

Skripsi

**STUDI *IN VITRO* ENZIM L-GLUTAMINASE DARI BAKTERI SIMBION
ALGA MERAH *Eucheuma spinosum* SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN
ANTI-KANKER**

MOELKHAIVA.M

H031 17 1313



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**STUDI *IN VITRO* ENZIM L-GLUTAMINASE DARI BAKTERI SIMBION
ALGA MERAH *Eucheuma spinosum* SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN
ANTI-KANKER**

*Hasil penelitian ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar sarjana sains*

Oleh

MOELKHAIVA.M

H031171313



**MAKASSAR
2023**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**STUDI IN VITRO ENZIM L-GLUTAMINASE DARI BAKTERI SIMBION
ALGA MERAH *EUCHEUMA SPINOSUM* SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN
ANTIKANKER**

Disusun dan diajukan oleh

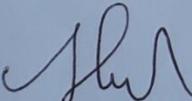
MOELKHAIVA. M

H031 17 1313

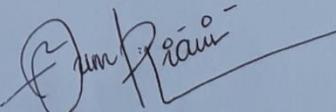
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sidang Sarjana Program Studi
Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Pada 13 Februari 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

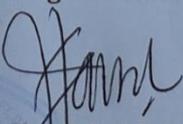
Pembimbing Utama


Prof. Dr. Ahyar Ahmad
NIP. 196712311991031020

Pembimbing Pertama


Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si
NIP. 19811209 200604 2 003

Ketua Program Studi


Dr. St. Fauziah, M. Si
NIP. 19720202 199903 200

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Moelkhaiva. M

NIM : H031171313

Program Studi : Kimia

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul “Studi In vitro enzim L-glutaminase dari bakteri sionbion alga merah *Eucheuma spinosum* sebagai Antibakteri dan antikanker” adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 13 Februari 2023

Menyatakan



Moelkhaiva. M



PRAKATA

Alhamdulillah Rabbilalamin, dengan nama Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang. Sembah sujud dan rasa syukur hamba haturkan kehadirat-Nya, karena hanya dengan rahmat, hidayah, inayah, serta izin-Nya yang telah memberikan kekuatan dan kesabaran kepada penulis, sehingga skripsi ini dapat terlaksana sebagaimana adanya. Sholawat serta salam tak lupa kita kirimkan kepada baginda Rasulullah SAW yang telah mengangkat derajat manusia dari jaman jahilia menuju jaman peradaban ilmu.

Limpahan rasa hormat, bakti serta doa yang tulus, penulis persembahkan kepada Ibunda Najmiani dan ayahanda Munding, yang telah membesarkan, mendidik dengan penuh keikhlasan dan kesabaran serta saudara saudariku Kakak Uni, Ati, Alling, Allung, Maman, Innang dan Adek-adekku Ica, Fuan serta Kakak-kakak Ipar Kak Salim, Kak Nahar, Kak Mutia dan Kak Ayu.

Terima kasih saya ucapkan kepada:

1. **Prof. Dr. Ahyar Ahmad, Ph.D**, selaku dosen pembimbing utama, dan **Dr. Nur Umriani P., M. Si**, selaku dosen pembimbing pertama yang telah membimbing saya dengan begitu luar biasa, meluangkan banyak waktu dan memberikan dorongan, masukan dan saran-saran selama peyusunan skripsi
2. **Abdur Rahman Arif, S. S,M.Si**, selaku koordinator seminar Proposal dan Hasil selama proses penyusunan skripsi ini.
3. **Prof. Dr. Abd. Wahid Wahab, M.Sc** dan **Dr. Syahrudin Kasim, S.Si, M.Si** sebagai tim dosen penguji yang telah memberikan banyak ilmu dan masukan selama proses penyusunan skripsi ini.

4. Seluruh staf pegawai lingkup fakultas dan analis Laboratorium di Departemen Kimia, terkhusus untuk **Ibu Mahdalia, S.Si, M.Si** dan **Andi Akbar, Si.Si**, selaku analis laboratorium Biokimia atas bantuan semangat serta arahannya selama penelitian berlangsung. Ucapan terima kasih juga kepada analis Laboratorium Bioteknologi Fakultas Perternakan Unhas **Kak Tri** dan analis Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Unhas **Pak Markus**
5. Semua rekan kerja peneliti di lab biokimia terkhusus teman panel **Fardo, Salim** dan **Fadli** yang telah berjuang bersama, mengeluh bersama dan menyelesaikan tugas akhir ini bersama-sama, juga untuk teman peneliti lain **Ana, Esse, Wiwinda** senantiasa menemani, memberikan semangat dan membantu dari penyusunan skripsi hingga selesai.
6. Teman-teman **KIMIA 2017** yang selalu ada dari awal perkuliahan hingga saat ini. Semua pihak yang tidak sempat tertulis namanya yang telah memberikan dukungan maupun bantuan kepada penulis.
7. **Kakak-Kakak S2 dan S3 Kak Lulu, Kak Nure, Kak Mira dan Kak Sarni** yang telah membantu dan memberi saran selama penelitian berlangsung.

Semoga segala bentuk bantuan, yaitu doa, saran, motivasi dan pengorbanan yang telah diberikan kepada penulis dapat bernilai ibadah dan diganjarkan pahala di sisi Allah Subhanahu wa Ta'ala. Aamiin.

Makassar, 23 Januari 2023

Moelkhaiva. M
NIM. H031171313

ABSTRAK

Penelitian studi *in vitro* enzim L-glutaminase dari bakteri simbion alga merah *Euclima spinosum* sebagai antibakteri dan antikanker telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri simbion penghasil enzim L-glutaminase dari alga merah *Euclima spinosum* yang dikumpulkan dari desa Laikang, kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan yaitu bakteri *Cobetia marina*. Pemurnian enzim L-glutaminase melalui fraksinasi dengan amonium sulfat dan dialisis. Enzim ekstraseluler dimurnikan menggunakan metode fraksinasi amonium sulfat dengan hasil aktivitas enzim tertinggi yaitu pada kejenuhan 60-80% diperoleh aktivitas spesifik sebesar 13,2624 Unit/mg. Aktivitas enzim L-glutaminase optimum pada kondisi: pH 8, suhu 37 °C dan stabil selama 30 menit waktu inkubasi, serta diaktifkan oleh ion logam Mg^{2+} , Co^{2+} dan Mn^{2+} . Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar menggunakan *blank disc* menunjukkan adanya enzim L-glutaminase 5 mg/L yang memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri patogen yaitu *Escherichia coli* dengan zona hambatan 8,30 mm dan *Staphylococcus aureus*. Dengan zona hambatan 15,30 mm. Uji toksisitas dengan metode BSLT didapatkan pada fraksi enzim tertinggi F1 memiliki toksisitas tertinggi dengan nilai LC_{50} 14,4309 ppm. Uji sitotoksik dengan metode MTT menunjukkan bahwa fraksi terkuat pada fraksi F1 pada konsentrasi 160 $\mu\text{g/mL}$ memiliki nilai persen inhibisi dan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 25,65% dan 64,26 $\mu\text{g/mL}$.

