
**AKTIVITAS ANTIBAKTERI PIGMEN KAROTENOID KHAMIR *Phaffia rhodozyma*
TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI
Bacillus subtilis ATCC 6231 SECARA *IN VITRO***

*¹⁾Cahya Rahma Utami, ²⁾M. Ryan Radix Rahardhian, ³⁾Indah Sulistyarini
Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi “Yayasan Pharmasi” Semarang

*Email: cahyarhma@gmail.com

Abstrak

Penyakit infeksi merupakan penyebab paling utama tingginya angka kesakitan dan kematian. Salah satu bakteri penyebab infeksi yaitu *Bacillus subtilis*. Khamir *Phaffia rhodozyma* merupakan salah satu mikroorganisme penghasil karotenoid yang dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri pigmen karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma* serta untuk mengetahui perbedaan aktivitas antibakteri pigmen karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma* dengan konsentrasi 1%, 2%, dan 3% terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6231. Hasil identifikasi karotenoid menggunakan metode KLT menunjukkan adanya karotenoid jenis astaksantin bebas dalam khamir *Phaffia rhodozyma* dengan harga Rf 0,31 dan karotenoid jenis lain dengan harga Rf 0,91. Identifikasi bakteri *Bacillus subtilis* dengan pereaksi nitrat memberikan hasil positif terbentuknya warna merah muda pada media NB. Uji aktivitas antibakteri menunjukkan karotenoid dari khamir *Phaffia rhodozyma* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6231 dengan rata-rata diameter daya hambat pada konsentrasi 1%, 2% dan 3% berturut-turut sebesar 0,762 cm; 0,976 cm; 1,263 cm; dan rata-rata diameter daya hambat kontrol positif sebesar 1,776 cm. Hasil uji SPSS menunjukkan ada perbedaan ($p < 0,05$) masing-masing kelompok ekstrak (1%, 2%, 3%) dan kontrol positif (siprofloksasin) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6231.

Kata kunci : antibakteri, *Bacillus subtilis*, karotenoid, *Phaffia rhodozyma*

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan penyebab paling utama tingginya angka kesakitan (*morbidity*) dan angka kematian (*mortality*). Bakteri penyebab infeksi salah satunya adalah *Bacillus subtilis*, jumlahnya yang banyak di dalam usus mampu menyebabkan diare yang ditularkan melalui kontaminasi makanan (Rahmaningsih *et al.*, 2012). Bakteri *Bacillus subtilis* juga dapat menyebabkan meningitis, endokarditis, infeksi mata, bakteremia dan septikemia (Rahim *et al.*, 1994). Salah satu senyawa yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai antibakteri adalah karotenoid (Thamin *et al.*, 2006).

Karotenoid terdapat secara alami pada kromoplas tanaman, organisme fotosintesis seperti alga, serta beberapa tipe dari jamur dan bakteri. Khamir *Phaffia* merupakan salah satu mikroorganisme yang berpotensi sebagai sumber penghasil karotenoid (Andrewes *et al.*, 1976). *Phaffia rhodozyma* dimasukkan dalam khamir *basidiomycotes* (Wery *et al.*, 1995). Karotenoid yang paling melimpah dalam khamir *Phaffia rhodozyma* adalah astaksantin yaitu sekitar 83% - 87% dari total campuran pigmen karotenoid yang dihasilkan, selain astaksantin pigmen karotenoid yang terdapat pada *Phaffia rhodozyma* yaitu β -karoten, ekinenon, 3-hidroksiekinenon, dan foenikosantin (Andrewes *dkk.*, 1976). Karotenoid dari khamir *Phaffia rhodozyma* telah diteliti mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus auerus* (Putri, 2015) dan bakteri *Escherichia coli* (Artiyanti, 2015).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini mengidentifikasi adanya karotenoid pada *Phaffia rhodozyma* serta menguji aktivitas antibakteri antibakteri pigmen karotenoid *Phaffia rhodozyma* pada konsentrasi 1%, 2%, 3% terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6231. Hasil penelitian ditunjukkan dengan adanya zona bening pada media pertumbuhan bakteri dan diukur dengan menggunakan jangka sorong.

