

Pengaruh Media terhadap Produksi Prodigiosin Isolat Bakteri Entomopatogen *Serratia marcescens* Asal Wereng Batang Cokelat

Ifa Manzila^{1*}, Tri P. Priyatno¹, Rahminovita Herlis², Iman Rusmana², I Made Samudra¹, dan Yadi Suryadi¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: ifamanzila@gmail.com

²Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

Diajukan: 18 Desember 2013; Diterima: 22 Mei 2014

ABSTRACT

The Effect of Media on the Prodigiosin Production of Entomopathogenic Bacteria *Serratia marcescens* Isolated from Brown Planthopper. Ifa Manzila, Tri P. Priyatno, Rahminovita Herlis, Iman Rusmana, I Made Samudra, and Yadi Suryadi. Prodigiosin, the red pigment produced by the bacterium *Serratia marcescens*, is a secondary metabolite of the family tripyrrole that has been widely used as an antibiotic in the multifunction treatment of antibacterial as well as antifungal. This study was aimed to study the effect of Luria-Bertani (LB) broth and nutrient broth (NB) media supplemented with several concentrations of FeSO_4 and CaCO_3 on the production and characteristic of prodigiosin derived from *S. marcescens*. The study was arranged in a completely randomized factorial design with four replications. The LB and NB media were supplemented with 0, 2.5, 5, and 10 mM CaCO_3 and 0, 0.25, 0.5, and 1 mM FeSO_4 . Results showed a red pigment produced by *S. marcescens* when cultured on both LB and NB media. Red-like pigmentation was varied when supplemented with different concentration of Fe^{2+} and Ca^{2+} . The higher the concentration of Fe^{2+} , the more intense the red color, conversely, the higher the concentration of Ca^{2+} , the lighter the red color. The interaction was found between the media and concentrations of CaCO_3 and FeSO_4 on the production of prodigiosin. The highest prodigiosin production was obtained on NB media supplemented with FeSO_4 . Meanwhile, the addition of CaCO_3 did not affect the prodigiosin production. An addition of 1 mM FeSO_4 to LB and NB media produced crude prodigiosin of 486.0 mg/ml and 489.0 mg/ml, respectively. Based on purification by column chromatography using silica gel, the prodigiosin production on LB and NB media was 378 mg/ml and 450 mg/ml, with the purity level of 77.8% and 92%, respectively. Detection of prodigiosin by thin-layer chromatography using silica gel showed the red pigment had Rf value of 0.83 and bioautography assay showed there was an antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

Keywords: Prodigiosin, *Serratia marcescens*, LB, NB, CaCO_3 , FeSO_4 .

ABSTRAK

Pengaruh Media terhadap Produksi Prodigiosin Isolat Bakteri Entomopatogen *Serratia marcescens* Asal Wereng Batang Cokelat. Ifa Manzila, Tri P. Priyatno, Rahminovita Herlis, Iman Rusmana, I Made Samudra, dan Yadi Suryadi. Prodigiosin, pigmen merah yang dihasilkan oleh bakteri *Serratia marcescens*, merupakan metabolit sekunder dari famili tripyrrole yang sudah digunakan secara luas dalam pengobatan sebagai antibiotik multifungsi, baik sebagai antibakteri maupun antifungi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh media *Luria-Bertani* (LB) *broth* dan *nutrient broth* (NB), serta konsentrasi CaCO_3 dan FeSO_4 terhadap produksi prodigiosin *S. marcescens* dan karakteristik prodigiosin yang dihasilkan. Penelitian disusun dalam Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan empat ulangan. Media yang digunakan adalah LB dan NB yang masing-masing ditambah beberapa konsentrasi CaCO_3 (0, 2,5, 5, dan 10 mM) dan FeSO_4 (0, 0,25, 0,5, dan 1 mM). Hasil penelitian menunjukkan pigmen merah dihasilkan oleh *S. marcescens* ketika dibiakkan pada media agar LB dan NB. Pigmentasi merah terlihat cukup bervariasi dengan penambahan Fe^{2+} dan Ca^{2+} pada konsentrasi yang berbeda. Semakin tinggi konsentrasi Fe^{2+} , semakin pekat warna merah yang dihasilkan, sebaliknya semakin tinggi konsentrasi Ca^{2+} , semakin berkurang kepekannya. Terlihat interaksi yang nyata antara media dan konsentrasi CaCO_3 dan FeSO_4 terhadap produksi prodigiosin. Konsentrasi prodigiosin yang tinggi diperoleh pada media NB yang ditambah FeSO_4 , sedangkan penambahan CaCO_3 tidak memberikan pengaruh sebaik FeSO_4 . Penambahan FeSO_4 1 mM pada media LB dan NB masing-masing menghasilkan 486,0 mg/ml dan 489,0 mg/ml prodigiosin ekstrak kasar. Berdasarkan hasil pemurnian dengan kromatografi kolom menggunakan gel silika, diperoleh prodigiosin murni pada media LB dan NB masing-masing sebanyak 378 mg/ml dan 450 mg/ml, dengan tingkat kemurnian 77,8% dan 92%. Deteksi prodigiosin dengan kromatografi lapis-tipis menggunakan gel silika menunjukkan pigmen merah mempunyai nilai Rf 0,83 dan hasil uji bioautografi menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

Kata kunci: Prodigiosin, *Serratia marcescens*, LB, NB, CaCO_3 , FeSO_4 .

