

**POTENSI SENYAWA ANTIBAKTERI ISOLAT BLT1 BAKTERI  
ENDOSIMBION CACING TANAH *Lumbricus* sp. TERHADAP BERBAGAI  
BAKTERI PATOGEN SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

**HAYATI**

**H052192003**



**DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2022**

**POTENSI SENYAWA ANTIBAKTERI ISOLAT BLT1 BAKTERI  
ENDOSIMBION CACING TANAH *Lumbricus* sp. TERHADAP BERBAGAI  
BAKTERI PATOGEN SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

*Tesis Ini Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai  
Gelar Magister Program Studi Biologi Departemen Biologi  
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas  
Hasanuddin*

**HAYATI  
H052192003**

**DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2022**

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

POTENSI SENYAWA ANTIBAKTERI ISOLAT BLT1 BAKTERI ENDOSIMBION  
CACING TANAH *Lumbricus* sp. TERHADAP BERBAGAI BAKTERI PATOGEN  
SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO*

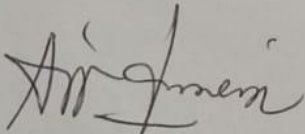
DISUSUN DAN DIAJUKAN OLEH

HAYATI  
NOMOR POKOK: H052192003

Telah dipertahankan dihadapan panitia ujian yang dibentuk dalam rangka penyelesaian studi program magister Departemen Biologi Universitas Hasanuddin pada tanggal 31 januari 2022 dinyatakan memenuhi syarat kelululusan

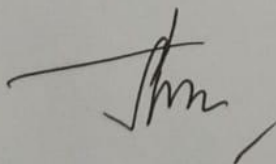
Disetujui oleh:

Ketua Penasehat



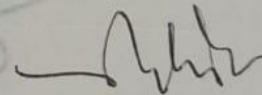
Prof. Dr. Dirayah Rauf Husain, DEA  
NIP. 196005251986012001

Ketua Program Studi Biologi



Dr. Ir. Slamet Santoso, M.Si  
NIP.196207261987021001

sekertaris penasehat



Dr. Nur Haedar, S.Si., M.Si  
NIP. 196801291997022001

Dekan Fakultas MIPA  
Universitas Hasanuddin



Dr. Eng Amiruddin, M.Si  
NIP.1972051519970021002

## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS / DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Hayati  
Nomor Mahasiswa : H052192003  
Program studi : S2 BIOLOGI

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis/disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis/disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 14 Februari 2022

Yang menyatakan



Hayati

## KATA PENGANTAR

Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh Alhamdulillah rabbi 'alamin puji syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT Berkat rahmat dan karuniaya. Tak lupa pula Sholawat serta salam tetap tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang telah membawa kita dari alam jahiliyah ke alam terang benderang. Sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir Tesis dengan judul "POTENSI SENYAWA ANTIBAKTERI ISOLAT BLT1 BAKTERI ENDOSIMBION CACING TANAH (*Lumbricus* sp) TERHADAP BERBAGAI BAKTERI PATOGEN SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO*" yang merupakan salah satu syarat menyelesaikan studi Strata Dua (S2) Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Penulis sangat bersyukur selama menjalankan studi di Departemen Biologi FMIPA Unhas bisa dilalui dengan baik dan maksimal. Tentunya capaian ini tak terlepas dari dukungan dari bapak/ibu dosen, keluarga, serta teman-teman penulis.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa penulisan karya ilmiah seperti tesis ini tidaklah mudah, oleh karena itu tidak tertutup kemungkinan dalam penyusunan tesis ini terdapat kekurangan, sehingga penulis sangat mengharapkan masukan, saran dan kritikan yang bersifat membangun guna kesempurnaan Tesis ini. Proses penyusunan Tesis ini tidak terlepas dari berbagai rintangan, mulai dari pengumpulan literatur, pelaksanaan penelitian,

pengolahan data maupun dalam tahap penulisan. Namun berkat doa, dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, akhirnya penulis dapat melewati kendala-kendala tersebut. Oleh karena itu penulis dengan tulus menghaturkan banyak terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada kedua orang tuaku tercinta Ayahanda Ridwan Bin Site dan Ibunda Rosmini Binti Yusuf yang selalu mengingatkan dan menyemangati saat pengerjaan tesis ini selesai. Begitu banyak suka cita yang penulis rasakan selama menyusun Tesis selain kedua orang tua penulis juga mendapat dukungan dari begitu banyak terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada:

- Rektor Universitas Hasanuddin Ibu Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, MA beserta seluruh staf.
- Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin Bapak Dr. Eng. Amiruddin beserta seluruh staf.
- Ketua Departemen biologi Ibu Dr. Nur Haedar, M.Si beserta staf Departemen Biologi FMIPA UNHAS.
- Ketua Prodi S2 Biologi Bapak Dr. Slamet Santosa, M.Si.
- Tim dosen pembimbing Ibu Prof. Dirayah Rauf Husain, DEA. dan Ibu Dr. Nur Haedar Nawir, M.Si.
- Tim dosen penguji Ibu Dr. Zohra Hasyim, M.Si., Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc. dan Ibu Dr. A. Masnawati, M.Si.

- Penasihat akademik Bapak Dr. Slamet Santosa, M.Si. yang senantiasa mengontrol dan membimbing penulis dari awal sampai akhir masa studi.
- Laboran mikrobiologi Bapak Fuad gani, S.Si
- Saudara Rihuh Wardhani, S.Si.
- Zulfahmi Satria
- Andi Wirdani Pettalolo, S.Si.,
- Teman-teman S2 biologi Alif Rahman Habibi, S.Si., Horti Alam, S.Si., M.Si., dan Nurman, S.Si.

## ABSTRAK

Resistensi terjadi karena adanya mutasi pada beberapa bakteri. Penelitian ini untuk mengkaji senyawa aktif pada bakteri endosimbion *Lumbricus* sp. Isolat BLT1 yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Staphylococcus epidermidis*. Uji *in vitro* dilakukan dengan metode difusi agar dan uji *in vitro* dilakukan dengan metode doking molekuler menggunakan aplikasi PyRx. Uji *in vitro* menunjukkan diameter zona hambat yaitu 10 mm, 14,7 mm dan 17 mm untuk *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Staphylococcus epidermidis* dengan kategori kuat dan bersifat bakteristatik. Uji *in silico* menunjukkan kemampuan senyawa isolat BLT1 untuk berinteraksi dengan protein DNA Gyrase pada bakteri patogen dengan nilai binding affinity untuk senyawa *N-Desmethylselegiline*, *L-Phenylalanine*, *Bis(4-methylbenzylidene)sorbitol*, *N-Butylbenzenesulfonamide* dan *Nicotinamide* terhadap protein target *Escherichia coli* sebesar -5.8, -5.9, -8.1 -6.4 dan -5.2, untuk protein target *Staphylococcus aureus* adalah -6.3, 5.5, -8.2 -5.8 dan -5.1, untuk protein target *Staphylococcus epidermidis* adalah -5.7, -5.9, -6.9 -5.7 dan -5.4. Berdasarkan uji *in vitro* dan uji *in silico* senyawa aktif endosimbion *Lumbricus* sp. Isolat BLT1 berpotensi untuk dijadikan sebagai agen antibiotik.