Alat: Alat-alat gelas, vortex, sentrifuge dan tabung sentrifuge, spektrofotometer UV-Vis Mini 1240 (Shimadzu), kuvet, bejana elusi dan tutup kaca, pipa kapiler, mortir dan stamper, cawan petri, mikropipet, autoklaf, inkubator, almari pendingin, rak tabung, LAF, bunsen, ose bulat, jangka sorong, *silinder cup*, *yellow tip*.

Bahan: Khamir *Phaffia rhodozyma*, bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6231, lempeng silika gel F₂₅₄, DMSO, aseton, aquadestilata, HNO₃, asam sulfanilat, alfa naftilamin, media PDA, media NA, media NB dan media MHA.

Ekstraksi: Khamir *Phaffia rhodozyma* yang telah diinkubasi pada suhu 25°C selama 3 x 24 jam kemudian digerus, lalu diekstraksi menggunakan aseton dengan perbandingan sel khamir : aseton sebesar 1:12, kemudian divortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Filtrat ditampung dalam vial kemudian dialiri gas N₂ sampai diperoleh ekstrak kering.

Uji Pendahuluan: Identifikasi karotenoid menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam lempeng silika gel F₂₅₄ dan fase gerak aseton : n-heksana (1:3). Hasil elusi dilihat secara visual, noda yang terbentuk dilakukan perhitungan harga R_f (*Retardation Factor*) dan dibandingkan dengan literatur.

Identifikasi Bakteri *Bacillus subtilis*: Bakteri *Bacillus subtilis* pada permukaan media agar miring diambil satu ose, dimasukkan ke dalam media cair *Nutrient Broth* (NB) steril, ditambahkan nitrat di dalamnya, dicampur homogen dan diinkubasi 1 x 24 jam pada suhu 37°C, kemudian ditambahkan pereaksi nitrat (2 tetes larutan asam sulfanilat dan 2 tetes larutan alfa naftilamin). Hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya warna merah muda pada media NB.

Uji Aktivitas Antibakteri: Media MHA (*Mueller Hinton Agar*) steril dimasukkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 10 ml media sebagai lapisan pertama, dibiarkan memadat dan 5 *cylinder cup* diletakkan di permukaan media, lalu 100 ml media yang telah dicampur dengan 2 µl suspensi bakteri dituang ke dalam erlenmeyer dan dihomogenkan, kemudian diukur sebanyak 20 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri sebagai lapisan kedua. Media ditunggu memadat kemudian *cylinder cup* diambil. Masing-masing ekstrak *Phaffia rhodozyma* konsentrasi 1%, 2%, 3%; kontrol positif (siprofloksasin 0,001%) dan kontrol negatif (DMSO) dimasukkan ke dalam lubang sumuran sebanyak 50 µl. Cawan petri yang berisi media uji tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Daerah jernih di sekitar lubang sumuran menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Bacillus subtilis*. Diameter daerah jernih yang dihasilkan diukur dengan menggunakan alat jangka sorong. Pengujian ini dilakukan replikasi sebanyak 5 kali.