PENDAHULUAN

Serratia marcescens atau yang biasa disebut sebagai bakteri merah (BM) merupakan salah satu spesies bakteri entomopatogen gram-negatif dari famili *Enterobacteriaceae*. Ciri khas *S. marcescens* yang diisolasi dari wereng batang cokelat (WBC) adalah koloninya berbentuk cembung dan menghasilkan pigmen merah. Pigmen merah yang dihasilkan oleh *S. marcescens* merupakan metabolit sekunder yang dikenal sebagai prodigiosin dari famili *tripyrrrole* yang umumnya mengandung 4-methoxy-2,2-bipyrrrole (Giri *et al.*, 2004).

Nilai ekonomis dan komersialisasi prodigiosin bersifat multifungsi, yaitu sebagai antibakteri, anti-fungi, antiprotozoal (Dhanasekaran *et al.*, 2009), bersifat sitotoksik (Nakashima *et al.*, 2005), antitumor (Castro, 1967; Pérez-Tomás *et al.*, 2003), antimalaria, antidiabetes, antioksidan, obat-obatan, antiinflamasi non steroid, serta dapat juga menjadi pewarna untuk sutera dan wool (Khanafari *et al.*, 2006). Produksi prodigiosin sangat bervariasi antarspesies dan strain *Serratia*, serta dipengaruhi oleh komposisi media dan waktu inkubasi. Media cair yang sudah banyak digunakan untuk produksi prodigiosin adalah *nutrient broth* (NB), *peptone glycerol broth*, dan *Luria-Bertani* (LB) *broth*. Penambahan sodium oleat 2%, asam oleat, dan triolein ke dalam media dapat menghasilkan prodigiosin sebanyak 0,69 mg/ml (Nakamura, 1981). Media yang mengandung etanol sebagai sumber karbon juga sangat baik untuk produksi prodigiosin (Chang *et al.*, 2000), sedangkan maltosa dan glukosa merupakan represor biosintesis prodigiosin (Khanafari *et al.*, 2006). Menurut Witney *et al.* (1977), biosintesis prodigiosin dipengaruhi oleh konsentrasi fosfat anorganik di dalam media. Produksi prodigiosin yang tinggi terjadi pada konsentrasi fosfat kurang dari 0,3 mM, sedangkan pada konsentrasi antara 10 mM dan 250 mM, pigmentasi *Serratia* terhambat.

Fe^{2+} dan Ca^{2+} merupakan mineral anorganik yang sangat penting dalam produksi prodigiosin (Casullo de Araújo *et al.*, 2010; Venil dan

Perumalsamy, 2009). Menurut Khanafari *et al.* (2006), penambahan Fe^{2+} ke dalam media biakan *S. marcescens* dapat menghasilkan pigmen merah yang berdifusi ke dalam agar di sekitar koloni. Begitu pula dengan Ca^{2+} yang juga dapat meningkatkan produksi prodigiosin (Casullo de Araújo *et al.*, 2010). Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh media (LB dan NB) dan konsentrasi unsur mineral (CaCO_3 dan FeSO_4) terhadap produksi prodigiosin *S. marcescens* dan kemurniannya. Karakteristik prodigiosin yang dihasilkan, yaitu nilai Rf dan sifat antibakteri, juga ditentukan dalam penelitian ini.

BAHAN DAN METODE

Pengaruh Media dan Konsentrasi CaCO_3 dan FeSO_4

Bakteri *S. marcescens* (BBCCSm01) diisolasi dari WBC koloni Sukamandi (Priyatno *et al.*, 2011). Isolat *S. marcescens* tersebut dipelihara pada media agar miring LB (10 g *bacto tryptone*, 5 g ekstrak ragi, 10 g NaCl, 10 g agar bakto, dan 1 l akuades). Biakan diinkubasi dalam suhu ruang. Sebanyak 4 ml dari masing-masing media LB dan NB (13 g dalam 1 l akuades) dikombinasikan dengan mineral yang mengandung CaCO_3 (0, 2,5, 5, dan 10 mM) dan FeSO_4 (0, 0,25, 0,5, dan 1 mM), kemudian digunakan sebagai media tumbuh cair bakteri *S. marcescens*. Perlakuan disusun dalam Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan empat ulangan dan kombinasi perlakuan yang disajikan pada Tabel 1.