Kata Kunci: Bakteri Endosimbion, Antibakteri, *in silico*



## ABSTRAC

Resistance occurs because of mutations in some bacteria. This study was to examine the active compounds in the endosymbiont *Lumbricus* sp. BLT1 isolate can inhibit the growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* bacteria. The in vitro test was carried out using the agar diffusion method and the in vitro test was carried out using the molecular docking method using the PyRx application. In vitro test showed the diameter of the inhibition zones were 10 mm, 14.7 mm, and 17 mm for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis* with strong category and bacteriostatic. The in silico test showed the ability of the compound to interact with DNA Gyrase protein in pathogenic bacteria with the binding affinity value for the compound *N-Desmethyl Selegiline*, *L-Phenylalanine*, *Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol*, *N-Butylbenzenesulfonamide*, and *Nicotinamide* to the target protein *Escherichia coli* of -5.8,-5.9, -8.1 -6.4 and -5.2, for *Staphylococcus aureus* target proteins were -6.3, 5.5, -8.2 -5.8 and -5.1, for *Staphylococcus epidermidis* target proteins were -5.7, -5.9, -6.9 -5.7 and -5.4. Based on the *in vitro* test and *in silico* test the active compound of the endosymbiont *Lumbricus* sp. BLT1 isolate has the potential to be used as an antibiotic agent.

Keywords: Endosymbiont bacteria; Antibacterial, *in silico*

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS/DISERTASI .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
BAB I    PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah .....	3
C. Tujuan Penelitian .....	4
D. Manfaat Penelitian .....	4
E. Ruang Lingkup Penelitian .....	4
BAB II    TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Bakteri Endosimbion Cacing Tanah <i>Lumbricus</i> sp .....	5
B. Antibiotik .....	9
C. Mekanisme Kerja Antibiotik.....	11

	D. Deskripsi Umum Bakteri Uji .....	15
	E. Uji Daya Hambat.....	21
	F. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	22
	G. Kromatografi Lapis Tipis-Bioautografi (KLT-B) .....	27
	H. In Silico .....	
	I. Kerangka Konseptual.....	31
	J. Defenisi Operasional.....	32
BAB III	METODE PENELITIAN.....	33
	A. Rancangan Penelitian.....	33
	B. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	33
	C. Alat dan Bahan .....	33
	D. Objek Penelitian.....	34
	E. Pengumpulan Data .....	35
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN .....	43
	A. Bakteri Endosimbiont Isolat BLT1 .....	43
	B. Uji Antagonis Bakteri Endosimbion Isolat BLT1 Terhadap Bakteri Patogen .....	43
	C. Uji Daya Hambat Bakteri Endosimbion Isolat BLT1 Terhadap Bakteri Patogen .....	45
	D. Uji Kromatografi Lapis Tipis Bakteri Endosimbion Isolat BLT1 .....	51
	E. Hasil KLT-B Endosimbion Isolat BLT1 .....	54

	F. Uji <i>In Silico</i> Bakteri Endosimbion Isolat BLT1 Terhadap Bakteri Patogen .....	56
BAB V	PENUTUP .....	66
	A. Kesimpulan .....	66
	B. Saran .....	66
	DAFTAR PUSTAKA.....	67
	LAMPIRAN.....	76

## DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Hasil Uji Daya Hambat Isolat BLT1 Bakteri Endosimbion Cacing Tanah <i>Lumbricus</i> sp .....	47
Tabel 2.	Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	53
Tabel 3.	Hasil Uji <i>In Silico</i> Isolat BLT1 Bakteri Endosimbion Cacing Tanah <i>Lumbricus</i> sp.....	57
Tabel 4.	Nilai <i>Druglikeness</i> berdasarkan <i>Lipinski's Rule of</i> .....	63

## DAFTAR GAMBAR

GAMBAR 1.	Hasil Uji Antagonis Isolat BLT1 .....	44
GAMBAR 2.	Hasil Uji Daya Hambat 24 Jam Isolat BLT1 .....	46
GAMBAR 3.	Hasil Uji Daya Hambat 48 Jam Isolat BLT1 .....	47
GAMBAR 4.	Profil Kromatografi Lapis Tipis Isolat BLT1 .....	52
GAMBAR 5.	Hasil Kromatografi Lapis Tipis-Bioautografi pada Bakteri Patogen .....	54
GAMBAR 6.	Visualisasi Hasil <i>Docking</i> antara Senyawa <i>N-Desmethylselegiline</i> dan Protein Target DNA Gyrase bakteri uji .....	59
GAMBAR 7.	Visualisasi Hasil <i>Docking</i> antara Senyawa <i>L-Phenylalanine</i> dan Protein Target DNA Gyrase bakteri uji .....	59
GAMBAR 8.	Visualisasi Hasil <i>Docking</i> antara Senyawa <i>Bis (4-ethylbenzylidene) sorbitol</i> Protein Target DNA Gyrase bakteri uji .....	60
GAMBAR 9.	Visualisasi Hasil <i>Docking</i> antara Senyawa <i>N-Butylbenzenesulfonamide</i> Protein Target DNA Gyrase bakteri uji .....	60
GAMBAR 10.	Visualisasi Hasil <i>Docking</i> antara Senyawa <i>Nicotinamide</i> Protein Target DNA Gyrase bakteri uji .....	61
GAMBAR 11.	Visualisasi Hasil <i>Docking</i> antara Senyawa <i>Cyprofloxacin</i> Protein Target DNA Gyrase bakteri uji .....	61

## DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1.	Skema Kerja Penelitian.....	76
LAMPIRAN 2.	Uji Antagonis Isolat BLT1 Bakteri Endosimbion Cacing Tanah <i>Lumbricus</i> sp .....	77
LAMPIRAN 3.	Uji Daya Hambat Isolat BLT1 Bakteri Endosimbion Cacing Tanah <i>Lumbricus</i> sp .....	78
LAMPIRAN 4.	Alur Kerja Ekstraksi Isolat BLT1 Bakteri Endosimbion Cacing Tanah <i>Lumbricus</i> sp .....	79
LAMPIRAN 5.	Alur Kerja Kromatografi Lapis Tipis Isolat BLT1 Bakteri Endosimbion Cacing Tanah <i>Lumbricus</i> sp .....	80
LAMPIRAN 6.	Alur Kerja Kromatografi Lapis Tipis-Bioautografi BLT1 Bakteri Endosimbion Cacing Tanah <i>Lumbricus</i> sp .....	81
LAMPIRAN 7.	Alur Kerja <i>In Silico</i> .....	82
LAMPIRAN 8.	Alur Kerja <i>Molecular Docking</i> .....	83
LAMPIRAN 9.	Hasil Uji Lipinski .....	84
LAMPIRAN 10.	Dokumentasi.....	86

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Cacing tanah *Lumbricus* sp. merupakan hewan tingkat rendah yang tidak memiliki tulang belakang (*avertebrata*) dan bertubuh lunak. Hewan ini sangat potensial untuk dikembangkan, karena cacing tanah mengandung senyawa aktif seperti *Lumbricin-I* yang dapat digunakan sebagai bahan obat terutama sebagai antibakteri (Suryani, 2010).

Saat ini, resistensi banyak terjadi karena adanya mutasi pada beberapa bakteri. Kasus resistensi antibiotik adalah hal yang harus menjadi perhatian, dikarenakan hal ini sangat berkaitan dengan pola penggunaan antibiotik dan dapat menyebabkan bakteri patogen bersifat *Multy Drug Resisten* (MDR) yang sangat berpengaruh terhadap Kesehatan. Maka diperlukan peningkatan eksplorasi antibiotik yang dapat mengatasi masalah tersebut (Fishback, 2009).

Telah diketahui bahwa senyawa aktif cacing tanah *Lumbricus* sp. yang digunakan sebagai obat-obatan tidak hanya berasal dari senyawa cacing tersebut. Tetapi, terdapat bakteri yang bersifat endosimbion yang memiliki potensi menghasilkan senyawa antibiotik. (Husain dkk., 2018).

Berdasarkan penelitian sebelumnya bakteri endosimbion hidup di berbagai organisme sebagai sumber antibiotik. Bakteri endosimbion cacing tanah dari genus *Verminephrobacter* (*Betaproteobacteria*) yang hidup di



*nefridia* cacing tanah dapat menghasilkan senyawa antibiotik yang potensial (Lund dkk, 2014). Penelitian yang dilakukan oleh Freeman (2017) menemukan antibiotik *Polytheonamides* dari bakteri endosimbion spons laut (Hug dkk, 2018). Bakteri endosimbion penghasil antibiotik dari cacing tanah *Pheretima* sp. (*Megascolecidae*) juga telah diteliti (Husain dkk, 2018).

Beberapa penemuan dari penelitian sebelumnya, telah dilakukan isolasi bakteri endosimbion cacing tanah. Beberapa spesies cacing tanah dari genus *Lumbricus* diketahui berpotensi menghasilkan zat antibiotik, seperti *Pheretima* sp. selain itu, *Lumbricus* sp. memiliki relung yang sama dengan *Pheretima* sp. Penelitian sebelumnya hanya terfokus pada pemanfaatan *Lumbricus* sp. sebagai sumber senyawa antibiotik melalui ekstraksi (Husain dkk, 2018). Penelitian yang telah dilakukan Husain dkk, (2018) membuktikan bahwa bakteri *Bacillus choshinensis* dan *Bacillus brevis* yang bersimbiosis dengan *Pheretima* sp. (Don dan Pemberton, 1981) memiliki aktivitas antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*.

Uji *in vitro* merupakan uji yang mengacu prosedur perlakuan yang diberikan dalam lingkungan terkendali di luar organisme hidup (Balouiri dan Ibensouba, 2016). Uji *in silico* adalah percobaan atau uji yang dilakukan dengan metode simulasi komputer untuk penemuan senyawa obat baru atau kemajuan baru dalam pengobatan dan terapi (Hardjono, 2013).

Berdasarkan uraian diatas, telah dilakukan penelitian terkait potensi senyawa antibakteri dari Isolat BLT1 bakteri endosimbion cacing tanah *Lumbricus* sp. terhadap beberapa bakteri patogen diantaranya *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* melalui uji *in vitro* dan *in silico*. Penggunaan uji *in vitro* dan *in silico* dilakukan agar hasil dari uji *in vitro* dan uji *in silico* dapat saling mendukung dan memperkuat hasil temuan satu sama lain.

## **B. Rumusan Masalah**

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah senyawa antibakteri dari isolat BLT1 bakteri endosimbion cacing tanah *Lumbricus* sp. dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji berdasarkan uji *in vitro*?
2. Bagaimana senyawa antibakteri isolat BLT1 bakteri endosimbion cacing tanah *Lumbricus* sp. berikatan dengan protein target bakteri patogen berdasarkan uji *in silico*?

### **C. Tujuan Penelitian**

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengkaji senyawa antibakteri isolat BLT1 bakteri endosimbion cacing tanah *Lumbricus* sp. dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji berdasarkan uji *in vitro*.
2. Untuk mengkaji senyawa antibakteri dari isolat BLT1 bakteri endosimbion cacing tanah *Lumbricus* sp sebagai antibiotik berdasarkan uji *in silico*.

### **D. Manfaat Penelitian**

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Diharapkan senyawa antibakteri dari isolat BLT1 bakteri endosimbion cacing tanah *Lumbricus* sp. dapat dimanfaatkan sebagai antibiotik.
2. Diharapkan penelitian ini dapat dijadikan referensi untuk penelitian-penelitian selanjutnya.

### **E. Ruang Lingkup Penelitian**

Penelitian ini menggunakan isolat BLT1 bakteri endosimbion cacing tanah *Lumbricus* sp. sebagai penghasil senyawa antibakteri yang akan diujikan keberbagai bakteri uji *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Bakteri Endosimbion Cacing Tanah *Lumbricus* sp.

Simbiosis telah lama dikenal sebagai sumber inovasi *evolutioner* dan akuisisi simbion dapat memungkinkan inang hewan untuk mengeksploitasi relung yang sebelumnya tidak dapat diakses (Gortz, 2008).