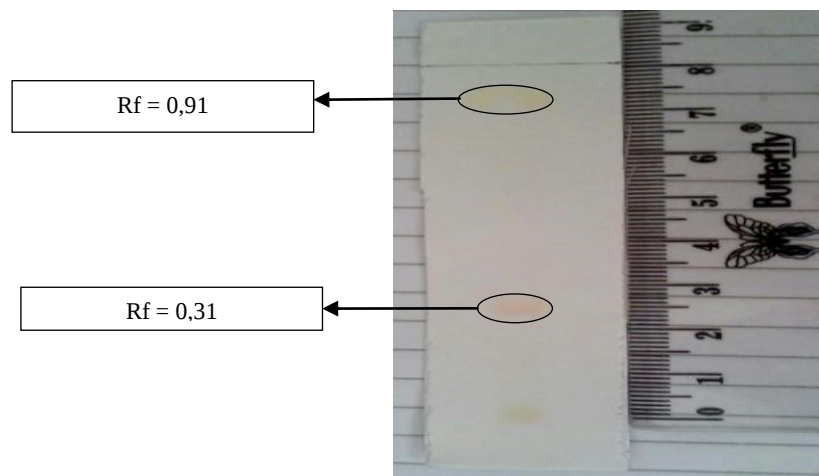
Analisis Hasil: Data diameter daya hambat dianalisis dengan SPSS (*Statistical Product and Service Solution*). Langkah awal analisis SPSS adalah uji normalitas dan homogenitas. Apabila data berdistribusi normal dan homogen selanjutnya dilakukan uji ANOVA satu jalan dengan nilai signifikansi (*Sig.*) kurang dari 0,05 kemudian untuk mengetahui adanya perbedaan bermakna antar masing-masing konsentrasi dan kontrol maka dilakukan uji Post Hoc, data dikatakan berbeda bermakna bila nilai signifikasinya (*Sig.*) kurang dari 0,05.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi pigmen karotenoid dari khamir *Phaffia rhodozyma* menggunakan pelarut aseton karena karotenoid bersifat larut dalam pelarut organik (Ahamad, 2007). Pemilihan aseton sebagai pelarut berdasarkan alasan karena aseton merupakan pelarut organik dan aseton dapat melunakkan matriks atau dinding sel khamir dengan mudah sehingga diharapkan mampu menarik senyawa karotenoid yang terkandung di dalam sel khamir *Phaffia rhodozyma* (Hujana, 2008). Ekstraksi

dilakukan menggunakan metode maserasi cara cepat yaitu dengan merendam sel khamir *Phaffia rhodozyma* menggunakan aseton dalam waktu singkat selama 15 menit. Proses ekstraksi menghasilkan ekstrak karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma* yang berwarna orange. Ekstrak yang diperoleh dialiri dengan menggunakan gas N_2 hingga diperoleh ekstrak kering dengan tujuan untuk menghilangkan kandungan oksigen dan supaya pigmen karotenoid yang telah terekstrak terjaga kestabilannya. Sel basah khamir *Phaffia rhodozyma* sebanyak 9,757 gram menghasilkan ekstrak kering sebanyak 0,5765 gram, sehingga didapatkan rendemen ekstrak sebesar 5,91%.

Ekstrak yang telah kering diuji secara kualitatif menggunakan metode KLT untuk menegaskan adanya kandungan pigmen karotenoid dalam ekstrak. Hasil uji kualitatif KLT ekstrak khamir *Phaffia rhodozyma* disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ekstrak khamir *Phaffia rhodozyma*

Kromatogram pada Gambar 1 menunjukkan bahwa ekstrak *Phaffia rhodozyma* mengandung karotenoid jenis astaksantin bebas yang ditunjukkan dengan noda berwarna orange pada Rf 0,31. Menurut Lorenz (1998) bila harga Rf berada disekitar 0,33 termasuk karotenoid jenis astaksantin bebas. Noda berwarna kuning dengan harga Rf 0,91 menunjukkan adanya kandungan karotenoid lain yang belum diketahui jenisnya.

Uji kualitatif untuk mengidentifikasi kandungan karotenoid dalam khamir *Phaffia rhodozyma* juga dapat dilakukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis (Putri, 2015). Analisa hasil uji kualitatif menunjukkan pola spektra tunggal dengan panjang gelombang 503,5 nm dalam metanol. Hasil pola spektra yang diperoleh masuk rentang nilai panjang gelombang karotenoid yaitu 300-600 nm (Gross, 1991) sehingga dapat dikatakan bahwa pigmen yang terkandung dalam khamir *Phaffia rhodozyma* adalah pigmen karotenoid.

Identifikasi bakteri *Bacillus subtilis* dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan adalah benar bakteri *Bacillus subtilis* melalui uji reduksi nitrat. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa bakteri yang digunakan benar bakteri *Bacillus subtilis* karena hasil pengujian menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan timbulnya warna merah muda pada media NB yang telah diberi pereaksi nitrat.

