

Potensi Antibakteri Ekstrak Kloroform Bakteri *Photobacterium phosphoreum* Yang Bersimbiosis Pada Organ Cahaya Cumi-Cumi *Loligo duvauceli*

(Antibacterial Potential Chloroform Extract of *Photobacterium phosphoreum* Bacteria Symbiotic in Light Organs of Squid *Loligo duvauceli*)

Iin Putriyani, Delianis Pringgenies*, Ali Ridlo

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro, Semarang, 50275, Indonesia

*Corresponding authors: pringgenies@yahoo.com

Diterima : 15 Mei 2020 Direvisi : 16 Juni 2020 Disetujui : 23 Agustus 2020

ABSTRACT

Microorganisms that live in association with marine invertebrates are able to produce a compound similar to those produced by marine invertebrates and are thought to be potential as bioactive materials. Supplement extracts from the *Photobacterium phosphoreum* bacterial culture have been shown to have antibacterial activity. The purpose of this study was to determine the anti-bacterial activity of the chloroform extract of *Photobacterium phosphoreum* biomass against pathogenic bacteria *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. and *Escherichia coli*. The extraction process was carried out by the liquid-liquid extraction method. Fractionation was performed using Open Column Chromatography (KKT). The antibacterial activity test was conducted by the agar diffusion method according to Kirby-Bauer. The results showed that for the antibacterial activity test of crude extract, the largest inhibition zone diameter occurred in *Escherichia coli* with a concentration of 50 µg / disk at 24 h incubation, namely (9.80 ± 0.75 mm), while the smallest inhibition zone diameter occurred in *Salmonella* sp. by giving a concentration of 10 µg / disk at an incubation time of 48 hours, namely (6.03 ± 0.05) mm. Of the 6 fractions resulting from crude extract fractionation, it was known that fraction 5 was the most active fraction and inhibited the growth of the tested bacteria. The largest inhibition zone diameter occurred in *Escherichia coli* (9.83 ± 0.28) mm, while the smallest inhibition zone diameter occurred in *Salmonella* sp. (8.63 ± 0.20 mm).

Keywords: antibacterial activity, bioactive, *Loligo duvauceli*, *Photobacterium phosphoreum*, zone diameter

ABSTRAK

Mikroorganisme yang hidup berasosiasi dengan invertebrata laut mampu menghasilkan suatu senyawa yang serupa dengan senyawa yang dihasilkan oleh invertebrata laut tersebut dan diduga berpotensi sebagai bahan bioaktif. Ekstrak supernatan dari kultur bakteri *Photobacterium phosphoreum* telah diketahui memiliki aktivitas antibakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak kloroform biomassa bakteri *Photobacterium phosphoreum* terhadap bakteri patogen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. dan *Escherichia coli*. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair. Fraksinasi dilakukan menggunakan Kromatografi Kolom Terbuka (KKT). Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar menurut Kirby-Bauer. Hasil penelitian menunjukkan bahwa untuk uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar, diameter zona hambatan terbesar terjadi pada *Escherichia coli* dengan konsentrasi 50 µg/disk pada waktu inkubasi 24 jam yaitu (9,80 ± 0,75 mm), sedangkan diameter zona hambatan terkecil terjadi pada *Salmonella* sp. dengan pemberian konsentrasi 10 µg/disk pada waktu inkubasi 48 jam yaitu (6,03 ± 0,05 mm). Dari 6 fraksi hasil fraksinasi ekstrak kasar, diketahui bahwa fraksi 5 merupakan fraksi paling aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Diameter zona hambatan terbesar terjadi pada bakteri *Escherichia coli* (9,83 ± 0,28) mm, sedangkan diameter zona hambatan terkecil terjadi pada *Salmonella* sp. (8,63 ± 0,20 mm).

