

Aktivitas Antioksidan dan Sitotoksitas Ekstrak Bakteri Tanah Asal Pulau Muna, Sulawesi Tenggara

Antioxidant and Cytotoxic Properties of Extract from Soil Bacteria Isolated from Muna Island, Southeast Sulawesi

Jepri Agung Priyanto^{1*}, Egiyanti Nur Widhia Hening¹, Vera Permatasari², Muhammad Eka Prasty², La Ode Abdul Fajar Hasidu³, Gian Primahana²

¹Divisi Mikrobiologi, Departemen Biologi, FMIPA, IPB University

²Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN),

³Jurusan Ilmu Kelautan, Universitas Sembilanbelas November Kolaka

*E-mail: jepriyanto@apps.ipb.ac.id

ABSTRACT

Soil bacteria could be the promising source of secondary metabolites with diverse pharmacological activities. Bacteria coded as P1 and M7 were isolated from soil obtained from Muna Island, Southeast Sulawesi. This research aimed to evaluate the antioxidant activity, cytotoxic property, and identify the chemical profile of the extract derived from soil bacteria P1 and M7. Based on 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay, extract derived from P1 isolate was moderately active against ABTS free radical with IC₅₀ of 126.22±10.82 µg/mL, and less active on DPPH (IC₅₀: 721.95±16.59 µg/mL), while M7 extract was less active towards DPPH and ABTS. Interestingly, these extracts in the concentration of 100 µg/mL were cytotoxic to breast cancer cell (MCF-7), as tested by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. MCF-7 viability was decreased up to 69.83±1.46 % and 61.49±0.76 % after treated with P1 and M7 extract, respectively. The extracts were also induced membrane disruption and apoptosis of MCF-7 cells. The extracts contained phenol (9.52±0.22 and 10.41±0.09 mg EAG/g extract, for P1 and M7, respectively) and flavonoids (9.16±0.16 and 9.29±0.24 mg EQ/g extract, for P1 and M7, respectively). According to Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) analysis, Pyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl) that previously well known as antioxidant and cytotoxic compounds, were found in the M7 and P1 extract. This compound may play a vital role in the radical scavenging and cytotoxic properties of P1 and M7 extracts. The results of this study indicate that P1 and M7 extracts could be the potential source of antioxidant and cytotoxic compounds and need to be further developed for pharmaceutical use.

Keywords: Antioxidant, cytotoxicity, muna island, soil bacteria, phenol, flavonoids.

PENDAHULUAN

Keberadaan radikal bebas yang berlebih di dalam sel dapat mengganggu struktur dan fungsi normal sel (Liguori *et al.*, 2018). Cekaman oksidatif ini berkontribusi dalam menginduksi penuaan dan berbagai penyakit degeneratif, antara lain kanker, jantung koroner, alzheimer, parkinson, dan gagal ginjal kronis (Leyane *et al.*, 2022). Oleh karena itu, pencarian senyawa bahan alam yang memiliki aktivitas farmakologis terutama sebagai antioksidan dan antikanker dari sumber-sumber biologis terus dilakukan. Senyawa antioksidan memiliki kemampuan untuk meredam, menstabilisasi, atau memperlambat produksi radikal bebas dari aktivitas seluler (Żyłańczyk-Duda *et al.*, 2018). Dengan adanya karakter tersebut, senyawa antioksidan dapat mengurangi cekaman oksidatif sel dan jaringan manusia

yang penting dalam mencegah atau mengatasi penyakit timbulnya penyakit degeneratif, termasuk kanker. Mikroorganisme merupakan salah satu sumber potensial penghasil senyawa antioksidan dan antikanker (Gupta, 2014).

Tanah merupakan salah satu habitat favorit berbagai mikroorganisme. Diantara jenis mikroorganisme tanah lainnya, bakteri merupakan kelompok mikroorganisme tanah yang paling melimpah dan beragam (Ding *et al.*, 2019). Satu gram tanah mengandung bakteri sekitar 10⁵ hingga 10¹⁰ CFU/g (Kacergius & Sivojiene, 2023; Mushtaq *et al.*, 2023). Bakteri yang hidup pada lingkungan ini seringkali terpapar oleh berbagai cekaman, termasuk radiasi UV, fluktuasi temperatur, ketersediaan air, dan kompetisi intraspecies maupun interspecies untuk memperebutkan sumber daya (Peyrat *et al.*, 2019). Sebagai bentuk adaptasi dari kondisi lingkungan ini, bakteri berevolusi

dengan mengembangkan kemampuan metabolisme yang unik untuk memproduksi berbagai jenis senyawa bioaktif dengan bioaktivitas spesifik untuk membantunya bertahan hidup pada lingkungan tersebut. Senyawa bioaktif asal bakteri tanah telah banyak dilaporkan memiliki berbagai fungsi farmakologis, diantaranya antimikrob (Andayani *et al.*, 2015), antikanker (Osama *et al.*, 2022), antivirus (Gaied, 2017), dan antioksidan (Celladurai & Vadamalai *et al.*, 2022).