Endosimbiosis adalah jenis simbiosis spesifik di mana satu biasanya mikroba pasangan hidup di dalam inangnya dan mewakili kontak paling intim antara organisme yang berinteraksi. Mitokondria dan kloroplas, misalnya, dihasilkan dari peristiwa endosimbiotik yang memiliki arti penting yang memperpanjang rentang habitat yang dapat diterima untuk kehidupan. Distribusi bakteri intraseluler yang luas di berbagai inang dan habitat laut dan darat membuktikan pentingnya *endosimbiosis* yang berkelanjutan dalam evolusi.

Bakteri memiliki kemampuan yang menarik untuk hidup bersama organisme lain sebagai endosimbion. Endosimbion adalah interaksi antara organisme (inang) dan organisme lain yang hidup di tubuh inang (Casem, 2016). Kedua organisme tersebut dapat berinteraksi mutualisme, komensalisme, parasitisme, atau sebagai patogen (Leung dan Poulin, 2008).

Di antara organisme multisel, *Annelida* sebagai suatu kelompok membentuk asosiasi yang sangat beragam dengan rekan mikroba, termasuk

bakteri yang hidup secara eksklusif di dalam tubuh inang. Mikroba ini telah menarik minat ahli biologi evolusi karena mereka mewakili spektrum yang luas dari strategi evolusi, mulai dari mutualisme obligat hingga parasitisme reproduktif (Buchner 1965; Ishikawa 2003)

Penelitian sebelumnya menemukan filum *Annelida* tidak terkecuali simbiosis kemolitotik dalam annelida laut (misalnya, cacing tabung raksasa laut *Riftia* sp. dan *Oligochaetes* memperoleh energi dari oksidasi senyawa sulfur tereduksi dan memfiksasi CO<sub>2</sub> dan memasok inang hewan mereka dengan karbon tetap. Kerjasama yang lebih jelas diketahui dari annelida pemakan tulang *Osedax* sp, Di mana endosimbion membantu mendegradasi tulang bangkai paus, satu-satunya habitat cacing yang diketahui. Lintah obat *Hirudo* sp., Seperti hewan pemakan darah lainnya, memiliki simbiosis yang diperkirakan menghasilkan vitamin esensial yang hilang dari makanan darah. Selain itu, lintah memiliki sejumlah simbiosis yang fungsinya tidak diketahui di nefridia (organ ekskretoris) (Casem, 2016).

Cacing tanah *Oligochaeta: Lumbricidae* juga telah lama diketahui menyimpan bakteri simbiosis di *nefridia* mereka. Fungsi simbiosis ini, masih belum diketahui, tetapi stabilitas simbiosis selama waktu evolusi menunjukkan bahwa simbiosis menguntungkan tuan rumah. Simbiosis cacing tanah berada di *nefridia* dan oleh karena itu telah diusulkan untuk terlibat dalam daur ulang internal nitrogen di inang. *Nefridia* cacing tanah memainkan peran penting baik dalam ekskresi limbah nitrogen dan osmoregulasi. *Nefridia* ditemukan

berpasangan di setiap segmen cacing dan terdiri dari tabung melingkar yang mengarah dari selom ke luar. Tabung membentuk tiga loop, dan bakteri simbion terletak di ampula di loop kedua, di mana mereka membentuk populasi padat yang melapisi dinding lumen. Simbion membentuk genus *Verminephrobacter* (*Betaproteobacteria*) mereka adalah spesies spesifik dan hadir di hampir semua cacing tanah *lumbricid* (Casem, 2016).

Di bagian dalam tubuh cacing tabung raksasa, terdapat organ bernama *trofosom* yang mengandung banyak bakteri. *Siboglinidae* adalah keluarga dari *Polychaete* cacing annelida. Setelah dewasa, mereka tidak memiliki mulut, usus, dan anus dan sebaliknya telah mengembangkan organ penyimpanan untuk mikroba endosimbion (Southward dkk., 2005; Thornhill dkk., 2008). Organ ini disebut trofosom, diperfusi dengan sistem pembuluh darah untuk memfasilitasi transportasi nutrisi ke dan dari endosimbion (Southward dkk., 2005; Thornhill dkk., 2008).

Beberapa spesies cacing Tanah dari genus *Lumbricus* diketahui berpotensi menghasilkan zat antibiotik, seperti *Pheretima* sp (Husain & Wardhani, 2021) selain itu, *Lumbricus* sp memiliki relung yang sama dengan *Pheretima* sp. Bakteri *Bacillus choshinensis* dan *Bacillus brevis* yang bersimbiosis dengan cacing *Pheretima* sp memiliki aktivitas antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus* (Husain dkk., 2018).

Banyak cara dalam mengekstraksi cacing tanah. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Husain dkk, (2018) sampel cacing tanah *Pheretima* sp. merupakan bakteri lokal diperoleh dari sampah dan dicuci dengan air suling steril sampai tanah dan kotoran menempel di kulit permukaan cacing tanah tersapu bersih. Cacing tanah kemudian dibunuh secara perlahan dengan cara dicuci dengan alkohol 70%. Cacing tanah diukur kemudian dihancurkan menggunakan mortar, dan diencerkan secara serial dengan menambahkan 0,1 mL ke 0,9 mL pengencer hingga maksimum pengenceran  $10^{-6}$ . Sebanyak 1 mL masing-masing pengenceran kemudian diinokulasi pada media NA (*Nutrient Agar*) dengan menggunakan metode casting, kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Setiap koloni yang tumbuh dipilih untuk langkah pemurnian.

Hal yang sama juga dilaporkan oleh Kartikaningsih dkk., (2019) proses ekstraksi cacing tanah *Lumbricus rubellus*, *Eisenia foetida*, *Nereis* sp. yang diperoleh dari tanah organik dan daerah pantai pasir putih yang berlokasi di Malang Jawa Timur. Cacing tersebut dijemur beberapa hari dan digiling hingga menjadi serbuk. Serbuk cacing dicampur dengan etil asetat (Sigma) (1:20, 12 jam, diaduk dengan magnetic stirrer) dan disaring. Filtrat dipekatkan dengan rotary evaporator (IKA RV-10 produksi IKA ASIA, Malaysia, pada tahun 2014) pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit, disimpan dalam botol vial steril.

Berikut adalah klasifikasi dari cacing tanah *Lumbricus* sp.

