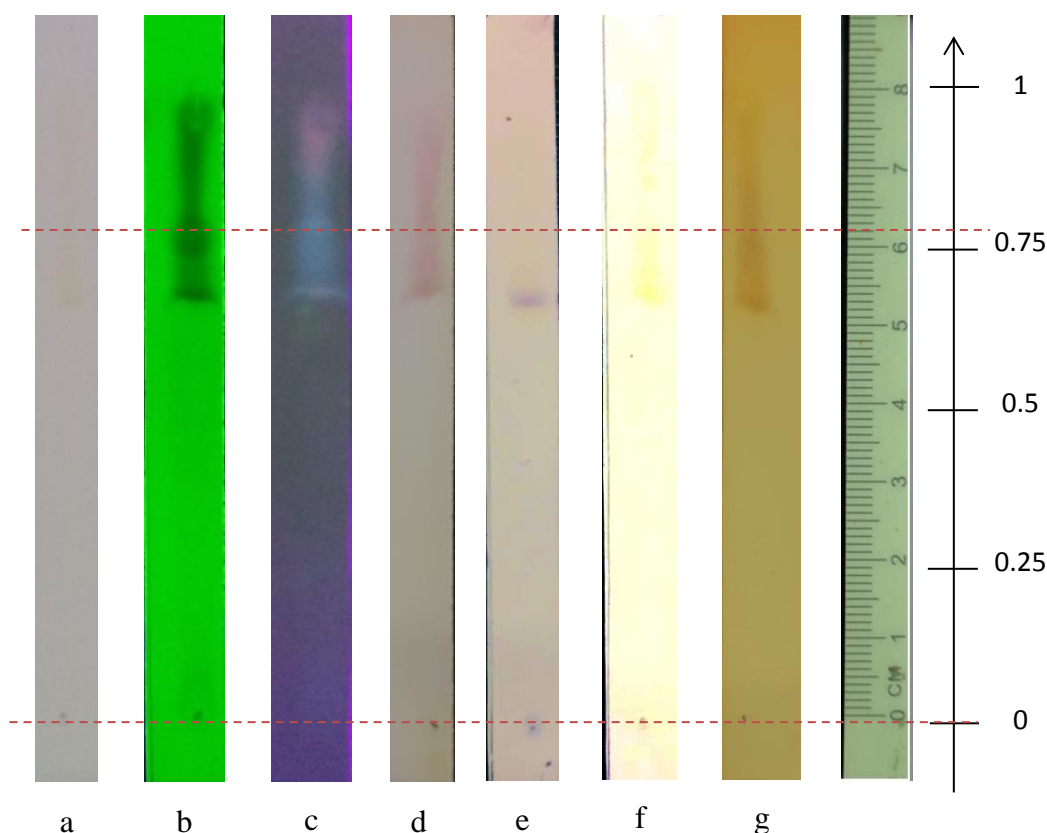
| peak | Rf | Area (%) | λ_{max} (nm) |
|------|-------------|--------------|----------------------|
| 1 | -0,07 | 0,20 | 285 |
| 2 | -0,04 | 0,75 | 284 |
| 3 | -0,01 | 1,20 | 285 |
| 4 | 0,02 | 5,95 | 284 |
| 5 | 0,11 | 2,46 | 283 |
| 6 | 0,20 | 0,60 | 285 |
| 7 | 0,36 | 8,63 | 200 |
| 8 | 0,56 | 12,73 | 200 |
| 9 | 0,67 | 4,54 | 200 |
| 10 | 0,78 | 27,92 | 200 |
| 11 | 0,88 | 16,73 | 200 |
| 12 | 0,93 | 18,28 | 234 |

Tabel 2.. Analisis hasil elusi KLT fraksi kelompok 1 menggunakan CANMAG-4 Scanner pada panjang gelombang 366 nm

| peak | Rf | Area (%) | λ_{max} (nm) |
|------|-------|----------|----------------------|
| 1 | -0,02 | 1,72 | 290 |
| 2 | 0,04 | 1,41 | 200 |
| 3 | 0,50 | 3,55 | 200 |
| 4 | 0,62 | 4,66 | 200 |
| 5 | 0,70 | 42,09 | 200 |
| 6 | 0,88 | 19,26 | 200 |
| 7 | 0,94 | 17,82 | 200 |
| 8 | 1,11 | 9,49 | 200 |