Pulau Muna merupakan pulau yang terletak di Kabupaten Buton Tengah, Sulawesi Tenggara. Pulau ini memiliki bentang alam yang khas berupa perbukitan batu gamping atau bukit karst. Umumnya kondisi lahan pada pulau ini tergolong sebagai lahan gersang dengan tanah berkapur (Hindersah & Rahmi, 2020). Kondisi tanah tersebut merupakan tempat yang potensial untuk mendapatkan bakteri tanah dengan kemampuan produksi metabolit yang khas. Namun, hingga saat ini eksplorasi bakteri tanah dari kawasan tersebut, baik dari segi keragaman maupun bioprospeksinya belum pernah dilakukan. Eksplorasi mikroorganisme tanah dari kawasan kepulauan yang jarang diteliti dan memiliki karakteristik wilayah yang khas merupakan peluang besar untuk menemukan mikroorganisme-mikroorganisme jenis baru dengan karakter genetik dan fisiologis yang unggul.

Pada penelitian sebelumnya, dua isolat bakteri dengan kode P1 dan M7 telah berhasil diisolasi dari tanah Pulau Muna (Koleksi dari Jepri Agung Priyanto, Laboratorium Mikrobiologi, Dept. Biologi, FMIPA, IPB, 2022). Namun, dua isolat tersebut belum dikaji bioaktivitasnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi antioksidan, sitotoksitas, dan profil kimia dari ekstrak isolat bakteri P1 dan M7 yang diisolasi dari tanah Pulau Muna, Sulawesi Tenggara.

METODE

Sumber isolat bakteri

Dua isolat bakteri dengan kode M1 dan P7 yang digunakan dalam penelitian ini telah diisolasi dari tanah Pulau Muna, Kabupaten Buton Tengah, Sulawesi Tenggara (Koleksi Jepri Agung Priyanto Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, FMIPA, IPB, 2022).

Kultur bakteri dan ekstraksi senyawa bioaktif

Dua isolat bakteri tanah (P1 dan M7) masing-masing diinokulasikan pada media *nutrient broth* (NB) dan diinkubasi pada suhu ruang $\pm 28^\circ\text{C}$ selama 24 jam.

Sebanyak 1% (v/v) kultur tersebut selanjutnya diinokulasikan ke dalam 1 L media NB baru, diikuti dengan inkubasi selama 3 hari pada suhu $\pm 28^\circ\text{C}$ dengan agitasi 120 rpm. Kemudian, kultur ditambahkan dengan etil asetat 1:1 (v/v). Campuran selanjutnya dikocok dengan kuat selama 60 menit. Fase pelarut etil asetat kemudian dipisahkan dan diuapkan pada suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak kasar bakteri. Ekstrak kering yang diperoleh kemudian ditimbang dan disimpan pada suhu 4°C (Priyanto *et al.*, 2023^a).

Uji aktivitas antioksidan terhadap DPPH dan ABTS

Aktivitas antioksidan ekstrak bakteri ditentukan menggunakan 2 jenis radikal yaitu 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) dan 2, 2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-asam sulfonat (ABTS) (Prastya *et al.*, 2020). Larutan sampel yang telah dilarutkan dengan metanol diencerkan pada *microplate* 96 well hingga mencapai konsentrasi 39,75- 5000 $\mu\text{g/mL}$ dengan volume akhir masing-masing sampel pada sumuran sebanyak 100 μL . Sampel tersebut kemudian ditambah dengan 100 μL DPPH (2,5 μM) dan diinkubasi dalam kondisi gelap selama 30 menit pada suhu ruang ($\pm 28^\circ\text{C}$).

Selanjutnya, sampel tersebut diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer ELISA pada panjang gelombang 515 nm. Disisi lain, pada uji ABTS, radikal dibuat dengan mencampurkan kalium persulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) dengan 2,45 mM dan larutan ABTS dengan konsentrasi 7 mM pada perbandingan 1:1 (v/v) dan diinkubasi dalam kondisi gelap selama 12-16 jam pada suhu $\pm 28^\circ\text{C}$. Radikal ABTS yang digunakan harus memiliki nilai absorbansi 0,6 - 0,7 (panjang gelombang 734 nm).

Selanjutnya, 150 μL radikal ABTS dicampurkan dengan 50 μL larutan sampel (39,75 - 5000 $\mu\text{g/mL}$), lalu diinkubasi dalam gelap selama 30 menit pada suhu $\pm 28^\circ\text{C}$, dan dilanjutkan dengan pengukuran pada panjang gelombang 734 nm. Persentase nilai penghambatan dari kedua radikal tersebut ditentukan dengan rumus: $[(\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}) / \text{Absorbansi kontrol}] \times 100$. Nilai inhibisi kemudian ditentukan melalui persamaan linier regresi untuk mendapatkan nilai penghambatan 50% (IC_{50}). Senyawa asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif.