Kata kunci: aktivitas antibakteri, bioaktif, *Loligo duvauceli*, *Photobacterium phosphoreum*, zona hambat

PENDAHULUAN

Seiring perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, penelitian bioteknologi di Indonesia mulai dilakukan secara intensif terpadu dari berbagai multi disiplin ilmu. Penelitian mengenai potensi bahan bioaktif banyak dilakukan karena dimungkinkan dapat dikembangkan sebagai bahan baku obat (Rajasekharan Nair et al., 2011; Jeyasanta dan Patterson, 2019). Maraknya isu tentang penyakit bakterial yang menyerang manusia maupun hewan serta adanya resistensi mikroorganisme patogen terhadap bahan antibiotik, memicu para peneliti untuk melakukan pencarian bahan antibiotik baru yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen tersebut (Girija et al., 2014).

Penelitian mengenai pencarian dan pengembangan obat-obatan yang berasal dari laut mulai mendapat perhatian dari para peneliti, karena laut sangat kaya bahan bioaktif. Pengembangan senyawa bioaktif alami dari biota laut ini merupakan usaha potensial untuk mendapatkan bahan kimia baru yang berpotensi dalam bidang kesehatan, pertanian dan industri (Besednova et al., 2017).

Di dalam mikroorganisme terkandung senyawa kimia hasil metabolisme yang digunakan untuk mempertahankan eksistensinya di alam. Senyawa tersebut dikenal sebagai metabolit sekunder. Metabolit sekunder tersebut dapat berpotensi sebagai antikanker, antivirus, antibakteri, antioksidan, antijamur, dan antiplasmodium (Girija et al., 2014; Yuvaraj et al., 2015). Jeyasanta dan Patterson (2019) menambahkan bahwa mikroorganisme yang hidup berasosiasi dengan invertebrata mampu menghasilkan suatu senyawa yang serupa dengan senyawa yang dihasilkan oleh invertebrata laut tersebut dan kemungkinan berpotensi sebagai bahan antibiotik.

Cumi-cumi *Loligo duvauceli* diketahui mampu menghasilkan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai bahan antibakteri (Girija et al., 2014). Cumi-cumi ini dapat memancarkan cahaya Bioluminesensi adalah suatu fenomena pancaran cahaya tanpa mengeluarkan panas melalui proses reaksi kimia pada suatu organ organisme hidup. Salah satu penyebab terjadinya peristiwa bioluminesensi pada cumi-cumi ini merupakan hasil interaksi antara bakteri dan organ cahaya yang dimilikinya. (Rudiana and Pringgenies, 2004) menyatakan bahwa cumi jenis *Loligo duvauceli* mempunyai organ cahaya yang menempel pada kantong tintanya dan pada kantong tersebut mengandung banyak bakteri. (Pringgenies and Sejati, 2004) telah menemukan jenis bakteri yang bersimbiosis dengan organ cahaya cumi-cumi *Loligo*.

Metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas antibakteri dapat berada didalam sel atau dilepas kelingkungannya (Samways, 1981). Hal inilah yang kemudian mendorong upaya penelitian mengenai potensi antibakteri yang berada pada sel bakteri tersebut. Salah satu penerapan penelitian di bidang bioteknologi adalah pemanfaatan produk metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroorganisme sebagai bahan antibiotik. Pengembangan potensi metabolit sekunder sebagai antibiotik diperlukan seiring dengan beragamnya penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Namun demikian, tuntutan tersebut tidak sesuai dengan kenyataan yang ada di mana eksplorasi dan eksploitasi bahan-bahan antibiotik alam, terutama yang berasal dari laut, masih sangat terbatas.

Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan upaya untuk mencari bahan antibiotik baru dari produk alam sebagai upaya pencarian bahan antibiotik baru yang efektif tetapi ramah lingkungan.

Di antara organisme yang berpotensi sebagai penghasil senyawa antibakteri adalah bakteri, termasuk bakteri simbiosis. Dalam penelitian ini ditelusuri potensi antibakteri dari metabolit sekunder yang berada didalam sel bakteri *P. phosphoreum*. *P. phosphoreum* diketahui mampu menghasilkan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai bahan antibakteri, sehingga tidak menutup kemungkinan bahwa metabolit sekunder tersebut masih tersisa didalam sel bakteri tersebut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak kasar bakteri *Photobacterium phosphoreum*, untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari fraksi-fraksi hasil fraksinasi ekstrak bakteri *Photobacterium phosphoreum*, dan untuk mengetahui analisis GC/MS dari fraksi paling aktif pada uji aktifitas antibakteri.