Kata Kunci: Alga merah, bakteri simbion, *Cobetia marina*, L-glutaminase.

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR ARTI SIMBOL DAN SINGKATAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Maksud Penelitian	6
1.3.2 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Tinjaun Umum Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i>	8
2.2 Tinjaun Umum Bakteri Simbion Alga	10
2.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	11
2.4 Tinjaun Umum Antibakteri	13
2.5 Tinjaun Umum Antikanker	15
2.6 Tinjaun Umum Enzim L-Glutaminase.....	16
2.7 Tinjaun Umum Bakteri Uji	18
2.7.1 <i>Echerichia coli</i>	18
2.7.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.8 Uji Aktivitas Antibakteri.....	20
2.9 Uji Aktivitas Antikanker	22

BAB III METODE PENELITIAN.....	23
3.1 Bahan Penelitian.....	23
3.2 Alat Penelitian	23
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	24
3.4 Prosedur Penelitian.....	24
3.4.1 Pembuatan Media.....	24
3.4.1.1 Media <i>Nutrient Broth</i> (NB)	24
3.4.1.2 Media <i>Nutrient Agar</i> (NA).....	24
3.4.1.3 Media <i>Mueller Hinton Agar</i>	24
3.4.1.4 Media Selektif	25
3.4.1.5 Media Produksi	25
3.4.2 Permapajaan Isolat Bakteri Simbion Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i>	25
3.4.3 Penentuan Waktu Optimum Bakteri Simbion Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i>	25
3.4.4 Produksi Enzim L-Glutaminase dari Isolat Bakteri Simbion Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i>	26
3.4.5 Pemurnian Enzim L-Glutaminase dari Isolat Bakteri Simbion Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i>	26
3.4.5.1 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	27
3.4.5.2 Dialisi dalam Membran Selofan.....	27
3.4.6 Penentuan Aktivitas Enzim dan Aktivitas Spesifik Enzim L-Glutaminase dari Simbion Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i>	28
3.4.7 Karakterisasi Aktivitas Enzim L-Glutaminase dari Isolat Bakteri Simbion Alga merah <i>Eucheuma spinosum</i>	30
3.4.7.1 Karakterisasi Variasi pH	30
3.4.7.2 Karakterisasi Variasi Suhu	30

3.4.7.3 Karakterisasi Variasi Waktu.....	31
3.4.7.4 Karakterisasi dengan Penambahan Logam.....	31
3.4.8 Uji Aktivitas Antibakteri Enzim L-Glutaminase dari Isolat Bakteri Simbion Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i>	31
3.4.8.1 Pembuatan Media <i>Nutrient Agar</i> dan <i>Mueller-Hinton Agar</i>	31
3.4.8.2 Penyiapan Bakteri Uji	31
3.4.8.3 Pembuatan Larutan Kontrol	31
3.4.8.4 Uji Daya Hambat Enzim dengan Metode Difusi Agar.....	32
3.4.9 Uji Sifat Toksisitas dengan Menggunakan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)</i>	32
3.4.10 Uji Sitotoksik Enzim L-Glutaminase terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 dengan Metode MTT	34
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Skrining Isolat Bakteri Simbion Penghasil Enzim L-Glutaminase	36
4.2 Optimasi dan Produksi Pertumbuhan Bakteri Simbion.....	36
4.3 Pemurnian Enzim L-Glutaminase dari Bakteri Simbion	37
4.3.1 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat	38
4.3.2 Dialisis dengan Membran Selofan	40
4.4 Penentuan Aktivitas Enzim L-Glutaminase dari Bakteri Simbion.....	46
4.5 Karakterisasi Enzim L-Glutaminase dari Bakteri Simbion	47
4.5.1 Karakterisasi Enzim dengan Variasi pH	47
4.5.2 Karakterisasi Enzim dengan Variasi Suhu Inkubasi	48
4.5.3 Karakterisasi Enzim dengan Variasi Waktu Fermentasi.....	50
4.5.4 Karakterisasi Enzim dengan Penambahan Logam	51
4.6 Uji Antibakteri Enzim L-Glutaminase dari Bakteri Simbion	53

4.7 Uji Toksisitas Enzim L-Glutaminase dari Bakteri Simbion	56
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	61
5.1 Kesimpulan.	61
5.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA	63
LAMPIRAN.....	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i>	9
2. Fase Pertumbuhan Bakteri	12
3. Reaksi hidrolisis oleh enzim L-glutaminase	16
4. Pengaruh waktu fermentasi terhadap <i>optical density</i> dan kadar protein pada pertumbuhan bakteri simbion	35
5. Reaksi Folin-ciocalteu pada metode Lowry.	42
6. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim L-glutaminase	45
7. Pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas enzim L-glutaminase	46
8. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim L-glutaminase ..	47
9. Pengaruh penambahan logam terhadap aktivitas enzim L-glutaminase	16

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Diagram Alir	59
2. Peremajaan Isolat Bakteri Symbion Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i>	60
3. Penentuan Waktu Pertumbuhan Optimum Bakteri Symbion Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i>	60
4. Bagan Kerja Produksi Enzim L-Glutaminase	61
5. Bagan Kerja Fraksinasi Enzim L-Glutaminase dengan Amonium Sulfat	62
6. Bagan Kerja Dialisis	63
7. Prosedur Penentuan Kadar Protein Sampel dengan Metode Lowry	64
8. Penentuan Aktivitas Enzim L-Glutaminase dengan Metode Nessler	65
9. Skema Karakterisasi Aktivitas Enzim L-Glutaminase	66
10. Bagan Kerja Uji Antibakteri dengan Metode Difusi Agar	70
11. Bagan Kerja Uji Sifat Toksisitas dengan Menggunakan Metode BSLT	71
12. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry	72
13. Pembuatan Larutan Buffer Tris-HCl	73
14. Pembuatan Reagen Nessler	74
15. Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumin</i> pada λ 630 nm	75
16. Data Hasil Penentuan Waktu Produksi Optimum Protein dari Bakteri Symbion dan <i>Optical Density</i> (OD)	76