Uji sitotoksitas

Dua ekstrak bakteri tanah P1 dan M7 dianalisis sitotoksitasnya terhadap sel kanker payudara manusia (MCF-7, ATCC; Rockville, MD, USA), koleksi dari laboratorium Biokimia, Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional, BRIN, Serpong. Sel uji tersebut secara rutin diremajakan pada Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) tinggi glukosa dengan kandungan antibiotik 1% (penisilin-streptomisin) dan fetal bovine serum (FBS) 10% dalam inkubator CO_2 5% pada suhu 37°C . Uji sitotoksitas dilakukan dengan mengkultur sel pada *microplate* steril 96 well dengan konsentrasi sel awal

1×10^4 sel/sumur diikuti dengan inkubasi selama 24 jam pada kondisi seperti pemeliharaan sel diatas.

Kemudian, media DMEM diganti dengan media yang baru dan ditambahkan ekstrak bakteri dengan konsentrasi akhir 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kemudian diinkubasi selama 48 jam. Selanjutnya, sel dicuci menggunakan buffer fosfat pH 7,4 dan ditambah dengan larutan 10 μL 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5 difenil tetrazolium bromida (MTT) (0,5 mg/mL), dan diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, kultur sel ditambah dengan 200 μL DMSO 99%. Viabilitas sel diukur pada panjang gelombang 570 nm. Persentase penghambatan ditentukan menggunakan rumus: $[(1 - (\text{Absorbansi Sampel} - \text{Absorbansi Kontrol DMSO})) \times 100\%]$. Dokсорubisin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dan DMSO (0,05%) secara berturut-turut digunakan sebagai kontrol positif dan negatif (Priyanto *et al.*, 2023^b).

Analisis kandungan total fenol

Kandungan total fenol pada ekstrak bakteri ditentukan menggunakan teknik kolorimetri Folin-Ciocalteu (Prastya *et al.*, 2019). Reaksi uji dibuat dengan mencampurkan 0,5 mL sampel (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 3,5 mL akuades, dan 0,25 mL reagen Folin-Ciocalteu, dilanjutkan dengan homogenisasi dan diinkubasi selama 8 menit pada suhu ± 28 °C. Campuran kemudian ditambahkan dengan 0,75 mL natrium bikarbonat 20% dan diinkubasi kembali pada suhu ruang selama 2 jam. Segera setelah itu, absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer (Thermo Scientific Varioskan Flash ELISA, ThermoFischer) pada panjang gelombang 765 nm. Nilai kadar total fenol dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat (EAG) mg/g ekstrak.

Penentuan kadar total flavonoid

Kadar total flavonoid dianalisis menggunakan teknik kolorimetri aluminium klorida (Prastya *et al.*, 2019). Reaksi penentuan kadar total flavonoid disiapkan dengan mencampurkan 2,45 mL akuades, 0,5 mL sampel (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), dan 0,15 mL NaNO_2 5%, kemudian diinkubasi pada suhu ± 28 °C selama 2 menit. Selanjutnya campuran tersebut ditambah dengan 0,15 mL aluminium klorida 10% dan diinkubasi pada suhu ± 28 °C selama 8 menit. Selanjutnya, larutan tersebut ditambahkan dengan 2 mL NaOH 1 M, dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm. Nilai kadar total flavonoid dinyatakan sebagai ekuivalen kuersetin (EQ) mg/g ekstrak.

Analisis GC-MS

Analisis GC-MS dilakukan menggunakan instrumen Agilent 19091S-433:93.92873 GC-MS. 1 μL sampel ekstrak bakteri yang dilarutkan dalam pelarut n-heksana, disuntikkan ke dalam kolom HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox 0 °C-325 °C (325 °C): 30 m x 250 μm x 0,25 μm . Gas helium digunakan sebagai gas pembawa dengan laju aliran 1 mL/menit. Suhu awal yang digunakan sebesar 40 °C secara bertahap selama 30 menit hingga mencapai suhu 300 °C. Tekanan

diatur sebesar 7,0699 psi dengan kecepatan rata-rata aliran tekanan sebesar 36,262 cm/detik dan waktu penahanan 1,3789 cm/detik. Perangkat lunak MSD Chem-Station Data Analysis digunakan untuk menganalisis hasil spektrum GC-MS.

Analisis statistik

Setiap uji dilakukan dengan tiga ulangan. Data yang ditampilkan merupakan hasil rata-rata yang dilengkapi dengan deviasi standar (\pm SD). 99% selang kepercayaan diperoleh dari hasil analisis *one-way of variance* (ANOVA). Uji lanjut Duncan digunakan untuk menganalisis signifikansi perbedaan data. Data dengan *P-value* <0,05 dianggap berbeda nyata.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas antioksidan ekstrak bakteri tanah

Ekstrak isolat M7 dan P1 memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda yang diindikasikan oleh nilai IC_{50} yang bervariasi baik terhadap radikal DPPH maupun ABTS (Tabel 1). Berdasarkan nilai IC_{50} -nya, aktivitas antioksidan ekstrak bahan alam dapat digolongkan menjadi beberapa kategori, antara lain sangat kuat (<50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), kuat (50-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), moderat (101-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lemah (>150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Irawan *et al.*, 2022).