MATERI DAN METODE

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental laboratoris yaitu penelitian eksperimental merupakan penelitian yang bertujuan menyelidiki hubungan saling sebab-akibat dengan cara mengenakan kepada satu atau lebih kelompok eksperimen dengan suatu perlakuan dan membandingkan hasilnya dengan satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak dikenakan perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan statistik.

Kultur Bakteri *Photobacterium phosphoreum*

Proses persiapan kultur bakteri *Photobacterium phosphoreum* mengacu pada prosedur yang dilakukan oleh Burgess *et al.* (2003). Kultur bakteri dilakukan dalam dua tahap, yaitu:

1. Starter, merupakan tahap pendahuluan sebelum kultur massal. Tahapan ini menggunakan media Nutrient Broth (NB), dengan memasukkan 1 ose biakan bakteri *Photobacterium phosphoreum* dari agar miring ke dalam 60 mL media Nutrient Broth (NB) sebanyak 5 (lima) erlenmeyer. Kemudian *dishacker* selama 48 jam atau 2 (dua) hari.
2. Kultur massal, masing-masing erlenmeyer yang berisi 60 mL starter bakteri *Photobacterium phosphoreum* dimasukkan dalam 540 mL media Nutrient Broth (NB) sehingga didapat 600 mL kultur bakteri pada 5 erlenmeyer. Sehingga didapat 3000 mL volume kultur massal bakteri, selanjutnya diguncang selama 5 hari.

Ekstraksi

Sebanyak 3000 mL kultur massal *Photobacterium phosphoreum*, disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 20 menit, keseluruhan biomassa yang diperoleh dicuci dengan *buffer phosphate* sebanyak dua kali. Untuk mempermudah sonikasi maka ditambahkan *buffer phosphate* hingga volume 100 mL selanjutnya disonikasi selama 3 menit kemudian disentrifuge pada 4000 rpm. Supernatan yang diperoleh diekstraksi dengan *separatory funnel* menggunakan pelarut campuran 10% metanol dalam kloroform, dengan perbandingan supernatan dan pelarut (1:1). Ekstrak kasar diambil dan dikisatkan dengan *rotavapour* pada suhu 38 °C, kemudian ditimbang beratnya.

Berat ekstrak: dihitung dengan menggunakan rumus:

$$We = Wv_2 - Wv_1$$

(1)

Dimana: We = berat ekstrak
Wv₁ = berat vial kosong
Wv₂ = berat vial setelah diisi ekstrak

Uji Kontrol Negatif

Uji kontrol negatif dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol. Sebanyak 15 µL metanol diteteskan di kertas disk kemudian diinkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 37 °C.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis KLT dilakukan dengan fasa diam silika gel dan fasa gerak campuran kloroform dan metanol (1 : 2). Visualisasi noda dilakukan dengan vanilin asam sulfat dan pengamatan dengan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 356 nm.

Nilai R_f dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$

(2)

Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Terbuka (KKT)

Ekstrak *Photobacterium phosphoreum* yang diperoleh difraksinasi melalui KKT dengan fasa diam silika gel dan eluen campuran kloroform : metanol yang ditingkatkan kepolarannya dengan perbandingan berturut-turut (4 : 1), (3 : 1), (2 : 1) dan (1 : 1).

Eluat ditampung dalam vial dengan volume masing-masing 7 mL. Tiap-tiap vial diuji KLT menggunakan pelarut kloroform : metanol (1 : 2) kemudian diamati noda yang terbentuk. Hasil KLT yang menunjukkan pola noda sama dikelompokkan menjadi satu fraksi, selanjutnya diuapkan menggunakan rotavapour.