Campuran berisi media tersebut diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 psi selama 15 menit. Setelah dingin, media diinokulasi dengan 10 μl biakan bakteri yang berumur 16 jam ($\text{OD}_{600} = 0,5$) dan diinkubasi dalam inkubator bergoyang (75 rpm) pada suhu ruang selama 4 hari. Biakan kemudian disentrifugasi dan pelet disuspensi dalam 1 ml etanol yang mengandung 4% HCl 1 M. Ekstrak kasar prodigiosin yang terlarut dalam etanol dipisahkan dari sel bakteri dengan sentrifugasi 10.000 rpm selama 5 menit. Kandungan ekstrak kasar prodigiosin dalam etanol diukur

Tabel 1. Kombinasi konsentrasi CaCO_3 dan FeSO_4 pada media LB dan NB.

Media	FeSO_4	CaCO_3			
		0	2,5	5	10
LB	0	0;0	0;2,5	0;5	0;10
	0,25	0,25;0	0,25;2,5	0,25;5	0,25;10
	0,5	0,5;0	0,5;2,5	0,5;5	0,5;10
	1	1;0	1;2,5	1;5	1;10
NB	0	0;0	0;2,5	0;5	0;10
	0,25	0,25;0	0,25;2,5	0,25;5	0,25;10
	0,5	0,5;0	0,5;2,5	0,5;5	0,5;10
	1	1;0	1;2,5	1;5	1;10

dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm. Nilai absorbansi yang diperoleh dikonversi dengan kurva standar untuk menentukan kandungan ekstrak kasar prodigiosin yang sebenarnya. Kurva standar dibuat dari prodigiosin murni yang diperoleh dari Sigma™. Larutan prodigiosin dengan konsentrasi 0–100 µg/ml dibuat dalam pelarut metanol. Selanjutnya, data dianalisis secara statistik untuk mengetahui komposisi media yang terbaik bagi produksi ekstrak kasar prodigiosin.

Pemurnian dan Karakterisasi Prodigiosin

Pemurnian prodigiosin

Pemurnian ekstrak kasar prodigiosin dalam penelitian ini menggunakan metode Nakamura (1981). Media yang digunakan adalah media optimal (FeSO₄ 1 mM) untuk produksi ekstrak kasar prodigiosin yang diperoleh dari hasil penelitian di atas. Sebanyak 250 ml media LB dan NB yang masing-masing mengandung FeSO₄ 1 mM diautoklaf dan setelah dingin diinokulasi dengan 1 ml biakan bakteri yang berumur 16 jam (OD₆₀₀ = 0,5). Biakan kemudian diinkubasi dalam inkubator bergoyang (75 rpm) selama 7 hari. Ekstrak kasar prodigiosin diekstraksi dari supernatan dengan menggunakan etil asetat. Biakan disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan sel dari supernatan. Supernatan ditambah 200 ml etil asetat di dalam erlenmeyer dan diaduk dengan pengaduk magnetik selama 1 jam pada suhu ruang. Ekstrak kasar prodigiosin yang terlarut dalam etil asetat dipisahkan dari fraksi air dengan menggunakan tabung fraksinasi. Etil asetat kemudian diuapkan dengan evaporator pada suhu 50°C dan ekstrak kasar prodigiosin yang diperoleh dilarutkan dalam 1,5 ml DMSO.

Karakteristik prodigiosin secara kromatografi dan secara spektrofotometer

Ekstrak kasar prodigiosin dimurnikan dengan kromatografi kolom menggunakan gel silika, kemudian ekstrak kasar prodigiosin yang sebelumnya dilarutkan dalam pelarut metanol dialirkan melalui kolom tersebut. Prodigiosin yang terperangkap dalam kolom gel silika dilepaskan dan dilarutkan dalam kloroform. Sisa kloroform diuapkan kembali di dalam ruang asam, selanjutnya prodigiosin dilarutkan dalam 0,5 ml DMSO. Konsentrasi prodigiosin diukur dengan spektrofotometer dan profilnya dideteksi dengan kromatografi lapis-tipis menggunakan gel silika, dengan amil asetat sebagai fase gerak. Setelah didiamkan lebih kurang selama 2 jam, akan terbentuk spot berwarna *pink* (merah muda). Spot ini merupakan visualisasi dari prodigiosin murni yang selanjutnya dikumpulkan dan dilarutkan dalam DMSO. Komponen

dalam sampel yang terpisah berdasarkan kepolarannya dihitung nilai Rf dengan formula:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh sampel}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Nilai Rf menyatakan derajat retensi suatu komponen dalam fase diam.