Kingdom	: Animalia
Filum	: Annelida
Kelas	: Oligochaeta
Ordo	: Haplotaxida
Famili	: Lumbricideae
Genus	: <i>Lumbricus</i>
Spesies	: <i>Lumbricus</i> sp. (Sapto, 2011)

## **B. Antibiotik**

Antibiotik adalah zat kimia yang dihasilkan oleh suatu mikroba yang mempunyai khasiat antimikrobal yang menghambat bahkan mematikan bakteri dan mikroorganisme lainnya. Beberapa antibiotik dapat digunakan untuk mengobati kanker serta penyakit infeksi bakteri, fungi protozoa, dan lain-lain. (Sanchez dan Arnold, 2015).

Antibiotik adalah obat yang digunakan untuk membasmi mikroba, penyebab infeksi pada manusia, harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Artinya, obat tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk mikroba, tetapi relatif tidak toksik untuk hostpes (Irianto, 2006). Tidak semua jenis mikroba dapat dibunuh oleh suatu antibiotika (Endtjang, 2003).

Resistensi bakteri patogen terhadap agen antibiotik merupakan mekanisme alamiah untuk bertahan hidup. Pada saat seseorang terkena



infeksi suatu bakteri patogen kemudian diobati dengan antibiotik, bakteri yang sensitif terhadap agen antibiotik tersebut akan mati atau terhambat pertumbuhannya, sedangkan bakteri yang resisten tidak akan terganggu. Seiring berjalannya waktu, bakteri resisten akan menggantikan bakteri sensitif sehingga terapi dengan antibiotik yang sama tidak dapat digunakan lagi. Proses patogenisitas akibat infeksi tetap berlangsung. Akibatnya, biaya pengobatan akan membengkak dan resiko kematian meningkat (Fischbach dan Walsh, 2009).

Antibiotika yang ideal sebagai obat harus memenuhi syarat-syarat yaitu; (1) Mempunyai kemampuan untuk mematikan atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang luas (*broad spectrum antibiotic*). (2) Tidak menimbulkan terjadinya resistensi dari mikroorganisme patogen. (3) Tidak menimbulkan pengaruh samping (*side effect*) yang buruk pada host, seperti: reaksi alergi, kerusakan syaraf, iritasi lambung, dan sebagainya. (4) Tidak mengganggu keseimbangan flora yang normal dari host seperti flora usus atau flora kulit. Contoh; *Broad spectrum antibiotic* dapat membunuh bakteri-bakteri flora usus yang normal, tetapi tidak bisa membunuh *Monila* (jamur) yang ada di dalam usus, sehingga *Monilla* ini berkembang baik dengan cepat dan menimbulkan penyakit baru, yang lebih berat yang tidak bisa diobati dengan antibiotika (Entjang, 2003).

Antibiotik berdasarkan spektrum kerjanya dibagi menjadi dua yaitu; (1) Antibiotik spektrum luas yaitu Antibiotik yang bekerja terhadap beberapa jenis

mikroorganisme, baik gram positif dan gram negatif atau jenis mikroorganisme lainnya. Biasanya digunakan untuk mengobati penyakit infeksi yang belum diidentifikasi dengan kultur dan isolasi bakteri maupun uji sensitifitas. (2) Antibiotik spektrum sempit yaitu antibiotik yang berpengaruh terhadap gram negatif atau gram positif saja (Lewis, 2013).

Antibiotik berdasarkan daya bunuhnya dibagi menjadi dua yaitu; (1) Antibiotik bakterostatik, Antibiotik ini bekerja dengan menghambat atau mencegah pertumbuhan bakteri, tidak membunuhnya sehingga sangat bergantung pada daya tahan tubuh. Kerjanya menghambat sintesis protein dengan mengikat ribosom. (2) Antibakteri bakterisidal, antibakteri ini bekerja dengan membunuh, secara aktif membasmi bakteri. Digunakan biasanya pada area infeksi dimana imun sistem inang tidak dapat menjangkau secara maksimal. antibiotik tidak maksimal (kasus *endocarditis*, *meningitis*, *osteomyolitis*, *neutropenia*) (Lewis, 2013).

### **C. Mekanisme Kerja Antibiotik**

Banyak cara untuk membunuh mikroorganisme yaitu dengan pemanasan, radiasi serta penggunaan bahan kimia yang kuat seperti asam yang pekat. Namun untuk membunuh secara spesifik tanpa merusak sel dan jaringan pada hospes akan lebih sulit. Berdasarkan formulasi yang dikemukakan oleh Paul Ehrlich (1906) yang diinginkan adalah khemoterapi spesifik dengan prinsip toksisitas selektif.

Menurut Wattimena (1991), suatu antimikroba dikatakan bakteriostatik jika antimikroba tersebut berkhasiat untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji dan tidak mematikan kuman hingga dalam waktu 48 jam daerah hambatan kembali ditumbuhi bakteri, dengan demikian terjadi penurunan diameter hambatan pada bakteri tersebut. Menurut (Cappucino dan Sherman, 1992). Suatu bahan antimikroba dinilai efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji apabila memiliki diameter hambatan  $\geq 14$  mm, sedangkan apabila diameter hambatannya 10-11 mm maka bahan antimikroba tersebut cenderung bersifat kurang efektif dan apabila diameter hambatannya  $\leq 9$  mm maka bahan antimikroba tersebut dinilai tidak efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji.

Antibiotik mempunyai peran vital pada pengobatan penyakit infeksi pada abad ke 20 yaitu sejak ditemukannya penisilin pada era tahun 1920an. Selanjutnya ratusan antibiotik telah diproduksi dan disintesis untuk penggunaan klinik. Banyaknya jumlah serta variasi antibiotik yang ada pada saat ini memberi kesempatan yang lebih luas kepada para klinisi di dalam pemakaiannya. Namun perkembangan ini juga membuat para klinisi sulit untuk menentukan pengobatan penyakit infeksi. Untuk mengatasi hal 3 ini terlebih dahulu perlu diketahui mekanisme kerja obat-obat antimikroba terhadap sel bakteri penyebab infeksi (Brooks dkk, 1998).