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini menggunakan metode Difusi Lempeng Agar (Agar Disk-Diffusion Assay) menurut Kirby-Bauer. Konsentrasi yang digunakan dalam uji adalah 10 µg/disk, 30 µg/disk dan 50 µg/disk. Adanya aktifitas antibakteri ditunjukkan oleh terbentuknya zona hambat pertumbuhan mikroorganisme di sekitar kertas cakram.

Uji aktivitas antibakteri ini dilakukan dengan menuang media agar (NA) ke dalam cawan petri steril, diamkan hingga memadat. Pembuatan inokulum bakteri uji pada media cair (NB). Peletakan kertas disk dan paparan bahan ekstrak maupun hasil fraksinasi.

Analisa GS/MS

Analisa GC/MS dilakukan dengan menggunakan kolom jenis Rtx-SMS dengan panjang kolom 30 meter, diameter kolom 0,25 mm, suhu kolom terprogram mulai dari 70 °C sampai 300 °C. Jumlah senyawa yang terdapat dalam ekstrak ditunjukkan oleh jumlah puncak (*peak*) pada kromatogram, sedangkan nama/jenis senyawa yang ada diinterpretasikan berdasarkan data spektra dari setiap puncak tersebut dengan menggunakan metode pendekatan pustaka pada database GC/MS.

Analisis Data

Data yang diperoleh yaitu diameter zona hambatan ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik kemudian dianalisa secara deskriptif. Sedangkan untuk mengetahui perbedaan nilai zona hambatan dari pemberian ekstrak dengan konsentrasi, waktu dan fraksi yang berbeda maka dilakukan analisis menggunakan uji Repeated Measurement.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Bakteri *Photobacterium phosphoreum*

Kultur massal *Photobacterium phosphoreum* sebanyak 3000 mL, setelah disentrifuge menghasilkan 50 mL biomassa yang kemudian diekstraksi menggunakan kloroform, Hasil ekstraksi sebanyak 97 mL diuapkan dengan rotavapour dan diperoleh ekstrak kloroform sebanyak 0,77 g dalam bentuk pasta berwarna putih keruh dan berbau khas cumi-cumi. Isolat bakteri *Photobacterium phosphoreum* dikultur dengan 2 (dua) tahapan yaitu starter dan kultur massal. Starter bertujuan untuk menumbuhkan bakteri dalam media NB (nutrient broth) yang digunakan dalam kultur massal. Kultur massal dilakukan selama 5 hari dimaksudkan untuk mendapatkan biomassa bakteri dalam jumlah yang banyak serta metabolit sekunder dalam jumlah yang optimal, disesuaikan dengan kurva pertumbuhan bakteri. Pada umumnya metabolit sekunder diproduksi oleh bakteri pada akhir fase stasioner pertumbuhan. Dan fase stasioner pertumbuhan dicapai pada umur kultur 4 sampai 5 hari. Secara khusus, fase stasioner pertumbuhan untuk genus *Photobacterium* dicapai pada umur kultur 4- 5 hari.

Kultur massa *Photobacterium phosphoreum* sebanyak 3000 mL yang telah berusia 5 (lima) hari dipanen, selanjutnya disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm. Hal ini dilakukan untuk memisahkan antara supemat dan biomassa bakteri. Penelusuran aktivitas antibakteri dari *Photobacterium phosphoreum* dilakukan pada biomassa bakteri. Hal ini dilakukan karena metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas antibakteri dapat berada di dalam sel atau dilepas ke lingkungan.

Hasil sonikasi berupa supemat dari biomassa diekstraksi menggunakan pelarut kloroform. Pelarut ini bersifat semi polar namun memiliki kecenderungan pada senyawa non-polar. Sebagian besar senyawa aktif yang berasal dari tumbuhan dan mikroorganisme merupakan senyawa non-polar yang dapat larut pada pelarut kloroform. Dalam penelitian ini, dari 97 mL supemat diperoleh sebanyak 0,77 g ekstrak kloroform.