Berdasarkan pengelompokan tersebut, ekstrak P1 memiliki aktivitas antioksidan moderat terhadap radikal ABTS karena memiliki IC_{50} sebesar $126,22 \pm 10,82$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, namun aktivitasnya lemah terhadap radikal DPPH (IC_{50} $721,95 \pm 16,59$ $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ekstrak yang aktif terhadap radikal ABTS umumnya memiliki kemampuan untuk mendonorkan radikal proton untuk menstabilkan radikal bebas, sedangkan ekstrak yang aktif terhadap DPPH adalah ekstrak yang mampu mendonorkan ion hidrogen (H_3O^+) (Mus *et al.*, 2017).

Disisi lain, ekstrak M7 memiliki aktivitas antioksidan lemah, baik terhadap radikal DPPH maupun DPPH. Secara umum, asam askorbat masih memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak bakteri. Beberapa penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa ekstrak dari *Bacillus* sp. memiliki aktivitas antioksidan dengan IC_{50} terhadap DPPH sebesar 15.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Gopi *et al.*, 2014), dan *Bacillus tequilensis* strain BT4 dengan dengan IC_{50} terhadap DPPH sebesar 196.236 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Arivo *et al.*, 2023). Aktivitas antioksidan keduanya masih lebih rendah dibandingkan dengan asam askorbat sebagai sampel standar antioksidan.

Tabel 1. Aktivitas antioksidan ekstrak bakteri P1 dan M7

Sampel	IC ₅₀ Aktivitas antioksidan (µg/mL)*	
	DPPH	ABTS
M7	617,25±17,55 ^b	933,56±12,99 ^d
P1	721,95±16,59 ^c	126,22±10,82 ^c
Asam askorbat	6,82±7,50 ^a	1,58±0,67 ^a

*Keterangan: huruf yang berbeda diatas nilai IC₅₀ mengindikasikan bahwa data berbeda nyata

Sitotoksitas ekstrak bakteri tanah terhadap sel kanker payudara (MCF-7)

Ekstrak P1 dan M7 pada konsentrasi 100 µg/mL, mampu menghambat viabilitas sel MCF-7 lebih dari 60% (Tabel 2). Ekstrak P1 lebih aktif karena memiliki persentase penghambatan viabilitas sel yang lebih besar (69,83±1,46 %) dibandingkan dengan ekstrak M7 (61,49±0,76). Disisi lain, pada konsentrasi yang sama, kontrol positif doksorubisin juga mampu menghambat viabilitas sel hingga 92,71%.

Tabel 2. Sitotoksitas ekstrak bakteri P1 dan M7 terhadap sel MCF-7

Sampel*	Rata-rata penghambatan viabilitas sel MCF-7 ±SD (%)
M7	61,49±0,76 ^b
P1	69,83±1,46 ^c
Doksorubisin	92,71±0,99 ^d
DMSO	0 ^a

*Keterangan: ekstrak bakteri dan doksorubisin diuji pada konsentrasi 100 µg/mL, sedangkan DMSO diuji pada konsentrasi 0,05% (v/v). Huruf yang berbeda diatas data mengindikasikan bahwa data tersebut berbeda nyata.

Viabilitas sel MCF-7 menurun setelah diberi perlakuan ekstrak P1 dan M7 selama 48 jam. Ekstrak tersebut juga menginduksi terjadinya perubahan morfologi sel MCF-7 seperti adanya kerusakan membran dan apoptosis sel MCF-7, sehingga densitas MCF-7 yang diuji dengan ekstrak bakteri lebih rendah dibandingkan pada perlakuan tanpa ekstrak (Gambar 1). Penurunan densitas dan apoptosis sel MCF-7 juga

ditemukan pada kultur sel yang diuji dengan doksorubisin. Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak P1 dan M7 dapat menjadi sinyal eksternal bagi MCF-7 untuk menginisiasi jalur apoptosis sel MCF-7. Beberapa penelitian sebelumnya juga telah melaporkan bahwa metabolit dari bakteri lainnya juga mampu menginduksi apoptosis sel MCF-7. Metabolit dari *Bacillus scoagulan* mampu menurunkan viabilitas sel MCF-7 dan menginduksi apoptosis melalui peningkatan ekspresi gen bax, caspase 3, dan caspase 9, serta penurunan ekspresi gen anti-apoptosis yaitu gen BCL2 (Dolati *et al.*, 2021). Selain itu, bakteri lainnya yaitu *Bacillus thuringiensis* juga mampu menghasilkan metabolit berupa protein parasporin A13-2 yang bersifat sitotoksik terhadap sel MCF-7 (Borin *et al.*, 2021).