Antibiotik yang bersumber dari metabolit sekunder bakteri, menurut struktur dan jenis biosintesisnya dapat diklasifikasikan menjadi beberapa kelompok, yaitu antibiotik derivat peptida, derivat poliketida dan golongan lainnya. Kandungan kimia dalam metabolit sekunder Actinomycetes lainnya mengandung banyak senyawa kimia yang berasal dari beberapa jalur biosintesis, seperti asam amino dan alkaloid yang berasal dari jalur asam sikimat (*shikimate pathway*), senyawa poliketida, fenolik dan asam lemak yang berasal dari jalur asam asetat-malonat (*acetate/acylpolymalonate pathway*), dan senyawa terpenoid yang berasal dari jalur asam mevalonat (*mevalonic pathway*) dan senyawa lainnya yang berasal dari jalur biosintesis yang berbeda (Taddei *et al.*, 2006). Oleh karena

itu, pola pemisahan senyawa yang terkandung dalam ekstrak di plat KLT dapat dilakukan pengamatan secara visual di bawah lampu UV254 nm dan UV366 nm, sedangkan untuk mengidentifikasi senyawa pada fraksi kelompok 1, maka setelah pemisahan senyawa dapat dilakukan penyemprotan oleh reagen semprot yaitu Dragendorff untuk menguji kandungan alkaloid, Ninhidrin untuk golongan peptida, anisaldehyd-asam sulfat untuk uji kandungan senyawa steroid dan terpenoid, serta 2,4-*Dinitrophenyl Hidrazyn* (2,4-DNPH) untuk uji kandungan karbonil, khususnya aldehid dan keton (Gritter *et al.*, 1991 dalam Gandjar *and* Rohman, 2007). Hasil uji KLT semprot disajikan pada Gambar 2, sedangkan hasil pengamatan kromatogram dapat diamati pada Tabel 3.



Gambar 2. Hasil Elusi KLT Fraksi kelompok 1 Isolat KP13
Keterangan : a= Hasil elusi KLT; b = Hasil elusi KLT pada UV 254nm; c = Hasil elusi KLT pada UV 366 nm; d= pada pereaksi anisaldehyd asam sulfat; e = Ninhidrin; f = Dragendroff; g = 2,4 DNPH.

Pemadaman bercak di bawah lampu UV 254 mengindikasikan adanya penyerapan cahaya UV oleh senyawa. Penyerapan sinar UV disebabkan karena adanya molekul kromofor yang terdiri ikatan rangkap dua atau ikatan rangkap 3 dan ikatan rangkap tersebut terkonjugasi. Senyawa-senyawa aromatik yang mempunyai cincin benzen akan menyerap sinar UV pada panjang gelombang 254 nm. 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*.

Tabel 3. Tabel pengamatan kromatogram KLT-semprot fraksi kelompok 1

| Rf | UV ₂₅₄ | UV ₃₆₆ | Anisaldehyd asamsulfat | Ninhidrin | Dragendorff | 2,4 DNPH | interpretasi |
|------|-------------------|-------------------|---------------------------|-----------|-------------|-------------|---|
| 0,66 | padam | biru | merah muda | ungu | kuning | orange | Terpenoid, peptida, alkaloid, karbonil |
| 0,69 | - | biru | merah muda | - | - | - | Terpenoid |
| 0,75 | padam | - | merah muda | - | - | orange | Terpenoid, karbonil |
| 0,77 | padam | - | merah muda | - | kuning | orange | Terpenoid, alkaloid, karbonil |
| 0,8 | padam | biru | merah muda | - | kuning | - | Terpenoid, alkaloid |
| 0,94 | padam | pink- ungu | merah muda | - | Kuning | - | Terpenoid, alkaloid |
| 0,96 | padam | - | - | - | - | - | Gugus kromofor |

Plat KLT setelah dielusi dibaca pada lampu UV 366 nm terdapat bercak yang berflouresensi menjadi warna pink-ungu. Flouresensi atau berpendarnya bercak pada sinar lampu UV 366 nm karena adanya interaksi lampu UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh ausokrom (Gibbons, 2006). Gugus kromofor yang terikat oleh ausokrom meliputi —OH; O; —NH₂; dan —OCH₃ sehingga mengakibatkan pergeseran pita absorpsi menuju ke panjang gelombang yang lebih besar dan terjadi peningkatan intensitas (Abdul Rohman, 2007).

Pereaksi Dragendorff merupakan pereaksi yang digunakan

untuk mendeteksi senyawa alkaloid dan senyawa lain yang mengandung nitrogen (Wall, 2000). Hasil positif alkaloid pada uji Dragendorff ditandai dengan terbentuknya bercak coklat muda, orange sampai kuning (Katavic, 2005). Regaen dragendorff akan menghasilkan bercak warna orange dengan amin tersier dan garam amonium quartener. Bercak kuning yang terbentuk pada Rf 0,66; 0,75; 0,77; 0,8 dan 0,94 sebagai alkaloid. Berikut reaksi uji Dragendorff.

Pereaksi Dragendorff tidak bisa memastikan positif terdapat keberadaan alkaloid, hal ini dikarenakan hasil positif juga

diberikan terhadap senyawa *nitrogenous* seperti peptida atau senyawa *non-nitrogenous* yang mengandung oksigen (Habib, 1980 dalam Katavic, 2005) Oleh karena itu, bercak orange pada plat KLT pada nilai Rf 0,66; 0,75; 0,77; 0,8 dan 0,94 bahwa isolat diduga mengandung senyawa dengan amin tersier/garam amonium seperti alkaloid ataupun senyawa *nitrogenous* seperti peptida.