Uji Kontrol Negatif

Uji kontrol negatif dilakukan untuk mengetahui pengaruh dari metanol terhadap aktifitas antibakteri. Hasil uji kontrol negatif disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Uji aktivitas pelarut metanol terhadap bakteri uji pada diameter zona (mm)

Waktu Inkubasi	Bakteri Uji	Zona hambat			Rata-rata
		1	2	3	
24 jam	<i>B. substilis</i>	6,5	6,5	6,2	6,40±0,12
	<i>S. aureus</i>	6,5	6,1	6,1	6,23±0,43
	<i>Salmonella sp.</i>	6,1	6,3	6,1	6,16±0,21
	<i>E. coli</i>	6,7	7	6,5	6,73±0,15
48 jam	<i>B. substilis</i>	6,2	6	5,8	6,0±0,13
	<i>S. aureus</i>	6,2	6	6	6,60±0,12
	<i>Salmonella sp.</i>	6	6,3	5,8	6,03±0,11
	<i>E. coli</i>	6,2	6,8	6,2	6,40±0,11

Hasil tabel 1 menunjukkan bahwa metanol membentuk diameter zona hambatan terhadap semua bakteri uji. Namun mengalami penurunan seiring bertambahnya masa inkubasi. Diameter zona hambat terbesar terjadi pada bakteri *Escherichia coli* dengan waktu inkubasi 24 jam (6,73 ± 0,15), sedangkan diameter zona hambatan terkecil terjadi pada bakteri *Bacillus substilis* dengan waktu inkubasi 48 jam (6,00 ± 0,13). Uji kontrol negatif dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol. Hal ini dilakukan karena sampel ekstrak hanya dapat larut pada pelarut metanol dan untuk: mengetahui adanya pengaruh dari metanol dalam pembentukan diameter zona hambatan.

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar

Ekstrak kloroform *Photobacterium phosphoreum* diuji aktivitas antibakterinya terhadap 4 (empat) bakteri uji ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar *Photobacterium phosphoreum* pada waktu inkubasi (jam)

Bakteri	Waktu	Diameter zona hambat (mm)		
		10 µg/disk	50 µg/disk	50 µg/disk
<i>B. substilis</i>	24	7,16±0,20	8,43±0,05	8,93±0,05
	48	6,70±0,11	6,50±0,47	6,50±1,50
<i>S. aureus</i>	24	7,26±0,36	8,03±0,72	8,33±0,50
	48	6,70±0,15	7,30±0,45	7,76±0,36
<i>Salmonella sp.</i>	24	6,30±0,57	7,16±0,40	7,36±0,20
	48	6,03±0,05	6,76±0,45	6,86±0,35
<i>E. coli</i>	24	7,80±0,51	9,23±0,78	9,80±0,75
	48	7,43±0,75	8,80±0,86	9,50±0,86

Keterangan: Nilai di atas adalah rata-rata± SD , SD = Standar deviasi

Berdasarkan data tabel 2 dapat diketahui bahwa diameter zona hambatan yang terjadi pada semua bakteri uji mengalami peningkatan dengan bertambahnya konsentrasi. Aktivitas antibakteri terbesar terjadi pada *Escherichia coli* dengan konsentrasi 50 µg/disk pada waktu inkubasi 24 jam yaitu (9,80 ± 0,75) mm, aktivitas antibakteri terkecil terjadi pada bakteri *Salmonella sp.* dengan pemberian konsentrasi 10µg/disk pada waktu inkubasi 48 jam yaitu (6,03 ± 0,05 mm). Tabel 1 merupakan diameter zona hambat yang terjadi pada ke empat bakteri uji. Diameter zona hambat terbesar terjadi pada bakteri *Escherichia coli* dan diameter zona hambat terkecil terjadi pada bakteri *Samonella sp.*

Berdasarkan uji aktivitas antibakteri (Tabel 2) terlihat bahwa ekstrak kasar *Photobacterium phosphoreum* mempunyai potensi antibakteri yang ditunjukkan oleh kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan keempat bakteri uji dalam beberapa konsentrasi. Bahan dapat memiliki potensi antibakteri bila mempunyai kemampuan untuk: menghambat pertumbuhan bahkan sanggup membunuh bakteri pada konsentrasi terendah.