Uji bioautografi

Uji bioautografi dilakukan menurut metode Giri *et al.* (2004). Uji ini bertujuan untuk mengetahui fraksi pemisahan kromatografi lapis-tipis yang bersifat antibakteri. Uji bioautografi dilakukan pada media LB agar di dalam bak plastik steril berukuran 15 cm x 7,5 cm x 1 cm. Sterilisasi bak plastik dilakukan dengan etanol 70% dan disinari ultraviolet selama 2 jam. Media agar LB dituangkan ke dalam bak plastik sebanyak 45 ml dan dibiarkan beku di dalam *laminar flow*. Selanjutnya, 20 ml media agar LB 1% yang ditambah 3 ml biakan *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (OD₆₀₀ = 1) dituang di atas media agar LB. Setelah beku, kromatografi lapis-tipis yang menggunakan gel silika hasil pemisahan pigmen merah diletakkan di atas media agar LB dengan posisi gel silika menghadap ke agar selama 30 menit. Hal ini menyebabkan fraksi-fraksi dari sampel pada lapis-tipis silika transfer ke media. Daya hambat setiap fraksi terhadap Xoo diamati setelah inkubasi 48 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

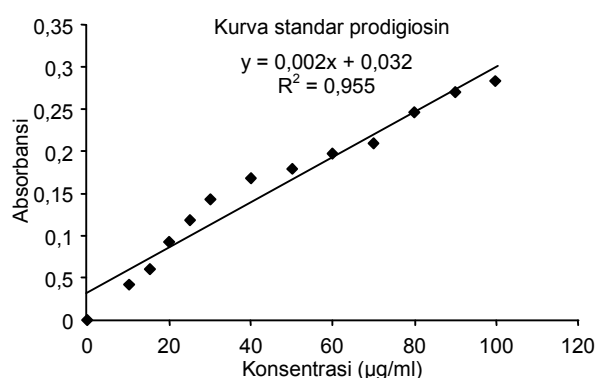
Pengaruh Media dan Konsentrasi CaCO₃ dan FeSO₄

Kurva standar dari prodigiosin murni (Sigma™) yang dapat dilihat pada Gambar 1. Bakteri *S. marcescens* yang ditumbuhkan pada media agar LB setelah diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang menunjukkan pertumbuhan koloni berwarna merah (Gambar 2). Pigmen merah juga dihasilkan oleh *S. marcescens* ketika dibiakkan pada media agar NB.

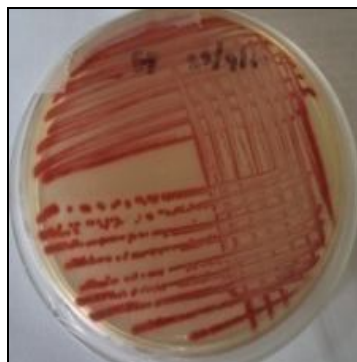
Pigmentasi merah terlihat cukup bervariasi dengan penambahan Fe²⁺ dan Ca²⁺ pada konsentrasi yang berbeda. Semakin tinggi konsentrasi Fe²⁺, semakin pekat warna merah yang dihasilkan, sebaliknya semakin tinggi konsentrasi Ca²⁺, semakin berkurang kepekannya (Gambar 3). Hasil pengamatan terhadap produksi ekstrak kasar prodigiosin *S. marcescens* pada media LB dan NB dengan kandungan Fe²⁺ dan Ca²⁺ disajikan dalam (Gambar 4). Media LB dan NB tanpa atau dengan kandungan Fe²⁺ dan Ca²⁺ dapat menghasilkan prodigiosin, tetapi media NB merupakan media yang lebih sesuai. *S. marcescens* yang ditumbuhkan pada media NB menghasilkan prodigiosin lebih tinggi dibanding dengan media LB. Ekstrak kasar prodigiosin yang diperoleh berturut-turut, yaitu 77–

178,75 $\mu\text{g/ml}$ dan 47–114,5 $\mu\text{g/ml}$. Pada media LB yang ditambahkan FeSO_4 dengan konsentrasi 0, 0,25, 0,5, dan 1 mM, prodigiosin yang dihasilkan berturut-turut sebanyak 70,5, 59,4, 81,8, dan 104,75 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan pada media NB diperoleh ekstrak kasar prodigiosin berturut-turut sebanyak 84,3, 87,3, 98,6, dan 165,8 $\mu\text{g/ml}$. Jelas terlihat bahwa penambahan FeSO_4 1 mM menghasilkan ekstrak kasar prodigiosin tertinggi. Semakin tinggi konsentrasi FeSO_4 dalam media, semakin tinggi produksi prodigiosin. Produksi ekstrak kasar prodigiosin pada media LB dan NB dengan konsentrasi FeSO_4 1 mM masing-masing mencapai 104,75 $\mu\text{g/ml}$ dan 165,8 $\mu\text{g/ml}$. Penambahan CaCO_3 dalam