17. Penambahan Ammonium Sulfat pada Tahap Fraksinasi berbagai Tingkat Kejenuhan.....	77
18. Tabel Tingkat Kejenuhan Ammonium Sulfat.....	78
19. Pengukuran Kadar Protein Dialisat Enzim L-Glutaminase	79
20. Kurva Standar NH ₄ Cl pada λ 390 nm.....	80
21. Tabel Aktivitas Enzim L-Glutaminase	81
22. Karakterisasi Aktivitas Enzim L-Glutaminase	82
23. Tabel Harga Probit.....	84
24. Perhitungan LC ₅₀	85
25. Hasil Pengamatan Uji Antibakteri Enzim L-Glutaminase.....	89
26. Dokumentasi	90

DAFTAR ARTI SIMBOL DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Arti
BSLT	<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BHIB	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
g	gram
kDa	kiloDalton
LC50	<i>Lethaly Concentration</i>
m	meter
mg	miligram
mg/mL	miligram per mililiter
mL	mililiter
nm	nano meter
M	Molaritas
MHA	<i>Muller Hilton Agar</i>
MR	<i>Methyl Red</i>
N	Normalitas
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Borth
OD	<i>Opticial Density</i>
pH	potensial hidrogen
ppm	part per million
rpm	part per million
<i>sp.</i>	spesies
<i>UV-Vis</i>	<i>Ultra Violet Visible</i>
U/mg	Unit Per Miligram
U/mL	Unit Per Mililiter
%	persen
°C	derajat celcius
µl	mikroliter
α	alpha
β	beta
γ	gamma
λ	lamda

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kecenderungan kembali ke alam (*back to nature*) telah mendorong perhatian masyarakat kepada sumber daya alam yang ada di Indonesia, salah satunya yaitu biota laut yang telah menarik perhatian untuk dijadikan sebagai aset potensial yang dapat didayagunakan menjadi beragam produk. Hal ini disebabkan biota laut merupakan bahan alam yang sangat kaya senyawa aktif dengan aktivitas biologi dan struktur yang unik. Sebanyak kurang lebih 10.000 senyawa bioaktif dilaporkan telah diekstraksi dari berbagai biota laut. Banyak di antaranya menunjukkan aktivitas farmakologi yang sangat potensial dikembangkan sebagai antivirus, antimikroba dan antikanker (Rumengan dkk.,2014). Hal ini menunjukkan industri farmasi mulai meneliti organisme laut sebagai bahan untuk obat baru dari produk alami (Nuzaha dan Muchtaridi, 2017). Salah satu dari keanekaragaman biota laut yang dapat dimanfaatkan adalah makroalga.

Rumput laut (makroalga) tumbuh di perairan tropis dan mendapat banyak paparan kuat dari sinar matahari. Kondisi ini menyebabkan tingginya jumlah senyawa reaktif radikal yang dapat melindungi atau mengurangnya, maka alga laut mengubah metabolismenya dan menstimulasi pembentukan beberapa senyawa bioaktif (Santoso dkk., 2010). Senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam alga laut diantaranya adalah polisakarida, lipid, protein, alkaloid dan senyawa fenol. Alga laut mengandung serat, karbohidrat, lemak yang rendah, mineral, vitamin dan asam amino yang bermanfaat untuk kesehatan. Metabolit lainnya yaitu *polysulfated polisaccharides*

seperti laminaran, rhamnan sulfat, galaktosil gliserol dan fukoidan yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antialergik, anti-HIV, antikanker dan antikoagulan. Penelitian lain juga melaporkan bahwa alga laut memiliki aktivitas antibakteri dan antiinflamasi (Amaranggana dan Nasrul, 2016). Salah satu jenis alga laut yang dibudidayakan di Indonesia adalah alga merah *Eucheuma* sp. (Mattulada dkk., 2018).

Alga merah mampu menghasilkan metabolit aktif untuk melindungi diri dari serangan penyakit maupun predator. Potensi metabolit bioaktifnya telah terbukti memiliki aktivitas biologis seperti antivirus, antioksidan, antijamur dan antiinflamasi (Srikong dkk., 2015). Senyawa metabolit sekunder yang disintesis oleh alga merah yaitu karatenoid, polifenol, terpenoid, xantofil dan alkaloid (Kasanah dkk., 2015). Salah satu spesies alga yang potensial untuk dikembangkan dan dimanfaatkan adalah *Eucheuma* sp. yang tumbuh tersebar luas di perairan Indonesia.

Alga merah *Eucheuma* sp. merupakan jenis alga yang lebih banyak memiliki aktivitas biologi dibandingkan dengan jenis alga lainnya. Senyawa-senyawa kimia yang ada pada alga merah didominasi dari famili *Rhodomelaceace*. Alga merah juga merupakan sumber pembentuk utama senyawa halogen yaitu senyawa-senyawa pembentuk garam. Senyawa halogen yang memiliki beragam aktivitas seperti antibakteri, antifungi, antiinflamasi, sitotoksik dan insektisidal. Alga merah menjadi sumber penting yang dapat dikembangkan menjadi sumber bahan obat yang berasal dari alam (Amaranggana dan Nasrul, 2016). Senyawa-senyawa kimia seperti triterpenoid, alkaloid, flavonoid dan asam askorbat juga terdapat dalam ekstrak alga merah *Eucheuma* sp. (Mattualada dkk., 2018). Spesies alga *Eucheuma spinosum* (Mattualada dkk., 2018) dilaporkan berpotensi sebagai antibakteri, *Eucheuma denticulatum* sebagai antioksidan dan antiinflamasi (Balasubramanian dkk., 2015).

Alga merah *Eucheuma cottonii* dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri (Selven dkk., 2014), antioksidan (Adawiah dkk., 2015) dan antikanker (Arsianti dkk., 2012). Sejauh ini eksplorasi alga *Eucheuma spinosum* secara berlebihan dapat menyebabkan kepunahan padahal untuk mengisolasi senyawa antibakteri dan antikanker dari alga *Eucheuma spinosum*, dibutuhkan jumlah yang banyak. Salah satu metode alternatif yang dapat digunakan dan dikembangkan adalah dengan memanfaatkan bakteri simbiosis dari alga merah *Eucheuma spinosum*.

Alga yang bersimbiosis dengan organisme inangnya disebut alga simbiosis dan menghasilkan senyawa-senyawa yang umumnya menyerupai dengan inangnya yang bersifat sebagai antibakteri, antikanker, antiinflamasi dan lain-lain. Alga secara alami akan bersimbiosis dengan berbagai macam mikroba yang ada di sekelilingnya salah satunya ialah koloni bakteri (Muftihah dkk., 2017) karena bakteri memiliki kecenderungan untuk bersimbiosis dengan suatu lapisan permukaan padat yang ada di sekelilingnya (Sidharta, 2000). Umumnya bakteri yang hidup dengan cara berasosiasi dengan makhluk hidup laut menunjukkan potensi besar dalam sekresi metabolit sekunder dengan sifat bioaktif (Sabdaningsih dkk., 2013). Oleh karena itu, pemanfaatan bakteri simbiosis alga adalah salah satu solusi alternatif yang paling baik (Nurhaedar, 2008).