## 1. Merusak dinding sel

Bakteri mempunyai dinding sel yang merupakan lapisan luar dan kaku untuk mempertahankan bentuk sel dan mengatur tekanan osmotik di dalam sel. Dinding sel bakteri gram positif mengandung *peptidoglikan* dan teikhoat atau asam teikuronat dengan atau tanpa envelop yang terdiri dari protein dan 4 *polisakarida*, sedangkan dinding sel bakteri gram negatif mengandung *peptidoglikan*, *lipopolisakarida*, *lipoprotein*, *fosfolipid* dan protein. Tempat kerja antibiotik pada dinding sel bakteri adalah lapisan peptidoglikan. Lapisan ini sangat penting dalam mempertahankan kehidupan bakteri dari lingkungan yang *hipotonik*, sehingga kerusakan atau hilangnya lapisan ini akan menyebabkan hilangnya kekuatan dinding sel dan akan mengakibatkan kematian (Neu dan Gootz, 2001).

## 2. Menghambat Sintesis Protein

Mekanisme kerja antibiotik golongan ini belum diketahui secara jelas. Bakteri memiliki ribosom 70S sedangkan mamalia memiliki ribosom 80S. Subunit dari masing-masing tipe ribosom, komposisi kimiawi dan spesifisitas fungsionalnya jelas berbeda sehingga dapat dijelaskan mengapa obat-obat antimikroba dapat menghambat sintesis protein pada ribosom bakteri tanpa menimbulkan efek pada ribosom mamalia. Pada sintesis protein mikroba secara normal, pesan pada mRNA secara simultan dibaca oleh beberapa ribosom yang ada di sepanjang untai RNA yang disebut sebagai polisom (Neu dan Gootz, 2001).

Adanya gangguan sintesis protein akan berakibat sangat fatal karena dapat menyebabkan kode mRNA salah dibaca oleh tRNA, sehingga terbentuk protein abnormal dan non fungsional, antibiotik yang memiliki mekanisme kerja seperti ini mempunyai daya antibakteri sangat kuat (Garima dkk., 2017; O'Rourke dkk., 2019).

### **3. Menghambat Sintesis Asam Nukleat**

Antibiotik yang mempengaruhi sintesis asam nukleat dan protein mempunyai mekanisme kerja yang berbeda diantaranya: mempengaruhi replikasi DNA, mempengaruhi transkripsi, mempengaruhi pembentukan *aminoacyl*-tRNA dan Mempengaruhi translasi (Garima dkk., 2017; O'Rourke dkk., 2019)

Antibiotik menghambat pertumbuhan bakteri melalui pengikatan pada DNA dependent RNA polymerase. Rantai polipeptida dari enzim polimerase melekat pada faktor yang menunjukkan spesifisitas di dalam pengenalan letak promoter dalam proses transkripsi DNA.

Antibiotik berikatan secara nonkovalen dan kuat pada subunit RNA polimerase dan mempengaruhi proses inisiasi secara spesifik sehingga mengakibatkan hambatan pada sintesis RNA bakteri. Resistensi terhadap Antibiotik terjadi karena perubahan pada RNA *polimerase* akibat mutasi kromosomal. Semua kuinolon dan *fluorokuinolon* menghambat sintesis DNA bakteri melalui penghambatan DNA gyrase (Neu dan Gootz, 2001).

#### 4. Antibiotik yang Menghambat Jalur Metabolisme

Penghambatan terhadap sintesis metabolit esensial antara lain dengan adanya komperator menghambat metabolit mikroorganisme, karena struktur yang mirip dengan substrat normal bagi enzim metabolisme. misalnya mekanisme kerja pada antibiotik *sulfonamides* dan *trimethoprim* yang bekerja dengan menghambat tahapan yang berbeda pada jalur metabolisme yang menginisiasi sintesis dari asam folat dan akhirnya menghambat sintesis *koenzim* untuk biosintesis *nukleotida* (Garima dkk., 2017; O'Rourke dkk., 2019).

#### D. Deskripsi Umum Bakteri Uji

##### 1. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus* berasal dari bahasa Yunani, yaitu “*Staphyle*” berarti sekelompok anggur dan “*Coccus*” yang berarti berry. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri berbentuk coccus, gram positif, formasi *staphylae*, mengeluarkan *endospora*, tidak bergerak, tidak mampu membentuk spora, fakultatif *anaerob*, sangat tahan terhadap pengeringan, mati pada suhu 60°C setelah 60 menit. Hampir semua *Staphylococcus aureus* menghasilkan enzim *koagulase*, bersifat *katalase* positif dan *oksidase* negatif (Tong dkk., 2015).

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang menyebabkan penyakit infeksi kulit yang terutama dapat menimbulkan penyakit pada manusia. *Staphylococcus aureus* memiliki dinding sel luar yang

terbuat dari polimer kompleks yang disebut *peptidoglikan*. Bakteri gram positif memiliki lapisan kandungan *lipid* yang rendah yaitu hanya sebesar 1-4 % (Pelczar dan Chan, 2005).

*Staphylococcus aureus* bersifat *anaerob* fakultatif dan dapat tumbuh karena melakukan respirasi *aerob* atau fermentasi yang menghasilkan asam laktat. Diantara semua bakteri yang tidak membentuk spora, *Staphylococcus aureus* termasuk bakteri yang memiliki daya tahan paling kuat (Radja, 2011). Bakteri ini dapat menyebabkan beberapa penyakit yaitu, penyakit kulit seperti impetigo, paronikia, abses, selulitis, dan infeksi kulit. Pada tulang dan sendi dapat menyebabkan osteomyelitis dan arthritis septik, menyebabkan pneumonia pada organ pernafasan, dan menyebabkan endocarditis infeksi pada organ kardiovaskular.

Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu penyebab utama nosocomial akibat luka tindakan operasi dan pemakaian alat-alat perlengkapan perawatan rumah sakit (Radja, 2011). Hampir setiap orang akan mengalami beberapa tipe infeksi *Staphylococcus aureus* sepanjang hidupnya (Chiller dkk., 2001). Bakteri *Staphylococcus aureus* telah lama bermutasi menjadi kebal terhadap berbagai jenis antibiotik sehingga membutuhkan penanganan serius dalam pengendaliannya (Misnadiarly dkk., 2014).

Menurut (Entjang, 2003), *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan penyakit seperti: infeksi pada folikel rambut dan kelenjar keringat, bisul, infeksi pada luka, meningitis, endocarditis, pneumoniae, pyelonephritis,

osteomyelitis, dan pneumoniae. Bakteri ini di rumah sakit sering menimbulkan nosocomial infection pada bayi, pasien luka bakar atau pasien bedah yang sebagian besar disebabkan kontaminasi oleh personil rumah sakit (medis atau paramedis).