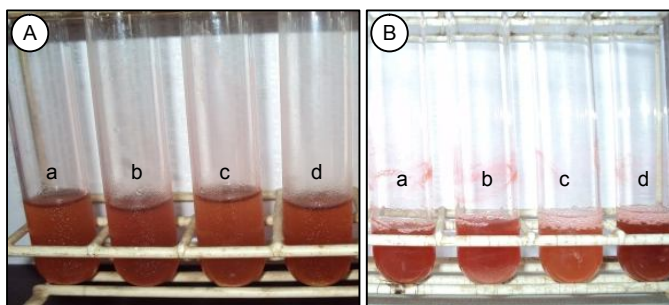
media dengan konsentrasi 0, 2,5, 5, dan 10 mM menghasilkan ekstrak kasar prodigiosin berturut-turut sebanyak 82,5, 90,4, 68,8, dan 75,4 $\mu\text{g/ml}$ pada media LB dan sebanyak 97,6, 116,5, 117,0, dan 105 $\mu\text{g/ml}$ pada media NB (Gambar 4). Hasil analisis statistik menunjukkan terjadi interaksi yang nyata antara jenis media dan variasi konsentrasi Fe^{2+} dan Ca^{2+} terhadap produksi prodigiosin (Tabel 2). Peningkatan konsentrasi CaCO_3 10 mM pada media NB cenderung menurunkan produksi ekstrak kasar prodigiosin. Ca^{2+} merupakan salah satu ion yang juga dapat digunakan untuk mempengaruhi pertumbuhan bakteri (Kim *et al.*, 2004). Jika pertumbuhan bakteri meningkat, produksi



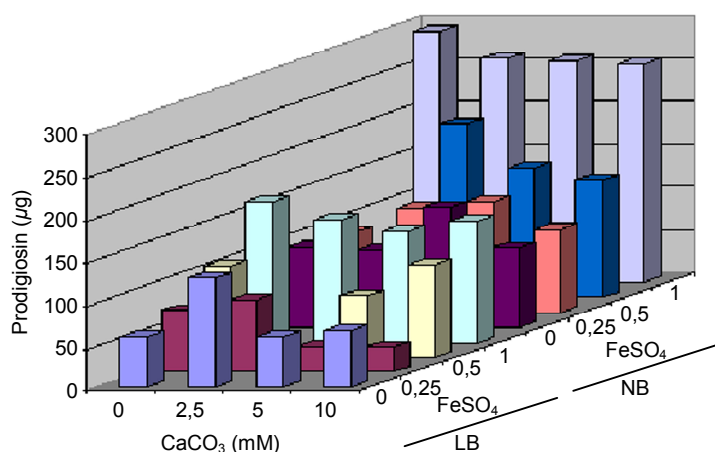
Gambar 1. Kurva standar prodigiosin (Sigma™).



Gambar 2. Biakan *S. marcescens* isolat BBCCSm01 pada media LB.



Gambar 3. Perbedaan kepekatan warna merah pada media LB (A) dan NB (B). a = CaCO_3 0 mM: FeSO_4 0 mM, b = CaCO_3 0 mM: FeSO_4 0,25 mM, c = CaCO_3 0 mM: FeSO_4 0,5 mM, d = CaCO_3 0 mM: FeSO_4 1 mM.



Gambar 4. Histogram kandungan ekstrak kasar prodigiosin ($\mu\text{g/ml}$) pada media LB dan NB dengan berbagai kombinasi konsentrasi FeSO_4 dan CaCO_3 .

Tabel 2. ANOVA produksi prodigiosin *S. marcescens* pada media LB dan NB dengan kandungan Fe^{2+} dan Ca^{2+} .

Sumber keragaman	Derajat bebas	Jumlah kuadrat	Kuadrat tengah	F_{hitung}	F_{tabel}
Media (M)	1	0,029	0,029	15,127**	3,94
Fe^{2+}	3	0,004	0,001	0,730	2,70
Ca^{2+}	3	0,004	0,001	0,726	2,70
$\text{M} \times \text{Fe}^{2+}$	3	10,070	3,356	1750,65**	2,70
$\text{M} \times \text{Ca}^{2+}$	3	0,037	0,012	6,451**	2,70
$\text{Fe}^{2+} \times \text{Ca}^{2+}$	9	0,088	0,009	5,101**	1,97
$\text{M} \times \text{Fe}^{2+} \times \text{Ca}^{2+}$	9	1,148	0,127	66,510**	1,97
Galat	96	0,184	0,002		
Total	127				

**berbeda nyata pada taraf 5%.

Tabel 3. Produksi ekstrak kasar prodigiosin dan prodigiosin murni, serta persentase kemurniannya.