Bakteri yang diketahui secara simbiosis menghasilkan senyawa bioaktif yang sama seperti inangnya. Senyawa aktif ini digunakan untuk mempertahankan diri dari bahaya lingkungan (Muftihah dkk., 2017). Adanya interaksi metabolit bioaktif yang dihasilkan oleh biota laut dengan bakteri yang bersimbiosis menyebabkan bakteri terinduksi untuk menghasilkan suatu metabolit bioaktif yang spesifik (Sartika, 2014). Bakteri *Lactobacillus* sp. (Muftihah dkk., 2017) merupakan spesies bakteri yang

bersimbion dengan makroalga termasuk pada alga merah. Bakteri simbion alga merah yang mampu hidup di laut tergolong bakteri yang halotoleran atau toleran terhadap salinitas. Kelebihan ini membuat bakteri yang bersimbion dengan alga merah memiliki potensi untuk dimanfaatkan dalam skala industri seperti pemanfaatannya dalam penghasil enzim salah satunya yaitu enzim glutaminase (Ventosa dkk., 1998).

Enzim L-glutaminase merupakan enzim aminohidrolase yang mengkatalisis proses deaminasi secara hidrolisis dari L-glutamin dan menghasilkan asam L-glutamat dan amonia. Enzim L-glutaminase sering dijadikan bahan dalam industri makanan dan obat-obatan khususnya antibakteri dan terapi kanker (Sinha dan Nigam, 2016). Antibakteri merupakan zat kimia yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain (Singkoh, 2011). Enzim L-glutaminase berpotensi dijadikan antibakteri sebab dapat menghambat laju pertumbuhan bakteri patogen. Selain memiliki aktivitas antibakteri enzim L-glutaminase juga berpotensi sebagai antikanker yang telah banyak menjadi perhatian. Enzim L-glutaminase dapat menghambat laju pertumbuhan sel tumor sebab konsentrasi glutamin dalam sel tumor menjadi semakin berkurang dan menyebabkan kematian sel tumor penyebab kanker. Enzim L-glutaminase umumnya dijadikan sebagai alternatif untuk terapi enzim untuk kanker terutama leukimia (Sabu, 2003).

Beberapa peneliti sebelumnya telah berhasil menemukan bakteri simbion alga merah *E. cottonii* yang dapat menghasilkan enzim L-glutaminase dalam spesies *Citrobacter freundii* dengan aktivitas enzim yaitu 14,9573 U/mL dengan aktivitas spesifik sebesar 1.3659 U/mg. Pada uji toksisitas dengan metode BSLT menunjukkan bahwa fraksi enzim L-glutaminase bersifat toksik dengan LC₅₀ yaitu 85,01 ppm pada F1 dan 56,78 ppm pada F3. Pada uji antibakteri menunjukkan bahwa enzim L-

glutaminase dikategorikan bekerja secara bakteriosidal dengan diameter daya hambat sebesar 10,00 mm pada F1 terhadap *E.coli* dan 14,44 mm pada F3 terhadap *S aureus*. (Nurvita, 2019). Putri (2015) telah berhasil menunjukkan bahwa enzim L-glutaminase dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan aktivitas spesifik 25,74 U/mL yang dilakukan secara *in vitro* dengan metode difusi agar (Putri, 2015). Enzim L-glutaminase yang diisolasi dari bakteri *Streptomyces canarius* dengan aktivitas spesifik 132,2 U/mg dapat menghambat pertumbuhan sel Hep-G2 dan sel HeLa (Reda, 2014). Hasil karakterisasi enzim L-glutaminase menunjukkan bahwa enzim ini bekerja optimal pada suhu 37-45 °C dan pH 7. Enzim stabil ketika dilakukan penambahan NaCl sampai dengan 8% dan mulai berkurang ketika penambahan 16 dan 20%. Penambahan ion logam Mn^{2+} , Mg^{2+} dan Co^{2+} dalam bentuk garam klorida mampu meningkatkan kinerja enzim sementara penambahan ion Zn^{2+} , Fe^{3+} dan Ca^{2+} mengurangi aktivitas enzim. Enzim ini diperkirakan memiliki berat molekul 42 kDa dan 145 kDa (Yulianti dkk., 2012)

Berdasarkan uraian di atas, maka dilakukan penelitian ini untuk mengisolasi enzim L-glutaminase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum*. yang dimurnikan dengan proses fraksinasi dan dialisis. Fraksi enzim diuji aktivitas antibakterinya secara *in vitro* dengan metode difusi agar dan uji toksisitasnya menggunakan metode *Brain shrimp Lethality Test* (BSLT) sebagai acuan aktivitas antikanker enzim L-glutaminase.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. apakah spesies bakteri simbion dari alga merah *Eucheuma spinosum* dapat menghasilkan enzim L-glutaminase?

2. bagaimana karakteristik aktivitas enzim L-glutaminase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum*?
3. bagaimana potensi aktivitas antibakteri enzim L-glutaminase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum* secara *in vitro*?
4. bagaimana potensi toksisitas dan sitotoksik enzim L-glutaminase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk menentukan karakteristik aktivitas enzim L-glutaminase dari simbion alga merah *Eucheuma spinosum* serta menentukan bioaktivitasnya sebagai antibakteri dan sifat toksisitas serta sitotoksitas sebagai antikanker.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. menentukan spesies bakteri simbion dari alga merah *Eucheuma spinosum* dapat menghasilkan enzim L-glutaminase
2. menentukan karakteristik aktivitas enzim L-glutaminase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum*.
3. menentukan aktivitas antibakteri enzim L-glutaminase terhadap bakteri uji Gram positif dan negatif.
4. menguji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan sitotoksitas dengan metode Kolorimetri Microtetrazolium (MTT)

terhadap enzim L-glutaminase dari bakteri simbion alga merah *Eucheuma spinosum*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah mengenai bakteri simbion dari alga merah *Eucheuma spinosum* yang dapat menghasilkan enzim L-glutaminase sehingga menambah informasi ilmiah dalam bidang mikrobiologi. Selain itu, penelitian ini juga diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai aktivitas antibakteri secara *in vitro* dan toksisitas enzim L-glutaminase sehingga dapat dikembangkan sebagai bahan dasar obat antibakteri dan antikanker yang baru.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Alga Merah *Eucheuma spinosum*

Perairan Indonesia sebagai biodeversitas wilayah tropis memiliki sumberdaya plasma nutfah alga laut sebesar 6,42% dari total biodeversitas rumput laut dunia. Alga laut dari kelas alga merah (*Rhodophyceae*) menempati urutan terbanyak dari jumlah jenis yang tumbuh di perairan laut Indonesia yaitu sekitar 254 jenis setelah itu alga hijau (*Chlorophyceae*) sekitar 196 jenis alga coklat (*Phaeophyceae*) sekitar 134 jenis (Pakidi, 2016). Salah satu jenis alga laut yang potensial dan banyak dijumpai di perairan Indonesia adalah *Eucheuma* sp. yang dapat menghasilkan karaginan. Karaginan adalah senyawa yang diekstraksi dari rumput laut dari famili *Rhodophyceae* seperti *Eucheuma spinosum* dan *Eucheuma cottoni*. Karaginan juga merupakan campuran yang kompleks dari beberapa polisakarida. Ada tiga jenis karaginan lambda, kaffa dan ioda (Hudha dkk., 2012).