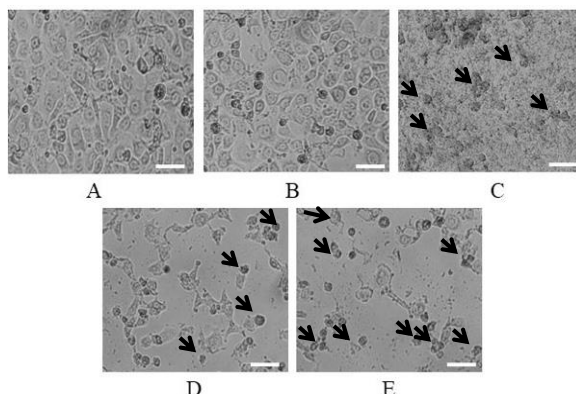
Total fenol dan flavonoid dari ekstrak bakteri P1 dan M7

Ekstrak P1 dan M7 memiliki kandungan total fenol yang berbeda (Tabel 3). Ekstrak M7 memiliki total fenol yang lebih tinggi (10,41±0,09 mg EAG/g ekstrak) dibandingkan dengan ekstrak P1 (9,52±0,22 mg EAG/g ekstrak). Disisi lain, kandungan total flavonoid kedua ekstrak ini relatif sama. Ekstrak M7 dan P1 berturut-turut memiliki total flavonoid 9,29±0,24 dan 9,16±0,16 mg EQ/g ekstrak. Adanya fenol dan flavonoid dalam kedua ekstrak ini diduga berkontribusi dalam aktivitas antioksidan dan sitotoksitasnya terhadap sel MCF-7. Fenol dan flavonoid pada ekstrak bahan alam umumnya terlibat dalam deaktivasi radikal bebas (Aryal *et al.*, 2019), dan sitotoksik terhadap sel kanker payudara MCF-7 (Berdowska *et al.*, 2013).

Tabel 3. Total fenol dan flavonoid dari ekstrak bakteri P1 dan M7

Sampel	Total fenol (mg EAG/g ekstrak)*	Total flavonoid (mg EQ/g ekstrak)*
M7	10,41±0,09 ^b	9,29±0,24 ^a
P1	9,52±0,22 ^a	9,16±0,16 ^a

*Keterangan: huruf yang berbeda diatas data pada kolom yang sama mengindikasikan bahwa data tersebut berbeda nyata.



Gambar 1. Densitas dan morfologi sel MCF-7, pada (A) media DMEM; perlakuan (B) DMSO 0,05%, (C) Doksorubisin, (D) ekstrak M7, (E) ekstrak P1, yang diamati menggunakan mikroskop cahaya terbalik (inverted) dengan perbesaran 100x. Garis putih menunjukkan skala ukuran 30 μ m. Tanda panah hitam menunjukkan sel MCF-7 yang mengalami apoptosis

Tabel 4. Daftar senyawa volatil dominan pada ekstrak isolat M7 dan bioaktivitasnya

No.	Senyawa	Waktu retensi	Kelimpahan (%)	Kemiripan (%)	Golongan	Bioaktivitas	Pustaka
1	Isophorone	13,825	5,81	46	keton	Antibakteri	Kiran <i>et al.</i> , 2013
2	Cetene (1-hexadecene)	19,850	2,29	96	hidrokarbon	-	
3	Phenol, 4-(1,1-dimethylpropyl)	21,450	2,17	49	fenol	-	
4	1-Octadecene	22,017	3,89	99	alkene	-	
5	Cyclo(L-prolyl-L-valine)	22,710	2,00	97	peptida	-	-
6	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	23,832	4,87	95	peptida	Anti-MRSA, antioksidan, antifungi, sitotoksik moderat terhadap sel normal RAW 264	Kiran <i>et al.</i> , 2018; Sanjenbam & Kannabiran, 2016; Ser <i>et al.</i> , 2015
7	3-Eicosene	24,034	4,78	96	Asam lemak	-	-
8	1-Tetracosene	25,912	1,93	94	Asam lemak	-	-
9	Tributyl acetyl citrate	26,365	0,63	62	Asam tetrakarboksilat	-	-
10	Cyclotetracosane	27,676	1,27	99	Asam lemak	Antimikrob, antikanker, antioksidan	Mongalo <i>et al.</i> , 2019
11	Bis (2-ethylhexyl) phthalate	29,088	67,45	93	Asam ptalat	Antibakteri dan larvasida; Antimutagenik	Cruz-Ramírez <i>et al.</i> , 2021; Javed <i>et al.</i> , 2022
12	1-Hexacosene	29.579	0,92	96	Asam lemak	-	-

Tabel 5. Daftar senyawa volatil dominan pada ekstrak isolat P1 dan bioaktivitasnya