Proses infeksi *Staphylococcus aureus* melibatkan lima tahap, yaitu; (1) kolonisasi, (2) lokal infeksi, (3) penyebaran sistemik atau sepsis, (4) infeksi metastasis (5) toksinosis. *Staphylococcus aureus* resistensi terhadap beberapa kelas antibiotik, sehingga menjadikan *Staphylococcus aureus* adalah salah satu bakteri yang berbahaya dan sulit diobati (Tong dkk., 2015).

Berikut adalah klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*:

Kingdom : Bacteria  
Filum : Firmicutes  
Kelas : Bacilli  
Ordo : Bacillales  
Famili : Staphylococcaceae  
Genus : *Staphylococcus*  
Spesies : *Staphylococcus aureus* (ncbi.nlm.nih.gov)

## **2. *Escherichia coli***

Bakteri *Escherichia coli* ditemukan pada tahun 1885 oleh Theodor Escherich. *Escherichia coli* adalah bakteri oportunistik yang banyak ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal. Sifatnya unik karena dapat menyebabkan infeksi primer pada usus, misalnya diare pada anak seperti juga



kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lain di luar usus (Indriati dkk., 2012).

*Escherichia coli* dapat menjadi penyebab penyakit seperti diare dan infeksi saluran kemih. *Escherichia coli* menjadi bersifat patogen apabila mencapai jaringan lain di luar saluran pencernaan, khususnya saluran kemih, saluran empedu, paru-paru, dan selaput otak yang dapat menyebabkan peradangan pada tempat-tempat tersebut (Estrada dkk.,2013).

*Escherichia coli* termasuk bakteri yang susah untuk dibunuh. Hal ini disebabkan karena pada bakteri golongan gram negatif memiliki lapisan dinding sel yang lebih kompleks dibandingkan bakteri gram positif. Sehingga, senyawa antibakteri lebih sulit berdifusi ke dalam membran sel bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif memiliki 3 lapisan yaitu *lipopolisakarida*, protein dan *fosfolipid*. Bakteri ini hanya bisa dibunuh oleh antibiotik, sinar Ultraviolet (UV), atau suhu tinggi >100°C. Suhu tinggi akan merusak protein dalam sel dan membuatnya tidak dapat hidup kembali (Kaper dkk.,2004). Sanitasi yang buruk merupakan penyebab banyaknya kontaminasi bakteri *Escherichia coli* yang dikonsumsi masyarakat (Sasmito, 2007). Pada membran terluar terdapat *porin* yang bersifat *hidrofilik* (Johson dkk., 2012).

*Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif juga termasuk bakteri flora normal pada saluran pencernaan tetapi mempunyai potensi menimbulkan penyakit. *Escherichia coli* menjadi patogen, apabila dipengaruhi oleh faktor-faktor predisposisi, dan jika jumlahnya dalam saluran pencernaan meningkat

seperti mengkonsumsi air maupun makanan yang terkontaminasi atau masuk ke dalam tubuh dengan sistem kekebalan yang rendah seperti pada bayi, anak, lansia dan orang yang sedang sakit. Beberapa strain *Escherichia coli* bersifat patogenik maupun toksigenik sehingga pertumbuhannya harus dihambat (Jawetz dkk., 2013). Penyakit yang paling umum terjadi yang disebabkan oleh *Escherichia coli* adalah diare yang dapat mengakibatkan dehidrasi pada tubuh (Croxen dkk., 2013). Oleh karena itu, eksplorasi antibiotik yang dapat mengendalikan penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini harus ditingkatkan.

Berikut adalah klasifikasi bakteri *Escherichia coli*:

Kingdom : Bacteria  
Filum : Proteobacteria  
Kelas : Gammaproteobacteria  
Ordo : Enterobacteriales  
Famili : Enterobacteriaceae  
Genus : *Escherichia*  
Spesies : *Escherichia Coli* (Ncbi.Nlm.Nih.Gov)

### **3. *Staphylococcus epidermidis***

*Staphylococcus epidermidis* merupakan bakteri gram positif, aerob atau anaerob fakultatif, tidak membentuk spora dan tidak bergerak dan tumbuh cepat pada suhu 37°C. Bakteri ini termasuk flora normal manusia, umumnya terdapat pada flora kulit dan sedikit jumlahnya pada flora mukosa (selaput

lendir). Bakteri ini juga dapat bersifat patogen, infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini biasanya timbul dengan tanda-tanda khas yaitu pembentukan abses.

*Staphylococcus epidermidis* memiliki aktivitas yaitu bakteri ini akan menginfeksi kulit terluar sampai sebasea (Burkhart dkk., 1999). *Staphylococcus epidermidis* menghasilkan *glycocalyx* lendir yang menyebabkan resistensi terhadap fagositosis antibiotik tertentu. Fagositosis salah satu mekanisme pembunuhan bakteri oleh sistem kekebalan tubuh (Otto, 2009).

Resistensi dapat terjadi karena bakteri *Staphylococcus epidermidis* memiliki daya pertahanan untuk menghindari antibiotik yaitu dengan melakukan mutasi pada sisi aktif maupun sisi peningkatan, membentuk protein trans membran yang dikenal sebagai protein efluks dan plasmid yang mengkode gen resisten terhadap antibiotik (Fuda dkk., 2005).

*Staphylococcus epidermidis* termasuk dalam golongan koagulase negatif. Koloni bakteri ini berwarna abu-abu hingga putih terutama pada isolasi primer. Bakteri *Staphylococcus epidermidis* termasuk flora normal pada kulit manusia, saluran respirasi dan gastrointestinal. Bakteri ini bersifat tidak patogen, nonhemolitik, tidak bersifat invasive, tidak membentuk koagulase dan tidak meragi monitol serta bersifat fakultatif. Bakteri *Staphylococcus epidermidis* bertanggung jawab atas penyakit yang menyebar keseluruh tubuh dengan permukaan kulit sebagai habitat alaminya (Nguyen dan Otto, 2017).

Menurut (Vandepitte dkk., 2010) Infeksi bakteri *Staphylococcus epidermidis* sulit untuk disembuhkan, karena bakteri ini dapat tumbuh pada alat

prostese yang dimana bakteri ini dapat menghindar dari sirkulasi sehingga mampu terhindar dari obat antimikroba hampir 75% strain *Staphylococcus epidermidis* resisten terhadap nafsilin. Bakteri ini mampu bertahan dalam lapisan kulit walaupun sudah diberi desinfektan saat pengambilan darah sehingga masuk kedalam aliran darah menjadi batrekimia. Berikut adalah klasifikasi bakteri *Staphylococcus epidermidis*:

Kingdom : Bacteria  
Filum : Firmicutes  
Kelas : Bacilli  
Ordo : Bacillales  
Famili : Staphylococcaceae  
Genus : *Staphylococcus*  
Spesies : *Staphylococcus epidermidis* (ncbi.nlm.nih.gov)

#### **D. Uji Daya Hambat**

Pengujian aktivitas antibakteri yang paling umum digunakan untuk menentukan tingkat sensitifitas bakteri terhadap antibiotik adalah dengan metode difusi agar (Balouiri dkk., 2016).