Tabel 2 juga diketahui bahwa besarnya diameter zona hambat bertambah seiring dengan bertambahnya konsentrasi. Hasil tersebut sesuai dengan hasil analisis statistik yang menunjukkan bahwa pemberian konsentrasi ekstrak yang berbeda berpengaruh meningkatkan diameter zona hambatan terhadap bakteri uji. Informasi ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi pula kandungan bioaktif dan semakin kuat kemampuan antibakterinya. Hal ini sesuai dengan pernyataan Priyono (1994) yang menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin tinggi pula kandungan bahan aktifnya yang dapat meningkatkan kemampuan bahan dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji.

Berdasarkan pengamatan terhadap waktu inkubasi (Tabel 2) dapat diketahui bahwa diameter zona hambatan yang terbentuk pada waktu inkubasi 24 jam mengalami penyempitan dan berkurang kecerahannya setelah waktu 48 jam. Hal tersebut sesuai dengan hasil analisis statistik yang menunjukkan bahwa waktu dapat mempengaruhi besarnya zona hambatan. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa ekstrak bersifat bakteristatik, yang menghambat pertumbuhan bakteri uji namun tidak membunuhnya. Menurut Balouiri et al., (2016) zat antibakteri dikatakan bersifat bakteristatik bila menunjukkan penyempitan dan pengurangan kecerahan zona hambat setelah inkubasi 24 jam, sedangkan bakterisidal mampu membentuk zona hambatan yang tetap bening sampai inkubasi 48 jam. Senyawa bakteristatik bekerja menghambat sintesis protein dengan mengikat ribosom, ikatan yang ditimbulkan oleh senyawa bakteristatik tidak begitu kuat dan ketika konsentrasi senyawa ini rendah atau stabilitasnya menurun, senyawa bakteristatik melepaskan ikatan pada ribosom sehingga bakteri dapat kembali berkembang biak.

Fraksinasi Dengan KKT dan KLT

Setelah dilakukan KKT diperoleh 31 vial dengan volume masing-masing 7 mL, yang selanjutnya dianalisa pola KLT dan diperoleh 6 fraksi. Hasil dari KKT dan KLT ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil fraksinasi dengan KKT dan KLT ekstrak kloroform *Photobacterium phosphoreum*

No vial	Fraksi	Jumlah noda	Nilai Rf
4-7	1	2	0,937;0,525
8-11	2	2	0,962;0,825
12-15	3	2	0,975;0,600;0,400
16-19	4	2	0,925;0,825
20-23	5	2	0,487;0,35
24-31	6		

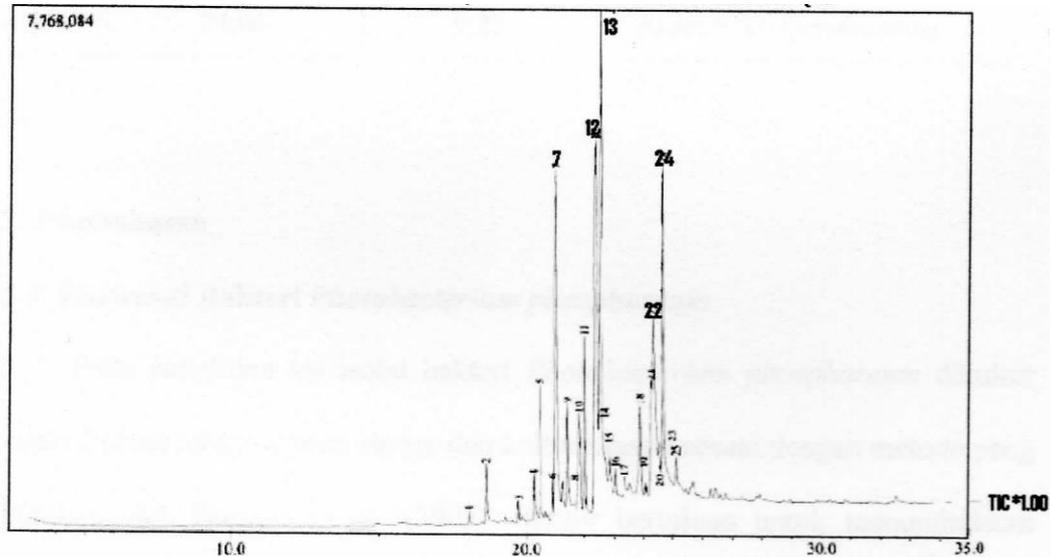
Pada tabel 3 hasil fraksinasi diatas fraksi 1 merupakan gabungan dari vial nomor 4-7 berdasarkan jumlah noda dan nilai R_f yang sama. Yaitu jumlah noda dua dan nilai R_f 0,937 dan 0,525. Fraksi 2 merupakan gabungan dari vial nomor 8-11 dengan jumlah noda dua yaitu 0,962 dan 0,825. Fraksi 3 merupakan gabungan dari vial nomor 12-15 dengan jumlah noda tiga yaitu 0,975; 0,600 dan 0,400. Fraksi 4 merupakan gabungan dari vial nomor 16-19 dengan jumlah noda dua yaitu 0,925 dan 0,825. Fraksi 5 merupakan gabungan vial nomor 20-23 dengan jumlah noda dua yaitu 0,487 dan 0,350. Serta fraksi 6 merupakan gabungan vial nomor 24-31.