No.	Nama senyawa	Waktu retensi (menit)	Kelimpahan (%)	Kemiripan (%)	Golongan	Bioaktivitas	Pustaka
1	Isophorone	13,926	3,78	35	keton	Antibakteri	Kiran <i>et al.</i> , 2013
2	Cetene	19,837	1,96	93	hidrokarbon	-	-
3	Hexestrol	21,312	0,44	59	<i>stilbene</i>	antiandrogen	Schiller <i>et al.</i> , 1990
4	2,2-Dimethyl-N-phenethylpropionamide	21,526	2,57	50	-	-	-
5	Phenol, 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)	21,765	1,11	46	fenol	-	-
6	Cyclo(L-prolyl-L-valine)	22,711	2,49	98	alpha amino acids	-	-
7	2-Decene, 3-methyl-, (Z)	23,063	0,49	43	-	-	-
8	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5) decane-6,9-diene-2,8-dione	23,366	0,28	92	-	Inhibitor alfa amilase	Ahmad <i>et al.</i> , 2023
9	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)	23,820	4,75	94	peptida	Anti-MRSA, antioksidan, Antifungal, moderat terhadap sel normal RAW 264	Kiran <i>et al.</i> , 2018; Sanjeban & Kannabiran, 2016; Ser <i>et al.</i> , 2015
10	3-Eicosene	24,009	5,41	74	Asam lemak	-	-
11	1-Octadecene	25,886	1,62	96	alkena	-	-
12	Tributyl acetyl citrate	26,340	0,78	62	Asam tetrakarboksilat,	-	-
13	1-Tetracosene	27,651	1,27	99	Asam lemak	-	-
14	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	29,037	66,29	98	Asam ptalat	Antibakteri dan larvasida; Antimutagenik	Cruz-Ramírez <i>et al.</i> , 2021; Javed <i>et al.</i> , 2022
15	1-Hexacosene	29,529	1,02	97	Asam lemak	-	-

Profil senyawa volatil ekstrak P1 dan M7

Adanya aktivitas antioksidan dan sitotoksik ekstrak bakteri P1 dan M7 kemungkinan besar didukung oleh keberadaan senyawa aktif yang terkandung di dalamnya. Analisis GC-MS menunjukkan bahwa kedua ekstrak tersebut mengandung berbagai senyawa bioaktif volatil dengan kelimpahan dan waktu retensi yang

berbeda-beda. Senyawa kelompok peptida, keton, stilbene, asam lemak, fenol, asam ptalat, asam tetra karboksilat, alkena, stilbene, dan hidrokarbon terdeteksi pada ekstrak bakteri M7 (Tabel 4) dan M7 (Tabel 5). Beberapa senyawa antioksidan dan antikanker, seperti *pyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione*, *hexahydro-3-(2-methylpropyl)*, dan *cyclotetracosane*,

teridentifikasi pada ekstrak M7, sedangkan senyawa *cyclotetracosane* tidak terdeteksi pada ekstrak P1. Kedua senyawa tersebut juga diproduksi oleh bakteri *Bacillus tequilensis* MSI45, *Streptomyces mangrovisoli* sp. Nov., dan *Streptomyces* sp. VITPK9 dan telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan dan sifat sitotoksik terhadap sel RAW 264 (Kiran *et al.*, 2018; Sanjenbam & Kannabiran, 2016; Ser *et al.*, 2015). Selain kedua senyawa tersebut, ekstrak P1 dan M7 juga mengandung senyawa aktif lainnya yang telah diketahui memiliki aktivitas antibakteri, antifungi, antimutagenik, antiandrogen, larvasida, dan inhibitor alfa amilase. Namun, masih banyak senyawa kimia dalam ekstrak kedua bakteri ini yang belum diketahui aktivitas farmakologinya, sehingga perlu penelitian lebih lanjut.