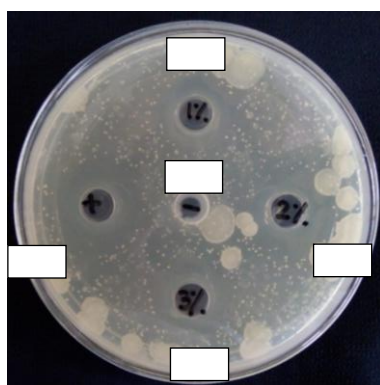
Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi sumuran. Media yang dipilih adalah MHA (*Mueller Hinton Agar*) yang merupakan media yang telah direkomendasikan oleh FDA dan WHO untuk pengujian antibakteri karena adanya kandungan pati dalam media mampu mengabsorbsi racun yang dikeluarkan oleh bakteri sehingga tidak mengganggu aktivitas antibakteri pigmen karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma*. Media MHA memiliki rentang pH $7,4 \pm 0,2$ yang sama dengan pH optimal pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* yaitu 7-8. Konsentrasi

suspensi bakteri yang digunakan pada pengujian antibakteri disesuaikan dengan absorbansi larutan $\frac{1}{2}$ Mc Farland yang mempunyai kekeruhan setara dengan 0,08 – 0,1.

Kontrol positif yang digunakan adalah siprofloksasin dengan konsentrasi 0,001% untuk membandingkan daya antibakteri terhadap pigmen karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma*. Siprofloksasin dipilih sebagai kontrol positif karena siprofloksasin bersifat sangat sensitif terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dan bersifat bakterisid dengan mekanisme kerja menghambat sintesis DNA bakteri yaitu dengan mengganggu kerja enzim girase DNA sehingga replikasi DNA dan pembentukan asam nukleat terganggu yang menyebabkan bakteri tidak tumbuh bahkan mati (Abelson, 2008). Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO karena DMSO terbukti dapat melarutkan ekstrak dengan sempurna, dapat berdifusi pada media uji, tidak memiliki sifat antimikroba (Parhusip dkk., 2003). Hasil uji aktivitas antibakteri pigmen karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma* terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6231 disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 2.

Tabel 1. Data diameter daya hambat pigmen karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma* terhadap bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6231

Replikasi	Data diameter daya hambat ekstrak khamir <i>Phaffia rhodozyma</i> (cm)				
	Konsentrasi			Kontrol	
	1%	2%	3%	Positif	Negatif
1	0,760	0,987	1,195	1,784	0,000
2	0,735	0,959	1,284	1,744	0,000
3	0,748	0,942	1,298	1,740	0,000
4	0,772	0,995	1,242	1,814	0,000
5	0,795	0,997	1,295	1,796	0,000
Rata-rata $\pm$ SD	0,762 $\pm$ 0,023	0,976 $\pm$ 0,024	1,263 $\pm$ 0,044	1,776 $\pm$ 0,032	0,000



Keterangan:

1% : Konsentrasi ekstrak khamir *Phaffia rhodozyma* 1%

2% : Konsentrasi ekstrak khamir *Phaffia rhodozyma* 2%

3% : Konsentrasi ekstrak khamir *Phaffia rhodozyma* 3%

K+ : Kontrol positif siprofloksasin 0,001%

K- : Kontrol negatif DMSO

Gambar 2. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Pigmen Karotenoid Khamir *Phaffia rhodozyma*

Berdasarkan data pada Tabel 1, dapat diketahui bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak khamir *Phaffia rhodozyma* maka semakin besar pula rata-rata diameter daya hambat yang dihasilkan. Semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin banyak kandungan senyawa karotenoid dalam ekstrak yang berpotensi sebagai antibakteri, sehingga semakin banyak senyawa karotenoid yang berdifusi ke dalam media yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6231.

Mekanisme kerja karotenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan porin atau protein transmembran pada membran luar dinding sel bakteri, kemudian membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin merupakan pintu keluar masuknya senyawa yang akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri dan akan mengakibatkan sel

bakteri kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri menjadi terhambat atau mati (Cowan, 1999).