Berdasarkan hasil pengujian dengan KLT, ekstrak kasar kloroform supernatan bakteri *Photobacterium phosphoreum* mengalami pemisahan komponen yang terbaik diperoleh dengan menggunakan eluen campuran kloroform : metanol dengan perbandingan 1 : 2 yang membentuk empat noda. Banyaknya noda yang terbentuk menunjukkan kemampuan eluen untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Eluen ini selanjutnya digunakan untuk pemisahan KKT.

Fraksinasi ekstrak kasar dilakukan dengan menggunakan KKT dengan adsorben Silika Gel. Adsorben silika gel bersifat ringan terhadap sebagian besar senyawa dan secara luas digunakan dalam pemisahan berbagai jenis kelompok fungsional hidrokarbon, alkohol, ester, asam dan senyawa amina. Eluen yang digunakan adalah campuran kloroform dan metanol yang ditingkatkan kepolarannya yaitu dengan perbandingan (1 : 1), (1 : 2), (1 : 3) dan (1 : 4) dengan volume masing-masing 55 mL. Hal ini bertujuan agar senyawa yang terkandung dalam ekstrak kloroform dapat terpisah dengan baik dan optimal berdasarkan kepolarannya (Fessenden dan Fessenden, 1983). Dari hasil KKT didapatkan 31 tumpukan dengan volume masing-masing 7 mL, yang dianalisis lebih lanjut menggunakan KLT dan diperoleh 6 fraksi.

Analisis GC/MS

Untuk menduga kandungan senyawa yang terdapat dalam fraksi 5, dilakukan analisa dengan OC/MS. Kromatogram analisa OC/MS ditampilkan pada gambar 1.



Gambar 1. Kromatogram Gas Cromatography / Mass Spectrometry Fraksi 5.

Berdasarkan kromatogram diatas, fraksi 5 dari ekstrak *P. phosphoreum* mengandung sedikitnya 25 senyawa. Dari 25 senyawa tersebut puncak tertinggi mengindikasikan kelimpahan senyawa, maka dipilih 5 senyawa yang puncaknya paling tinggi yaitu puncak 7, 12, 13, 22 dan 24 untuk diidentifikasi. Hasil identifikasi senyawa disajikan pada tabel 7.