Media	Ekstrak kasar prodigiosin ($\mu\text{g/ml}$)	Prodigiosin murni ($\mu\text{g/ml}$)	Tingkat kemurnian (%)
LB	486	378	77,8
NB	489	450	92

prodigiosin juga akan meningkat. Selain FeSO_4 , mineral CaCO_3 mempunyai peranan penting dalam biosintesis prodigiosin. Peran spesifik Fe^{2+} dalam biosintesis prodigiosin belum diketahui, tetapi penambahan Fe^{2+} hingga konsentrasi tertentu sangat diperlukan untuk memaksimalkan pertumbuhan sel mikroba. Dengan penambahan Fe^{2+} ke dalam media, dapat dihasilkan prodigiosin yang bersifat larut dalam air.

Prodigiosin yang dihasilkan oleh bakteri entomopatogen *S. marcescens* merupakan salah satu metabolit sekunder yang mempunyai potensi besar untuk digunakan dalam bidang medis. Produksi prodigiosin tidak saja berbeda-beda antarstrain *S. marcescens*, tetapi juga ditentukan oleh komposisi media untuk biakan (Kim *et al.*, 2004). Kedua jenis media LB dan NB memiliki sumber nitrogen (N) dan karbon (C) yang berbeda. Sumber N dan C pada media LB ber-

asal dari triptosa dan ekstrak ragi ditambah dengan mineral NaCl, sedangkan pada media NB digunakan ekstrak daging dan pepton. Perbedaan produksi prodigiosin yang signifikan pada media LB dan NB diduga berkaitan dengan perbedaan kandungan nutrisi pada kedua media tersebut. Pepton berfungsi sebagai sumber nitrogen, sulfur, karbon, dan energi, sedangkan ekstrak daging penting untuk memenuhi kebutuhan asam amino esensial, vitamin, koenzim, dan mineral bagi pertumbuhan bakteri. Pada media LB, sumber nitrogen, karbon, asam amino esensial, vitamin, koenzim, dan mineral dipenuhi dari ekstrak khamir dan triptosa. Secara kuantitas, media LB lebih kaya nutrisi dibanding dengan NB, tetapi ternyata produksi prodigiosin lebih tinggi pada media NB (Tabel 3). Hasil ini sesuai dengan yang diungkapkan oleh Venil dan Perumalsamy (2009) bahwa media NB merupakan

salah satu media yang baik untuk produksi prodigiosin. Hal ini menunjukkan bahwa biosintesis prodigiosin lebih tinggi pada media rendah nutrisi. Casullo de Araújo *et al.* (2010) dan Giri *et al.* (2004) berhasil memproduksi prodigiosin pada media yang cukup sederhana. Casullo de Araújo *et al.* (2010) menggunakan limbah buangan tepung kasava yang ditambah dengan manitol (2%) untuk menghasilkan prodigiosin hingga 49,5 mg/ml. Hasil prodigiosin ini lebih tinggi dibanding dengan penggunaan tepung kacang seperti yang dilaporkan oleh Giri *et al.* (2004) yang hanya mencapai 39 mg/ml, sedangkan hasil penelitian Jungdon *et al.* (2001) di dalam media cair yang mengandung dekstroza dan kasein hanya menghasilkan sebanyak 13 mg/ml.

Karakteristik Prodigiosin secara Kromatografi dan Spektrofotometer

Pemurnian prodigiosin

Hasil analisis dengan spektrofotometer menunjukkan bahwa prodigiosin memiliki nilai absorbansi yang tinggi pada panjang gelombang 460 nm jika dilarutkan dalam pelarut yang bersifat basa dan 540 nm jika berada dalam pelarut yang bersifat asam (Gambar 5). Perbedaan serapan panjang gelombang prodigiosin pada kedua sifat pelarut tersebut berkaitan dengan perubahan warna prodigiosin pada kondisi asam dan basa. Warna merah akan terjadi pada pelarut yang bersifat asam, sedangkan pada pelarut yang bersifat basa warna prodigiosin menjadi kekuningan.

Titik puncak prodigiosin pada media LB terdeteksi pada serapan panjang gelombang 494–496 nm, baik pada pelarut bersifat basa maupun asam pada media LB (Gambar 5A). Pada media NB, titik puncaknya terdeteksi pada panjang gelombang 502 nm dan 506 nm (Gambar 5B). Pola serapan ini sama dengan prodigiosin murni (Sigma™) yang digunakan sebagai standar (Gambar 5C). Hal ini menunjukkan bahwa pemurnian dengan kromatografi kolom masih belum mampu membersihkan prodigiosin dari senyawa metabolit lainnya.