Data uji aktivitas antibakteri yang diperoleh dianalisa secara statistika dengan menggunakan SPSS 23 (*Statistical Product and Service Solution*) untuk mengetahui perbedaan antar konsentrasi ekstrak. Hasil uji statistika menunjukkan bahwa data daya hambat pigmen karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma* terhadap bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6231 berdistribusi normal dan homogen, sehingga uji statistika dilanjutkan menggunakan uji ANOVA satu jalan untuk mengetahui apakah ada perbedaan antar kelompok. Uji Post Hoc dilanjutkan untuk mengetahui letak perbedaan antar kelompok konsentrasi pigmen karotenoid *Phaffia rhodozyma* dengan kontrol positif siprofloksasin. Hasil yang diperoleh menunjukkan masing-masing kelompok konsentrasi ekstrak 1%, 2%, 3% dan kontrol positif menghasilkan diameter daya hambat yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6231.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa pigmen karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma* memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6231 serta ada perbedaan aktivitas antibakteri pigmen karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma* dengan konsentrasi 1%, 2%, dan 3% terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6231.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian metode ekstraksi lain untuk khamir *Phaffia rhodozyma* agar pigmen karotenoid yang terekstrak lebih maksimal dengan jumlah yang lebih banyak dan lebih stabil.
2. Perlu dilakukan pemurnian senyawa astaksantin yang terdapat dalam ekstrak karotenoid dari khamir *Phaffia rhodozyma*.
3. Perlu dilakukan pengujian aktivitas antibakteri pigmen karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma* terhadap bakteri lain ataupun pengujian aktivitas pigmen karotenoid khamir *Phaffia rhodozyma* sebagai antijamur.

DAFTAR PUSTAKA

- Abelson, M.N. 2008. Epidemiology and Prevention of Head Injuries: *literature review*, *J Clin Nurs*. **17**. p: 46–57.
- Ahamad, M.N., Saleemullah, M., Shah, H.U., Khalil, I.A., dan Saljoqi, A. 2007. Determination Of Beta Carotene Content In Fresh Vegetables Using High Performance Liquid Chromatography, *Sarhad Journal Agric*. **23**. (3)
- Andrewes, A.G., Phaff, H.J., dan Starr, M.P. 1976. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content, *Appl. Environ. Microbial*. **55**. (1) : 116-124.
- Artiyanti, E. 2015. Pemanfaatan Khamir *Phaffia rhodozyma* Sebagai Sumber Karotenoid Untuk Aktivitas Antibakteri *Escherichia coli* ATCC 34751 Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Semarang: STIFAR “Yayasan Pharmasi”.
- Cowan, M.M. 1999. *Plant Product as Antimicrobial Agents*. Oxford : Miami University.
- Gross, J. 1991. *Pigments in Vegetables, Chlorophylls and Carotenoids*. New York : Van Nostrand Reinhold.
- Lorenz, T.R. 1998. Thin Layer Chromatography (TLC) system for Natu Rose Carotenoids, *NatuRose Technical*.

- Parhusip, A., Sedarnawati, Y., dan Yenni, E. 2003. Kajian Metode Ekstraksi Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. **1**. (1): 114.
- Putri, C.N. 2015. Bioteknologi Pemanfaatan Khamir *Phaffia rhodozyma* Sebagai Sumber Karotenoid Untuk Aktivitas Antibakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Semarang : STIFAR “Yayasan Pharmasi”.
- Rahim, A., Lintong, M., Suharto, dan Josodiwondo, S. 1994. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran Ed. Revisi*. 125-126. Jakarta : Penerbit Binarupa Aksara.
- Rahmaningsih, S., Willis, S., dan Mulyana, A. 2012. Bakteri Patogen dari Perairan Pantai dan Kawasan Tambak di Kecamatan Jenu Kabupaten Tuban, *Ekologia*. **12**. (1) : 1-5.
- Sulistyo. 1971. *Farmakologi dan Terapi*. Yogyakarta: EKG.
- Thamin A, Umar C. & Paransa D. 2006. Analisis Pigmen Dan Aktivitas Antibakteri *In Vitro* Pigmen Astaksantin Kepiting (*Grapsus Albolineatus Lamarck*) Jantan, *Journal of Fisheries Schiences*. **VIII**. (2) : 160-168.
- Wery, J., Mieke, J.M.D., Jose, T.L., Teun, B., dan Albert, J.J. 1995. Structural and phylogenetic analysis of the action gene from the yeast *Phaffia rhodozyma*, *Yeast*. **12** : 641-651.