Tabel 4. Identifikasi senyawa dalam ekstrak kloroform *Photobacterium phosphoreum*

No	Warna (menit)	Luas puncak (%)	Senyawa
7	21,042	12,03	asam pentadekanoat
12	22,372	18,7	asam 9-Hexadekenoat
13	22,546	28,22	asam palmitat
22	24,336	7,93	asam 13-docosenoat
24	24,66	9,22	asam 9, 11-octadekanoat

Analisa GC/MS terhadap fraksi 5 menyatakan bahwa kandungan fraksi 5 paling sedikit mengandung 25 senyawa. Lima senyawa yang kelimpahannya terbesar diidentifikasi yaitu asam pentadekanoat, asam 9-Hexadekenoat, asam palmitat, asam 13-docosenoat, asam 9, 11-octadekanoat. Asam umumnya menunjukkan ion molekuler yang jelas limpahan relatifnya. Asam lemak dan turunan-turunannya dapat memberikan efek terhadap mikroorganisme dengan mempengaruhi membran lipidnya. Efek ini menyebabkan gangguan pada fasa lipid dan selanjutnya mengubah permiabelitas organisme. Disamping itu asam lemak dan turunannya cenderung sebagai bahan kimia pembasmi kuman yang sifat toksiknya paling rendah. Pada uji aktivitas antibakteri, fraksi 5 merupakan fraksi paling aktif terhadap bakteri *Escherichia coli* yang merupakan gram negatif. Asam palmitat (asam heksadekanoat) efektif dalam membunuh beberapa bakteri gram negatif. Asam lemak jenuh yakni asam laurat (C12) sampai asam stearat (C18) pada konsentrasi yang cukup dapat membunuh *Shigella paradysentrie* dan *Salmonella paratyphi*.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian aktivitas antibakteri, dapat diambil kesimpulan yaitu aktivitas antibakteri ekstrak kasar *Photobacterium phosphoreum* dapat menghambat keempat jenis bakteri uji, dengan diameter zona hambatan terbesar terjadi pada *Escherichia coli* (9,80 ± 0,75 mm) dan diameter terkecil terjadi pada bakteri

Salmonella sp. ($6,03 \pm 0,05$ mm). Hasil fraksiasi ekstrak *Photobacterium phosphoreum* diperoleh 6 fraksi. Dari hasil analisa OC/MS terdapat 5 senyawa yang memiliki kelimpahan terbesar yaitu asam pentadekanoat, asam 9-hexadekanoat, asam palmitat, asam 13-docosenoat, asam 9, 11-octadekanoat.

DAFTAR PUSTAKA

- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2):71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Besednova, N. N., Zaporozhets, T. S., Kovalev, N. N., Makarenkova, I. D., Yakovlev, Y. M. (2017). Cephalopods: The potential for their use in medicine. *Russian Journal of Marine Biology*, 43(2):101–110. <https://doi.org/10.1134/S1063074017020031>
- Girija, S., Duraipandian, V., Kuppusamy, P. S., Gajendran, H., Rajagopal, R. (2014). Chromatographic Characterization and GC-MS Evaluation of the Bioactive Constituents with Antimicrobial Potential from the Pigmented Ink of *Loligo duvauceli*. *International Scholarly Research Notices*, 2014:1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/820745>
- Jeyasanta, I., Patterson, J. (2019). Bioactive Properties of Ink Gland Extract from Squid *Loligo duvauceli*. *Ecologia*, 10(1):9–19. <https://doi.org/10.3923/ecologia.2020.9.19>
- Pringgenies, D., Sejati, S. (2004). Isolasi dan Determinasi Bakteri Luminesensi yang Bersimbiosis pada Cumi-cumi *Loligo duvauceli*. *ILMU KELAUTAN: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 9(1):26–30. <https://doi.org/10.14710/ik.ijms.9.1.26-30>
- Rajasekharan Nair, J., Pillai, D., Joseph, S. M., Gomathi, P., Senan, P. V., Sherief, P. M. (2011). Cephalopod research and bioactive substances. *Indian Journal of Marine Sciences*, 40(1):13–27.
- Rudiana, E., Pringgenies, D. (2004). Morfologi dan Anatomi Cumi-Cumi *Loligo duvauceli* yang Memancarkan Cahaya. *ILMU KELAUTAN: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 9(2):96–100. <https://doi.org/10.14710/ik.ijms.9.2.96-100>
- Yuvaraj, D., Suvasini, B., Chellathai, T., Fouziya, R., S, I. R., Chandran, M. (2015). Research Article Anti-bacterial studies on the different body parts of *Loligo duvauceli*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(6):406–408.