Alga merah *Eucheuma spinosum* merupakan tumbuhan tingkat rendah yang belum dapat dibedakan antara batang, akar dan daunnya, alga merah menjadi salah satu bahan yang dijadikan bahan dasar dalam pembuatan obat, kosmetik dan bahan makanan sehingga alga merah menjadi salah satu bahan alam yang sudah diuji dari segi halalnya karena makanan atau minuman yang dapat dikategorikan halal atau tidaknya dapat dilihat dari segi kandungan serta proses pemanfaatannya. Alga merah tergolong dalam tumbuhan yang mengandung minyak nabati kering karena alga merah yang sebelum digunakan menjadi bahan dasar dalam pembuatan obat, kosmetik dan makanan terlebih dahulu mengalami proses pengeringan bahan dengan

panas secara alami atau dengan bantuan alat, baik dalam bentuk utuh (LPPOM MUI, 2013).

Ciri fisik yang dimiliki spesies *Eucheuma spinosum* ini diantaranya talus yang kasar, agak pipih dan bercabang teratur, yaitu bercabang dua atau tiga, ujung-ujung percabangan ada yang runcing dan tumpul dengan permukaan bergerigi, agak kasar dan berbintil-bintil pada talusnya. Tumbuh melekat ke substrat dengan alat perekat berupa cakram. Cabang-cabang pertama dan kedua tumbuh membentuk rumpun yang rimbun dengan ciri khusus mengarah kearah datangnya sinar matahari. Cabang-cabang tersebut ada yang memanjang atau melengkung seperti tanduk (Lasinrang, 2014). Menurut Anggadiredja dkk., (2009) klasifikasi *Euchema spinosium* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Rhodophyta
Kelas : Rhodophyceae
Ordo : Gigartinales
Famili : Solieracea
Genus : *Eucheuma*
Spesies : *Eucheuma spinosium*



Gambar 1. Alga merah *Eucheuma spinosum* (Anggadiredja dkk., 2006)

2.2 Tinjauan Umum Bakteri Simbiom Alga

Alga adalah salah satu ekosistem yang besar dan beragam, alga memainkan peran penting dalam lingkungan laut. Hal ini terutama terlibat dalam produksi primer global untuk menyediakan makanan dan sebagai tempat berlindung bagi berbagai organisme. Permukaan alga dapat menjaga bakteri yang ada dan juga kaya nutrisi untuk pertumbuhan bakteri. Alga memiliki keanekaragaman mikroorganisme yang beragam jika dibandingkan dengan organisme multiseluler lainnya. Mikroorganisme ini dapat menjadi hal bermanfaat atau berbahaya bagi alga. Bakteri epifit dilaporkan penting untuk pengembangan morfologi alga dan bakteri dengan sifat antibakteri diperkirakan dapat melindungi alga dari patogen dan organisme persaingan lainnya (Sulsilowati dkk., 2015).

Mikroorganisme yang berasosiasi dengan organisme laut akan mensintesis metabolit sekunder seperti yang dihasilkan oleh organisme inangnya. Senyawa halikondrin B misalnya, merupakan salah satu contoh senyawa alam dari laut dengan struktur sangat kompleks yang hanya dapat diisolasi dari organisme penghasilnya. Organisme yang dapat dikulturkan dalam jumlah besar, merupakan kondisi yang ideal untuk dilakukan eksplorasi kandungan senyawa kimia, beberapa diantaranya adalah mikroorganisme laut (Hasanah dkk., 2012).

Senyawa umum diasumsikan bahwa mikroorganisme mendapatkan keuntungan dari ketersediaan berbagai sumber karbon organik yang diproduksi oleh alga. Bakteri yang terdapat pada permukaan makroalga hidup dalam lingkungan yang sangat kompetitif dalam mendapatkan nutrisi. Dilaporkan bahwa bakteri simbiotik tersebut menghasilkan senyawa antibiotik yang lebih banyak dibandingkan dengan bakteri yang hidup bebas di air (Fitri dkk., 2015).

Alga hijau, merah dan coklat menghasilkan keragaman polisakarida kompleks yang merupakan komponen penting dinding sel alga. Polisakarida ini merupakan biomassa penting dalam ekosistem pesisir. Menariknya, berbeda dengan polisakarida tanaman terestrial, kebanyakan polisakarida alga bersifat non-lignoselulosa. Sedangkan biomassa lignoselulosa terdiri dari selulosa, lignin dan hemiselulosa, biomassa makroalga jauh lebih kompleks. Sekitar sepuluh polisakarida yang berbeda (misalnya agar, karagenan, ulvan) dan banyak monosakarida (misalnya glukosa, manosa, xilosa), ditemukan di tiga filum alga. Dengan demikian, bersama dengan polisakarida umum (misalnya selulase, β -glukosidase dan amilase), enzim aktif karbohidrase yang sangat spesifik ditemukan dalam mikroorganisme yang hidup di alga (Martin dkk., 2014).