Beberapa asam amino melalui ikatan peptida membentuk suatu molekul disebut peptida. Keberadaan senyawa peptida dalam fraksi dapat dideteksi oleh pereaksi Ninhidrin. Ninhidrin akan memberikan warna merah keunguan pada bercak solut bila bereaksi dengan asam amino, amina primer, dan amina sekunder (Gandjar *and* Rohman, 2007). Bercak yang terbentuk setelah penyemprotan berwarna ungu dengan nilai Rf 0,66 dan diduga mengandung senyawa peptida. Reaksi ini dapat diamati pada Gambar 2. Amina tersier tidak dapat dideteksi oleh pereaksi ninhidrin, namun dapat dideteksi dengan Dragendorff, sehingga fungsi

penggunaan kedua pereaksi semprot ini saling melengkapi. Maka, dapat disimpulkan bahwa bercak aktif pada Rf 0,77 setelah hasil uji bioautografi mengandung senyawa alkaloid tetapi tidak terdapat peptida.

Pereaksi 2,4-dinitrofenil hidrazin (2,4-DNPH) merupakan reagen semprot spesifik untuk mendeteksi adanya gugus fungsi karbonil, khususnya keton dan aldehid pada suatu senyawa. Pereaksi ini akan menghasilkan warna kuning, orange hingga merah pada bercak KLT, bila bereaksi dengan senyawa karbonil keton dan aldehid (Wagner, H., 1996). Hasil uji semprot KLT menggunakan Pereaksi 2,4-dinitrofenil hidrazin (2,4-DNPH) pada Rf 0,66; 0,75; dan 0,77 mengindikasikan isolat mengandung senyawa diduga bergugus fungsi karbonil, khususnya keton atau aldehid.

Anisaldehyd asam sulfat adalah pereaksi semprot yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa terpenoid. Terpenoid merupakan suatu senyawa yang tersusun atas isopren $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ (Harbone, 1996). Bercak yang positif

mengandung terpenoid/steroid akan timbul warna merah atau ungu ketika direaksikan dengan menggunakan Anisaldehyd asam sulfat (Wagner, 1996). Bercak hasil KLT yang membentuk warna merah ketika disemprot menggunakan Anisaldehyd asam sulfat, antara lain pada nilai Rf 0,66; 0,69; 0,75; 0,77; 0,8; 0,94; dan 0,96. Penelitian yang dilakukan oleh Bahi (2012), yang melakukan isolasi dan karakterisasi senyawa metabolit sekunder dari bakteri laut *Streptomyces sp.* dari ekstrak kasarnya memperlihatkan bercak berwarna violet, merah, coklat dan hitam setelah disemprot dengan pereaksi anisaldehyd/ asam sulfat sehingga positif terdapat kandungan terpenoid atau steroid.

KESIMPULAN

Berdasarkan pendekatan menggunakan hasil densitometri dan uji KLT-semprot pewarnaan, nilai Rf yang aktif berpotensi sebagai antibiotik adalah nilai Rf 0,77 yaitu diduga senyawa terpenoid, alkaloid, dan karbonil.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan sehingga menemukan molekul antibiotik baru.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul Rohman, I. G. G. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites: A Personal View. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>
- Demain, A. L., & Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, 62(1), 5–16. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.16>
- Gibbons, S. (2006). *An Introduction to Planar Chromatography*. Totowa New Jersey.: Humana Press.
- Harbone, J.B. (1996). *Metode Fitokimia, Terbitan ke-2*. Bandung: Penerbit ITB.
- Katavic, P.L. (2005). *Chemical Investigation of the Alkaloids from the plants of the family Elaeocarpaceae, Natural Product Discovery (NPD)*. Faculty of Science, Griffith University, Australia.
- Lee, J., H., B. .. K. (2002). Diversity of Antifungal Actinomycetes in Various Vegetative Soils of Korea, (39), 254–264.

- Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Antonova-Nikolova, S., & Bogatzevska, N. (t.t.). CHARACTERISTICS OF SOIL ACTINOMYCETES FROM ANTARCTICA, 12.
- Rante, H., & Murti, Y. B. (2010). Purifikasi dan karakterisasi senyawa anti- bakteri dari actinomycetes asosiasi spons terhadap bakteri patogen resisten, 8.
- Syarifuddin, A., & Sulistyani, N. (2018). Aktivitas Antibiotik Isolat Bakteri Kp13 dan Analisa Kebocoran Sel Bakteri *Escherichia coli*, 16, 8.
- Taddei, A., Valderrama, M., Giarrizzo, J., Rey, M., & Castelli, C. (2006). Chemical screening: A simple approach to visualizing *Streptomyces* diversity for drug discovery and further research. *Research in Microbiology*, 157(3), 291–297.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.07.007>
- Wagner, H., S. B. (1996). *Plant Drug Analysis; A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd Edition*. Berlin Heidelberg: Springer.
- Wall, P.E. (2000). *Chromatography : Thin Layer (Planar) Spray Reagents*. United Kingdom: Academic Press.