Uji bioautografi

Hasil analisis prodigiosin menggunakan kromatografi lapis-tipis dengan gel silika yang dijalankan dengan pelarut amil asetat memperlihatkan dua spot prodigiosin yang terdeteksi memiliki nilai R_f 0,82 dan 0,83 (Gambar 6).

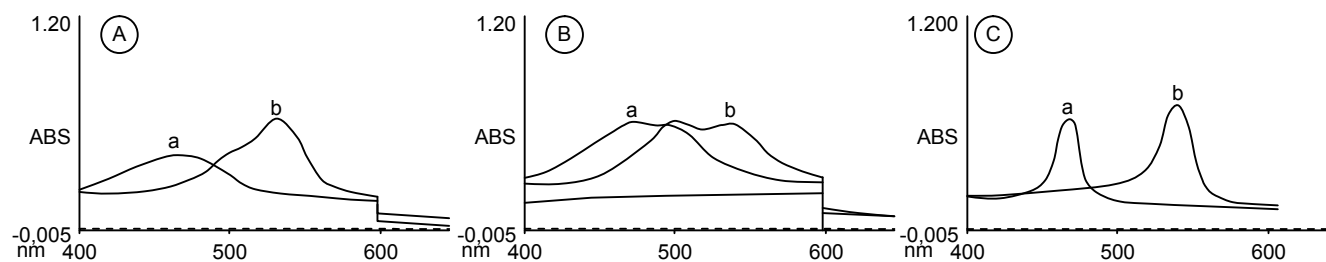
Untuk memastikan spot merah pada nilai R_f 0,82 dan 0,83 adalah prodigiosin, telah dilakukan uji bioautografi dengan bakteri uji *Xoo*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri hanya terhambat pada spot merah, tetapi tidak pada spot yang lain (Gambar 7). Hal ini membuktikan spot merah yang mampu menghambat pertumbuhan *Xoo*. dengan nilai R_f 0,82 dan 0,83 adalah prodigiosin.

Proses purifikasi prodigiosin melalui tahapan ekstraksi dan kromatografi kolom dengan menggunakan gel silika menunjukkan produksi prodigiosin pada media NB lebih murni dibanding dengan media LB. Pada media LB kemurniannya 77,8%, sedangkan pada media NB adalah 92%. Hasil ini juga diperkuat dengan nilai R_f yang diperoleh dari hasil kromatografi lapis-tipis. Nilai R_f pada media NB lebih tinggi dibanding dengan media LB, walaupun masih terbentuk dua spot pada masing-masing media. Selain itu, pada grafik hasil spektrofotometer terlihat adanya dua titik puncak yang terbentuk yang menggambarkan bahwa prodigiosin yang dihasilkan belum murni.

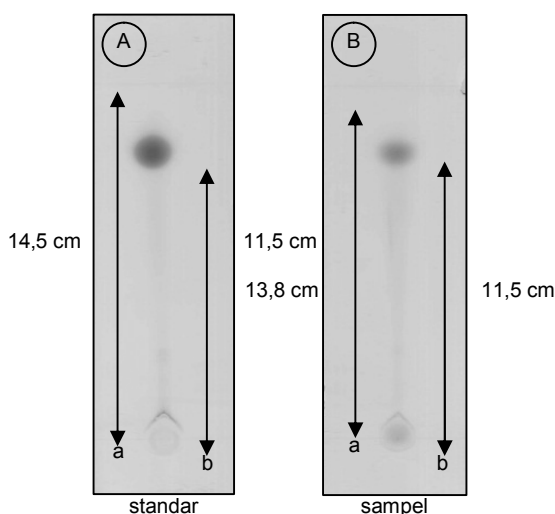
KESIMPULAN DAN SARAN

Pengaruh penambahan FeSO_4 1 mM dalam media NB menghasilkan konsentrasi ekstrak kasar prodigiosin tertinggi sebanyak 178,75 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan konsentrasi terendah diperoleh sebanyak 47 $\mu\text{g/m}$ pada media LB dengan kombinasi larutan CaCO_3 10 mM dan FeSO_4 0,25 mM.