2.3 Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pertumbuhan adalah meningkatnya jumlah kuantitas massa sel dengan terbentuknya sel baru. Terjadinya proses pertumbuhan tergantung dari kemampuan sel dalam membentuk protoplasma baru dari *nutrient* yang tersedia di lingkungan. Pada bakteri, pertumbuhan secara aseksual disebut dengan pembelahan biner. Pembelahan biner berlangsung dengan interval yang teratur dengan penambahan kelipatan secara eksponensial. Fase pertumbuhan bakteri merupakan fase pembelahan sel bakteri yang melalui beberapa fase (Riadi, 2016):

a) Fase Lag (Fase Penyesuaian)

Fase lag merupakan fase penyesuaian bakteri dengan lingkungan yang lama. Lama fase lag pada bakteri sangat bervariasi, tergantung pada komposisi media, pH, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologi mikro organisme pada media sebelumnya.

b) Fase Logaritma (Exponensial)

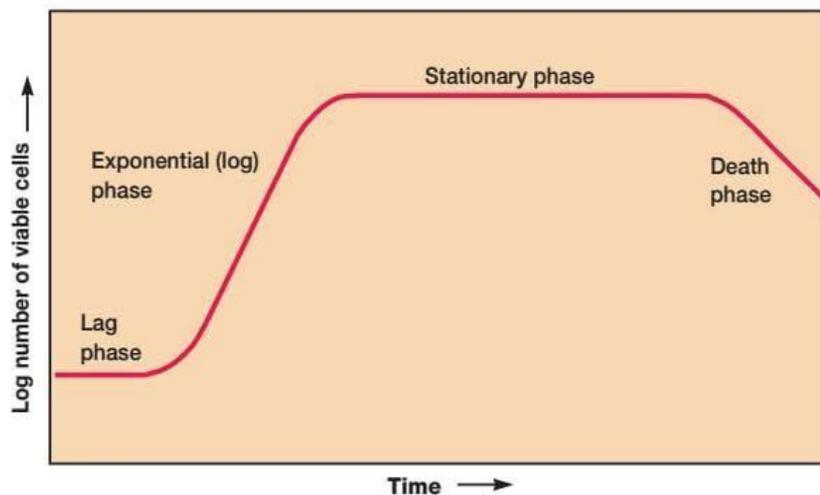
Fase Logaritma ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Setiap sel dalam populasi membelah menjadi dua sel. Variasi derajat pertumbuhan bakteri pada fase eskponensial sangat dipengaruhi oleh sifat genetik yang diturunkannya.

c) Fase Stasioner

Fase stasioner terjadi pada saat laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya. Sehingga jumlah bakteri keseluruhan akan tetap. Keseimbangan jumlah keseluruhan bakteri ini akan terjadi karena adanya pengurangan derajat pembelahan sel. Hal ini disebabkan oleh kadar nutrisi yang berkurang dan terjadi akumulasi produk toksik sehingga mengganggu pembelahan sel. Fase stasioner dilanjutkan dengan fase kematian yang ditandai dengan peningkatan laju kematian yang melampaui laju pertumbuhan, sehingga secara keseluruhan terjadi penurunan populasi bakteri.

d) Fase kematian

Fase kematian merupakan fase dimana laju kematian lebih besar.



Gambar 2. Fase Pertumbuhan Bakteri (Waluyo, 2004)

2.4 Tinjauan Umum Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang menghambat pertumbuhan bakteri dan digunakan secara khusus untuk mengobati infeksi. Berdasarkan cara kerjanya, antibiotik dibedakan menjadi bakteriostatik dan bakteriosidal. Antibakteri bakteriostatik adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan antibiotik bakteriosidal adalah zat bekerja mematikan bakteri. Beberapa zat antibiotik bersifat bakteriostatik pada konsentrasi rendah dan bersifat bakteriosidal pada konsentrasi tinggi (Gani, 2007).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibiotik dibagi menjadi lima kelompok, yaitu:

1. Antibakteri yang menghambat metabolisme sel bakteri

Antibakteri yang termasuk dalam kelompok ini adalah sulfonamide, trimetoprim, asam p-aminosalisilat (PAS) dan sulfon. Dengan mekanisme kerja ini diperoleh efek bakteriostatik. Bakteri membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Berbeda dengan mamalia yang mendapatkan asam folat dari luar, bakteri harus mensintesis sendiri asam para amino benzoate (PABA) untuk kebutuhan hidupnya (Setiabudy, 2007).

2. Antibakteri yang menghambat sintesis dinding sel bakteri

Antibakteri yang termasuk dalam kelompok ini adalah penisilin, sefalosporin, bastitrasin, vankomisin, ristosetin dan sikloserin. Dinding sel bakteri secara kimia adalah polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (Glikopeptida), antibiotik menghambat reaksi proses sintesa dinding sel, karena tekanan osmotik dalam sel bakteri lebih tinggi daripada diluar sel maka kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis, yang

merupakan dasar efek bakterisidal pada kuman yang peka (Ganiswarna, 1995).

3. Antibakteri yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri

Antibakteri yang termasuk dalam kelompok ini adalah polimiksin dan golongan polien serta berbagai golongan antibakteri kemoterapeutik. Antibakteri yang dapat mengubah tegangan permukaan (*surface active agents*) dapat merusak permeabilitas atau keutuhan selektif dari membran sel bakteri. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida (Setiabudy, 2007).

4. Antibakteri yang menghambat sintesis protein sel bakteri

Antibakteri yang termasuk dalam kelompok ini adalah aminoglikosid, makrolid, linkomisin, tetrasiklin dan kloramfenikol. Untuk kehidupannya, sel bakteri perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA pada bakteri, ribosom terdiri atas dua sub unit, yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Untuk berfungsi sebagai sintesis, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S (Setiabudy, 2007).

5. Antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri

Antibakteri yang termasuk dalam kelompok ini adalah rifampisin dan golongan kuinolon. Antibakteri yang memiliki mekanisme kerja ini pada umumnya kurang mempunyai sifat toksisitas selektif karena bersifat sitotoksik terhadap sel tubuh hospes. Karena itu hanya yang sifat sitotoksinya masih dapat diterima yang bermanfaat sebagai antibakteri (Setiabudy, 2007).

2.5 Tinjauan Umum Antikanker

Kanker merupakan salah satu penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan biologis lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang bersebelahan (invasi) atau dengan migrasi sel ke tempat yang jauh (metastatis). Berbagai usaha dilakukan untuk menyembuhkan penyakit kanker. Salah satu usaha yang sedang intensif dilakukan adalah melalui pencarian senyawa antikanker (Reda, 2014).

Antikanker merupakan zat kimia yang dapat menghambat atau mengganggu pertumbuhan sel tumor ganas. Senyawa-senyawa antikanker juga disebut sebagai agen-agen kemoterapeutik atau antineoplastik. Obat-obat antikanker dapat dibagi menjadi dua golongan sederhana yaitu golongan sitotoksik dan hormon. Obat golongan sitotoksik bertujuan untuk menghambat pertumbuhan sel, terutama sel-sel yang membelah. Contoh dari obat golongan ini adalah senyawa pengalkil, antibiotik, antimetabolit, serta berbagai obat lain. Sedangkan senyawa-senyawa hormonal digunakan untuk tumor-tumor pada jaringan yang sensitif hormon seperti payudara dan prostat (Stringer, 2008).