KESIMPULAN

Ekstrak isolat P1 dan M7 memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda. Ekstrak P1 lebih aktif terhadap radikal ABTS dengan aktivitas antioksidan moderat dibandingkan dengan radikal DPPH. Meskipun demikian, kedua ekstrak sangat aktif terhadap sel kanker payudara MCF-7. Ekstrak P1 dan M7 pada konsentrasi 100 µg/mL mampu menghambat viabilitas sel MCF-7 hingga lebih dari 60%. Senyawa fenol dan flavonoid yang terkandung pada kedua ekstrak tersebut diduga memiliki peranan penting dalam mendukung aktivitas antioksidan dan sitotoksiknya. Senyawa lainnya, yaitu *pyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)* terdeteksi pada kedua ekstrak bakteri tersebut. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengidentifikasi jenis bakteri tanah ini dan elusidasi senyawa aktif yang dihasilkannya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Sebagian penelitian ini didukung oleh Direktorat Riset dan Inovasi, IPB, melalui Program Penelitian Riset Kolaborasi Nasional 2023-2024 yang diberikan kepada Jepri Agung Priyanto, dan Sebagian lagi didukung oleh Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) dan Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Indonesia melalui program Riset dan Inovasi Indonesia maju (RIIM) gelombang 2 tahun 2022-2024; Nomor Hibah: 82/IL.7/HK/2022 yang diberikan kepada Gian Primahana). Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih atas dukungan yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad S, Alrouji M, Alhajlah S, Alomeir O, Pandey RP, Ashraf MS, Safeeque A & Khan S. 2023. Secondary Metabolite Profiling, Antioxidant, Antidiabetic and Neuroprotective Activity of *Cestrum octurnum* (Night Scented-Jasmine): Use of *In Vitro* and *In Silico* Approach in Determining the Potential Bioactive Compound. *Plants*. **12**: 1-22.
- Andayani DGS, Sukandar U, Sukandar EY & Adnyana IK. 2015. Antibacterial, Antifungal and Anticancer Activity of Five Strains of Soil Microorganisms Isolated from Tangkuban Perahu Mountain by Fermentation. *HAYATI Journal of Biosciences*. **22**(4): 186-190.
- Arivo D, Mubarik NR, Rusmana I, Batubara I. 2023. Antioxidant Activity of Various Solvent Extracts from Endophytic Bacteria Isolated from Girang (*Leea indica*) Leaves. *Biodiversitas*. **24**(1): 415-422.
- Aryal S, Baniya MK, Danekhu K, Kunwar P, Gurung R & Koirala N. 2019. Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants*. **8**(96): 1-12.
- Berdowska I, Zielin'ski B, Fecka I, Kulbacka J, Saczko J & Gamian A. 2013. Cytotoxic Impact of Phenolics from Lamiaceae Species on Human Breast Cancer Cells. *Food Chemistry*. **141**: 1313-1321.
- Borin DB, Castrejón-Arroyo K, Cruz-Nolasco A, Peña-Rico M, Sagrillo MR, Santos RCV, Baco LS, Pérez-Picaso L, Camacho L & Navarro-Mtz AK. 2021. Parasporin A13-2 of *Bacillus thuringiensis* Isolates from the Papaloapan Region (Mexico) Induce a Cytotoxic Effect by Late Apoptosis against Breast Cancer Cells. *Toxins*. **9**:13(7): 476.
- Celladurai R & Vadamalai S. 2022. Antagonistic, Antibiofilm Antioxidant and Anticancer Activity of Secondary Metabolites of Isolated Bacteria from Mangrove Soil. *International Journal of Biosciences*. **21**(6): 378-386.
- Cruz-Ramírez SG, López-Saiz CM, Rosas-Burgos EC, Cinco-Moroyoqui FJ, Velázquez C, Hernández J & Burgos-Hernández A. 2021. Antimutagenic Bis (2-ethylhexyl) Phthalate Isolated from Octopus (*Paraoctopus vulgaris*). *Food Science and Technology*. **41**(2): 314-320.