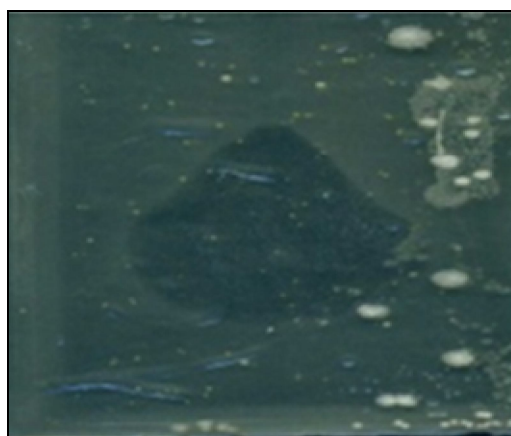
Penambahan FeSO_4 1 mM pada media LB dan NB masing-masing menghasilkan 486,0 mg dan 489,0 mg ekstrak kasar prodigiosin. Purifikasi menggunakan kromatografi lapis-tipis dengan gel silika pada media NB menghasilkan prodigiosin murni sebanyak 450



Gambar 5. Deteksi prodigiosin pada media LB dengan spektrofotometer. A = media LB, B = media NB, C = deteksi prodigiosin standar (Sigma™), a = pelarut asam, b = pelarut basa.



Gambar 6. Hasil analisis prodigiosin menggunakan kromatografi lapis-tipis dengan gel silika yang dijalankan dengan pelarut amil asetat. a = jarak yang ditempuh pelarut, b = jarak yang ditempuh sampel.



Gambar 7. Hasil uji bioautografi terhadap bakteri *X. oryzae* pv. *oryzae*. Zona terang menunjukkan aktivitas antibakteri

mg/ml dengan tingkat kemurnian tertinggi mencapai 92%.

Prodigiosin memiliki nilai absorbansi yang tinggi pada panjang gelombang 460 nm pada pelarut yang bersifat basa dan 540 nm pada pelarut yang bersifat asam.

Deteksi prodigiosin dengan kromatografi lapis-tipis menggunakan gel silika menunjukkan pigmen merah mempunyai nilai R_f 0,83, dan hasil uji bioautografi menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Xoo*.

Perlu penelitian lebih lanjut untuk produksi prodigiosin skala besar dengan memanfaatkan bahan dasar media yang lebih murah dan ekonomis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA BB Biogen TA 2011 No. 1798.09.011. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. Dr. Supriadi yang telah mengoreksi naskah, serta teknisi Laboratorium Mikrobiologi yang telah membantu kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Castro, A.J. 1967. Antimalarial activity of prodigiosin. *Nature* 213:903-904.
- Casullo de Araújo, H.W., K. Fukushima, and M.C. Takaki. 2010. Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low cost substrate. *Molecules* 15:6931-6940.

- Chang, S., M. Sanada, O. Johdo, S. Ohta, Y. Nagamatsu, and A. Yoshimoto. 2000. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown ethanol. *Biotechnol. Lett.* 22:1761-1765.
- Dhanasekaran, D., N.R. Devaraj, N. Thajuddin, and A. Panneerselvam, 2009. Production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and its cytotoxicity activity. *Pharmacy Research* 2(4):590-593.
- Giri, A.V., N. Anandkumar, G. Muthukumaran, and G. Pennathur. 2004. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiol.* 4:1-10.
- Jungdon, B., M. Hyunsoo, O. Kyeong-Keun, K. Chang-Ho, S.L. Dae, W.K. Seung, and H. Suk-In. 2001. A novel bioreactor with an internal adsorbent for integrated fermentation and recovery of prodigiosin like pigment produced from *Serratia* sp. *Biotechnol. Lett.* 23:1315-1319.
- Khanafari, A., M.M. Assadi, and F.A. Fakhr. 2006. Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *J. Biol. Sci.* 6(1):1-13.
- Kim, H.B., C.P. Smith, J. Micklefield, and F. Mavituna. 2004. Metabolic flux analysis for calcium dependent antibiotic (CDA) production in *Streptomyces coelicolor*. *Metab. Eng.* 6(4):313-325.
- Nakamura. 1981. Process for preparation of prodigiosin. US Patent No. 4, 266, 028.
- Nakashima, T., T. Tamura, M. Kurachi, K. Yamaguchi, and T. Oda. 2005. Apoptosis-mediated cytotoxicity of prodigiosin-like red pigment produced by γ -*Proteobacterium* and its multiple bioactivities. *Biol. Pharm. Bull.* 28:2289-2295.
- Pérez-Tomás, R., B. Montaner, E. Llagostera, and V. Soto-Cerrato. 2003. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. *Biochem. Pharmacol.* 66(8):1447-1452.
- Priyatno, T.P., Y.A. Dahliani, Y. Suryadi, I.M. Samudra, D.N. Susilowati, I. Rusmana, B.S. Wibowo, dan C. Irwan. 2011. Identifikasi entomopatogen bakteri merah pada wereng batang coklat (*Nilaparvata lugens* Stål). *J. Agrobiogen* 7(2):85-95.
- Venil, K.C. and L. Perumalsamy. 2009. An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin. *Electron. J. Biol.* 5(3):49-61.
- Witney, F.R., M.L. Failla, and E.D. Weinberg. 1977. Phosphate inhibition of secondary metabolism in *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33(5):1042-1046.
-