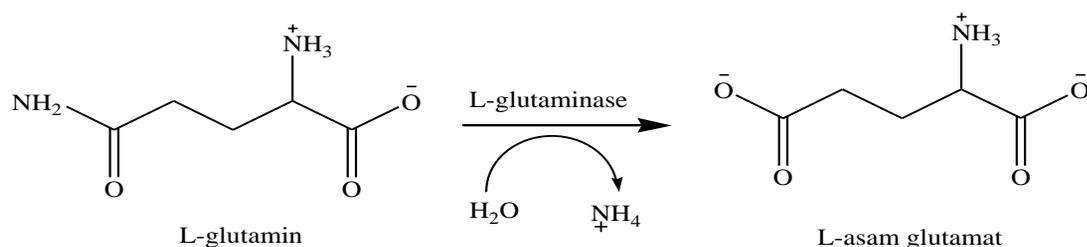
Obat antikanker diklasifikasikan menjadi enam golongan antara lain golongan senyawa pengalkilasi, antimetabolit, antikanker produk bahan alam, hormon, agen target molekular dan agen miscellaneous. Dari masing-masing golongan terbagi menjadi beberapa sub golongan antara lain golongan senyawa pengalkilasi terdiri dari 7 sub golongan antara lain sub golongan nitrogen mustard, etyleneimina dan methyleneimina, alkil sulfonat, nitrosourea, metilhidrazin, triazine dan platinum kompleks. Golongan antimetabolit terdiri dari 3 sub golongan, yaitu sub golongan antagonis asam folat, antagonis pirimidin, dan antagonis purin. Golongan produk

bahan alam terdiri dari 4 sub golongan, yaitu sub golongan vinca alkaloid, taxane, antibiotik antikanker dan inhibitor topoisomerase. Golongan agen target molekular terdiri dari 3 sub golongan, yaitu sub golongan retinoid, antibodi monoklonal, dan inhibitor tyrosin kinase. Terapi antikanker dapat diberikan secara per oral atau secara parenteral. Dengan adanya obat antikanker diharapkan memiliki toksisitas selektif, artinya hanya menghancurkan sel kanker tanpa harus merusak jaringan normal disekitarnya (Missailidis, 2008).

2.6 Tinjauan Umum Enzim L-Glutamiase

Enzim L-glutaminase (L-glutamin amidohidralase E.C 3.5.1.2) merupakan enzim yang banyak berada pada banyak organisme mulai dari bakteri hingga manusia memiliki enzim. Enzim L-glutaminase mengkatalisis deaminasi L-glutamin menjadi asam L-glutamat dan amonia. Enzim L-glutaminase merupakan enzim ekstraseluler. Enzim ekstraseluler merupakan hal yang penting dalam industri karena dapat meminimalisir biaya produksi (Ahmed dkk., 2016).

Penghambat sel tumor oleh glutamat adalah salah satu cara yang memungkinkan untuk menghentikan pertumbuhannya dan hal ini adalah yang terbaik yang dapat dicapai dengan penggunaan L-glutaminase yang memecah L-glutamin. Faktanya hasil dari sel tumor yang “lapar” ini karena tidak seperti sel normal lainnya, sel tumor kurang berfungsi dengan benar sebagai sistem biosintesis glutamin (Reda, 2014).



Gambar 3. Reaksi hidrolisis oleh enzim L-glutaminase (Arifin, 2009)

Glutamin merupakan suatu asam amino non-esensial yang konsentrasinya pada sel intraselulernya lebih tinggi dari asam amino lainnya. Glutamin dilepaskan dalam jumlah yang besar dari otot rangka dengan berperan sebagai pembawa dan donor penting dari nitrogen. Glutamin memegang peranan penting dalam pitalan interorgan dari nitrogen dan karbon telah terlihat sebagai energi oksidatif utama untuk pembelahan sel seperti enterosit dan limfosit. Sebagai tambahan, glutamin adalah substrat penting untuk menghasilkan amonia oleh ginjal, yang merupakan prekursor untuk pembentukan purin dan pirimidin, serta memegang peranan penting dalam regulasi sintesis protein (Arifin, 2009).

Reaksi glutaminase memainkan peran penting dalam metabolisme nitrogen dari prokariota dan eukariota. L-glutaminase adalah enzim hidrolitik yang menghidrolisis L-glutamin menjadi asam L-glutamat dan ion amonium. Enzim ini memiliki peran penting dalam metabolisme nitrogen. Enzim L-glutaminase digunakan sebagai zat penambah rasa dalam industri makanan yang bertindak dengan meningkatkan kandungan asam glutamat dalam makanan karena reaksi hidrolisis katalisasinya L-glutamin terhadap asam L-glutamat dan amonium. Ini juga digunakan dalam terapi enzim untuk kanker, terutama untuk leukemia limfositik akut. Penggunaan penting lain dari L-glutaminase adalah penerapannya pada biosensor untuk memantau tingkat glutamin pada sel mamalia dan hibridoma (Bulbul dan Karakus, 2013).

Enzim L-glutaminase secara luas terdistribusi pada jaringan hewan, tumbuhan dan mikroorganisme termasuk bakteri, jamur dan ragi. Berbagai mikroorganisme, termasuk bakteri, ragi dan jamur filamen baik dari habitat tanah maupun laut dilaporkan menghasilkan L-glutaminase. Produksi L-glutaminase ditemukan pada bakteri *Aspergillus wentii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus*

cereus, *Streptomyces canaris* telah dilaporkan oleh Sinha dan Nigam (2016), *Streptomyces avermitilis* oleh Abdallah dkk. (2013).

2.7 Tinjauan Umum Bakteri Uji

2.7.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan salah satu bakteri koliform yang termasuk dalam famili Enterobacteriaceae. Enterobacteriaceae merupakan bakteri enterik atau bakteri yang dapat hidup dan bertahan di dalam saluran pencernaan. *E. coli* merupakan bakteri berbentuk batang bersifat Gram-negatif, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan merupakan flora alami pada usus mamalia (Yang dan Wang 2014). Beberapa strain bakteri ini memberikan manfaat bagi manusia, misalnya mencegah kolonisasi bakteri patogen pada pencernaan manusia. Namun, ada beberapa kelompok lain yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia, yang dikenal sebagai *E. coli* patogen. *E. coli* patogen pertama kali teridentifikasi pada tahun 1935 sebagai penyebab diare (Manning 2010).

Klasifikasi bakteri *Escherichia coli* sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Divisi	: Proteobacteria
Classis	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Species	: <i>Escherichia coli</i>

Bakteri *E. coli* adalah satu jenis spesies utama bakteri gram negatif fakultatif anaerob yang mempunyai alat gerak berupa flagel dan tersusun dari sub unit protein

yang disebut flagelin, yang mempunyai berat molekul rendah dengan ukuran diameter 12-18 nm dan dengan panjang 12 nm, kaku dan berdiameter lebih kecil dan tersusun dari protein, pili dapat berfungsi sebagai jalan pemindahan DNA saat konjugasi. Selain itu, mempunyai kapsul atau lapisan lendir yang merupakan polisakarida tebal dan air yang melapisi permukaan luar sel (Ikmalia 2008).