- Ding T, Yang LJ, Zhang WD & Shen YH. 2019. The Secondary Metabolites of Rare Actinomycetes: Chemistry and Bioactivity. *RSC Advances*. **9**: 21964-21988.
- Dolati M, Tafvizi F, Salehipour M, Movahed TK & Jafari P. 2021. Inhibitory Effects of Probiotic *Bacillus coagulans* against MCF7 Breast Cancer Cells. *Iranian Journal of Microbiology*. **13**(6): 839-847.
- El Gaid HAA, Hashem AEGM, Fahmy AM & El-Rakaiby MT. 2017. Antiviral Activity of Secondary Metabolites Produced by *Streptomyces* Species Isolated from Egyptian Soil. *International Journal of Advance Research*. **5**: 1165-1174.
- Gopi M, Dhayanithi NB, Devi KN, Kumar TTA. 2014. Marine Natural Product, Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro- (C₇H₁₀N₂O₂) of Sntioxidant Properties from *Bacillus* Species at Lakshadweep Archipelago. *Journal of Coastal Life Medicine*. **2**(8): 636-641.
- Gupta C, Prakash D, Gupta S. 2014. Natural Useful Therapeutic Products from Microbes. *Microbiology & Experimentation*. **1**(1): 30-37.
- Hindersah R & Rahmi NM. 2020. Profil Komoditas Kacang Mete dan Jagung di Pulau Muna Provinsi Sulawesi Tenggara. *Agrologia*. **9**(2): 62-70.
- Imrawati, Mus S, Gani SA & Bubua KI. 2017. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) Menggunakan Metode ABTS. *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*. **2**(2): 59-62.
- Irawan C, Putri ID, Sukiman M, Utami A, Ismail, Putri RK, Lisandi A & Pratama AN. 2022. Antioxidant Activity of DPPH, CUPRAC, and FRAP Methods, as Well as Activity of Alpha-Glucosidase Inhibiting Enzymes from *Tinospora crispa* (L.) Stem Ultrasonic Extract. *Pharmacognosy Journal*. **14**(5): 511-520.
- Javed MR, Salman M, Tariq A, Tawab A, Zahoor MK, Naheed S, Shahid M, Ijaz A & Ali H. 2022. The Antibacterial and Larvicidal Potential of Bis-(2-Ethylhexyl) Phthalate from *Lactiplantibacillus plantarum*. *Molecules*. **27** (21): 1-15.
- Kacergius A, Sivojiene D. 2023. Microbial Diversity and Abundance in Loamy Sandy Soil under Renaturalization of Former Arable Land. *Peer Journal of Life & Environment*. **11**: 1-17.
- Kiran GS, Priyadharsini S, Sajayan A, Ravindran A & Selvin J. 2018. An Antibiotic Agent Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione,hexahydro Isolated from A Marine Bacteria *Bacillus tequilensis* MSI45 Effectively Controls Multi-Drug Resistant *Staphylococcus aureus*. *RSC Advances*. **8**: 17837-17846.
- Kiran I, Özşena Ö , Çelik T, İlhanb S, Gürsu BY & Demirci F. 2013. Microbial Transformations of Isophorone by *Alternaria alternata* and *Neurospora crassa*. *Natural Product Communications*. **8**(1): 59-61.
- Leyane TS, Jere SW & Houreld NN. 2022. Oxidative Stress in Ageing and Chronic Degenerative Pathologies: Molecular Mechanisms Involved in Counteracting Oxidative Stress and Chronic Inflammation. *International Journal of Molecular Science*. **23**:1-28.
- Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D & Abete P. 2018. Oxidative Stress, Aging, and Diseases. *Clinical Interventions in Aging*. **13**: 757-772.
- Mongalo N, Soyngbe OS & Makhafola TJ. 2019. Antimicrobial, Cytotoxicity, Anticancer and Antioxidant Activities of *Jatropha zeyheri* Sond. roots (Euphorbiaceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **9**(7): 307-314.
- Mushtaq H, Ganai BA & Jehangir A. 2023. Exploring Soil Bacterial Diversity in Different Micro-Vegetational Habitats of Dachigam National Park in North-Western Himalaya. *Scientific Report*. **13**: 1-18.
- Osama N, Bakeer W, Raslan M, Soliman HA, Abdelmohsen UR & Sebak M. 2022 Anti-Cancer and Antimicrobial Potential of Five Soil *Streptomyces*: A Metabolomics-Based Study. *Royal Society Open Science*. **9**: 1-17.
- Peyrat LA, Tsafantakis N, Georgousaki K, Ouazzani J, Genilloud O, Trougakos IP & Fokialakis N. 2019. Terrestrial Microorganisms: Cell Factories of Bioactive Molecules with Skin Protecting Applications. *Molecules*. **24**(1836): 1-35.
- Prastya ME, Astuti RI, Batubara I, Takagi H & Wahyudi AT. 2020. Natural Extract and Its Fractions Isolated from The Marine Bacterium *Pseudoalteromonas flavipulchra* STILL-33 Have Antioxidant and Anti-

- Aging Activities in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Research*. **20**:1-14.
- Prasty ME, Astuti RI, Batubara I, Wahyudi AT. 2019. Antioxidant, Antiglycation and in Vivo Antiaging Effects of Metabolite Extracts from Marine Sponge-associated Bacteria. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*. **81**(2): 344-353.
- Priyanto JA, Prasty ME, Astuti RI & Kristiana R. 2023. The Antibacterial and Antibiofilm Activities of the Endophytic Bacteria Associated with *Archidendron pauciflorum* against Multidrug-Resistant Strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **195**(11): 6653.
- Priyanto JA, Prasty ME, Primahana G & Randy A, Utami DT. 2023. *Paederia foetida* Linn Leaves-Derived Extract Showed Antioxidant and Cytotoxic Properties Against Breast Carcinoma Cell. *Hayati Journal of Biosciences*. **30**(2): 271-280.
- Rani K. 2017. Role of Antioxidants in Prevention of Diseases. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*. **4**(1): 495-496.
- Sanjenbam P & Kannabiran K. 2016. Bioactivity of Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione,hexahydro-3-(phenylmethyl)- Extracted from *Streptomyces* sp. VITPK9 Isolated from the Salt Spring Habitat of Manipur, India. *Asian Journal of Pharmaceutics*. **10**(4): 265-270.
- Schiller CD, Schneider MR & Von Angerer E. 1990. 3-(Cyclohexenonyl)-4-(4-hydroxyphenyl)-hexanes: Antiandrogenes Derived from the Estrogen Hexestrol. *Archive der Pharmazie. (Weinheim)*. **323**(7): 417-420.
- Ser HL, Palanisamy UD, Yin WF, Malek SNA, Chan KG, Goh BH, & Lee LH. 2015. Presence of Antioxidative Agent, Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro- in Newly Isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov. *Frontiers in Microbiology*. **6**:1-11.
- Żymańczyk-Duda E, Szmigie-Merena B, Brzezińska-Rodak M & Klimek-Ochab M. 2018. Natural antioxidants–properties and possible applications. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*. **5**(4): 251-258.