2.7.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri berbentuk kokus dan bersifat gram positif, tersebar luas di alam dan ada yang hidup sebagai flora normal pada manusia yang terdapat di aksila, daerah inguinal dan perineal, dan lubang hidung bagian anterior. Sekitar 25-30 % manusia membawa *S. aureus* didalam rongga hidung dan kulitnya (Soedarto, 2014). Menurut Syahrurachman dkk. (2010) klasifikasi *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut:

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Eubacteria
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Micrococcaceae
Genus	: <i>Stapylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

Bakteri *S. aureus* merupakan salah satu bakteri patogen penting yang berkaitan dengan virulensi toksin, inovsif dan ketahanan terhadap antibiotik. Uji positif *S. aureus* memiliki karakteristik yaitu berbentuk bulat dengan diameter 0,5-1,0 µm, berpasangan dan berkelompok/bergerombol seperti buah anggur (Karimela dkk., 2017). Bakteri *S. aureus* memberikan hasil positif dikarenakan mampu mengubah

faktor koagulasi reaktif didalam serum (faktor VII). Faktor ini bereaksi dengan enzim koagulasi dan menghasilkan esterase dan aktivitas pembekuan dengan cara pengaktifan protrombin menjadi thrombin, sehingga enzim koagulasi dapat menggumpalkan fibrinogen didalam plasma dan menyebabkan pembentukan bekuan fibrin untuk melindungi diri terhadap fagositosis dan respon imun hospes (Soedarto, 2014). Pengujian daya hambat terhadap bakteri *S. aureus* dalam konsentrasi 20% memiliki daya hambat 5,76 mm, 40% memiliki daya hambat 7,03 mm dan 60% memiliki daya hambat 7,13 mm (Rosari dkk., 2018).

2.8 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan tujuan diperolehnya suatu sistem pengobatan yang efektif dan efisien. Proses pengujiannya dilakukan dengan mengukur pertumbuhan mikroorganisme terhadap agen antibakteri (Rahmadani, 2015). Macam-macam metode aktivitas antibakteri adalah sebagai berikut.

2.8.1 Metode Difusi

a. Cara Cakram (*disc*)

Metode *disc* bertujuan untuk menentukan aktivitas agen antibakteri. Metode ini dilakukan dengan meletakkan piringan yang berisi antibakteri agar berdifusi kedalam media agar (Pratiwi, 2008). Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Daerah bening disekitar cakram menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganismenya oleh agen antibakteri (Maradona, 2013).

b. Cara Parit (*ditch*)

Metode ini dilakukan dengan meletakkan sampel uji berupa agen antibakteri kedalam parit yang dibuat dengan memotong media agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur, kemudian bakteri digoreskan kearah parit yang berisi agen antibakteri (Pratiwi, 2008). Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Adanya daerah bening disekitar parit menunjukkan hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antibakteri (Maradona, 2013).

c. Cara Sumur (*cup*)

Cara sumur ini mirip dengan cara parit, yaitu dengan dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antibakteri yang akan diuji (Pratiwi, 2008) Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Adanya daerah bening disekitar parit menunjukkan hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antibakteri (Maradona, 2013). Metode ini memiliki kelebihan, yaitu lebih mudah digunakan untuk mengukur zona hambat yang terbentuk karena isolat beraktivitas tidak hanya dipermukaan atas media agar tetapi juga dibagian bawah (Listari, 2009).

2.8.2 Metode Dilusi

a. Metode Dilusi Cair (*broth dilution test*)

Metode ini bertujuan untuk mengukur Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Dilakukan dengan cara membuat seri pengenceran agen antibakteri pada media cair yang ditambahkan dengan bakteri uji. KHM dapat ditentukan dari kadar terkecil dari antibakteri yang terlihat lebih jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji. Selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan media uji ataupun agen

antibakteri dan diinkubasi selama 18-24 jam. Daerah bening pada media cair setelah diinkubasi menunjukkan KBM (Pratiwi, 2008).

b. Metode Dilusi Padat

Metode ini mirip dengan metode dilusi cair, perbedaannya untuk metode ini menggunakan media padat. Keuntungan dari metode ini adalah untuk menguji beberapa bakteri uji dapat hanya dengan menggunakan konsentrasi agen antibakteri (Pratiwi, 2008).

2.9 Uji Aktivitas Antikanker

Penentuan sifat tosisitas suatu senyawa dilakukan dengan uji sifat farmakologi dan aktivitasnya terhadap berbagai sel secara *in vitro* atau *in vivo*. Metode yang sering digunakan pada analisis toksisitas yaitu *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode BSLT merupakan salah satu metode untuk skrining yang berpotensi sebagai antikanker karena lebih murah, singkat, mudah dikembangkan serta tidak ada aturan etika dalam penggunaan bahan uji (Anderson, 1991). Uji ini menggambarkan tingkat ketoksikan sampel terhadap larva *Artemia salina* L. Hasil uji ini dapat dimanfaatkan untuk mengidentifikasi bioaktivitas yang lebih luas. Tinggi rendahnya persentasi kematian larva berbanding terbalik dengan nilai LC_{50} . Ketika nilai LC_{50} besar maka tingkat kematian larva akan semakin rendah begitu juga sebaliknya. Nilai LC_{50} merupakan konsentrasi dimana zat menyebabkan kematian 50% yang diperoleh dengan memakai persamaan regresi linear. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai $LC_{50} < 1000$ ppm ekstrak dan $LC_{50} < 30$ ppm untuk suatu zat yang sangat toksik (Sumarlin dkk., 2014). Untuk kelanjutan uji ini dapat dilakukan uji sitotoksitas.

Uji MTT assay merupakan salah satu metode yang digunakan dalam uji sitotoksik. Metode ini merupakan metode kolorimetrik dimana pereaksi MTT ini merupakan garam tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria yang aktif pada sel yang masih hidup. Kristal formazan ini memberi warna ungu yang dapat dibaca absorbansinya dengan menggunakan ELISA *rader* (Pamilih, 2009).

Uji sitotoksik digunakan untuk menentukan parameter nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC_{50} dapat menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai sitotoksik. Semakin besar harga IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik. Akhir dari uji sitotoksisitas dapat memberi informasi % sel yang mampu bertahan hidup, sedangkan pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik (Pamilih, 2009).