Metode difusi agar disahkan oleh *Clinical and Laboratory Standards* (CLSI) (Fhilo dan Cordeiro, 2014) metode ini memiliki kelebihan yaitu cepat, mudah dan murah karena tidak memiliki alat khusus. paper disk tersebut berfungsi sebagai tempat menyerapnya senyawa antimikroba. Dimana dalam

teknik ini media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji kemudian dimasukan kertas cakram dalam media dan diisi dengan isolat yang menghasilkan senyawa antibakteri, agen antibakteri berdifusi kedalam agar dan menghambat pertumbuhan bakteri (Balouiri dkk., 2016), adanya zona hambat merupakan indikator adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antibiotik (Jan Hudzicki, 2016).

Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi metode difusi agar yaitu; jenis media yang digunakan, kondisi dan waktu inkubasi, kepadatan inokulum yang akurat, penempatan paper disk yang harus diletakkan dengan kuat pada permukaan agar, serta ketebalan agar dalam cawan petri. Ketebalan agar dalam cawan petri dapat memengaruhi ukuran dari zona hambat yang terbentuk (Balouiri dan Ibnusoiuda, 2016).

#### **E. Kromatografi Lapisan Tipis (KLT)**

Kromatografi lapisan tipis (KLT) merupakan suatu metode pemisahan komponen-komponen atas dasar perbedaan adsorpsi atau partisi oleh fase diam dibawah pengaruh gerakan pelarut pengembang atau pelarut pengembang campur. Pemilihan pelarut pengembang sangat dipengaruhi oleh macam dan polaritas zat-zat kimia yang dipisahkan (Mulya dan Suharman, 1995).

Kromatografi lapisan tipis (KLT) merupakan salah satu bentuk dari kromatografi cair dimana sampel diaplikasikan sebagai noda atau goresan

pada lapisan penjerap tipis yang dilaburkan diatas lempeng plastik, gelas, atau logam. (Fried dan Sherma, 1994).

Beberapa alasan digunakannya metode Kromatografi Lapisan Tipis (KLT) diantaranya penggunaan yang mudah, dapat digunakan secara luas pada sampel yang berbeda, sensitivitasnya tinggi, kecepatan pemisahan dan biaya yang relatif lebih murah. Kromatografi Lapisan Tipis (KLT) dapat digunakan untuk: (1) mengetahui kemurnian suatu zat, (2) memisahkan dan mengidentifikasi komponen dalam suatu campuran, (3) analisis kuantitatif dari satu atau lebih komponen yang terdapat dalam sampel. Dan juga keuntungan daripada pemakaian Kromatografi Lapisan Tipis (KLT) yaitu: (1) solven yang digunakan sedikit, (2) polaritas dan solven dapat dirubah dan diatur dalam beberapa menit, (3) jumlah sampel yang diukur dalam satu kali pengukuran/pengembangan lebih banyak, dalam satu pelat KLT yang berukuran 20x20 cm dapat ditotolkan lebih kurang 20 titik awal ( Touchstone dan Dobbins, 1983).

Menurut (Mulja dan Suharman, 1995), Adapun tahapan-tahapan dalam pelaksanaan Kromatografi Lapisan Tipis (KLT) yaitu:

1. Lapisan Tipis/ Pelat

Silika gel, alumina, tanah diatomae, selulosa, poliamida, resin, penukar ion, sephadeks digunakan sebagai adsorben, dari berbagai adsorben yang sering digunakan adalah silika gel, karena dapat dipakai untuk KLT adsorbs maupun partisi. Tebal lapisan pelat yang digunakan

berkisar antara 0,15 – 2,0 mm, tergantung pada kebutuhan. Untuk analisis umumnya 0,2 mm. untuk maksud preparatif tebal lapisan  $\pm$  2,0 mm.

## 2. Fase Gerak (Eluen)

Pada fase gerak digunakan pelarut yang berderajat kemurnian untuk kromatografi atau pro analisis. Fase gerak sendiri adalah medium angkut dan terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Gerakan ini disebabkan oleh adanya gaya kapiler. Jika diperlukan sistem pelarut multi komponen harus berupa suatu campuran yang sesederhana mungkin dan maksimum terdiri atas tiga komponen. Angka banding campuran dinyatakan dalam bagian volum sedemikian hingga volum totalnya 100.

## 3. Bejana Pemisah

Untuk mencegah penguapan eluen dari permukaan pelat, bejana tersebut harus tertutup rapat, bejana harus dijenuhkan dengan uap eluen dengan cara meletakkan kertas saring di seluruh dinding sebelah dalam bejana dan dibasahi dengan uap eluen. Tingkat kejenuhan bejana dengan eluen mempunyai pengaruh yang nyata pada pemisahan dan letak noda pada kromatogram.

## 4. Jumlah Cuplikan

Jarak antara satu bercak awal dengan bercak yang lain sekurang-kurangnya 10 mm. Penotolan dilakukan dengan menggunakan kapiler berbagai ukuran (1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, atau 10  $\mu$ l) tergantung dari kebutuhan.

## 5. Pengembangan / Eluasi

Pemisahan campuran akibat fase gerak atau pelarut pengembang merambat naik melalui pelat / lapisan tipis. Jarak pengembang normal yakni jarak antara garis awal penotolan dan garis akhir pengembangan adalah 100 mm.

Berdasarkan arah pengembangan, ada beberapa macam pengembangan, yaitu: (1) pengembangan naik (ascending) yaitu arah pengembangan ketas, gerak eluen lambat karena dipengaruhi gaya gravitasi. Cara ini paling umum digunakan, (2) pengembangan turun (descending) yaitu sering digunakan untuk kromatografi kertas, tetapi jarang digunakan untuk kromatografi lapisan, (3) pengembangan ganda yaitu pengembangan yang dilakukan dua kali dengan eluen yang sama atau berbeda. Arah gerakan eluen naik dimana pengembangan pertama arahnya gerak lurus dengan pengembangan kedua. Cara ini digunakan untuk memisahkan zat yang mempunyai harga  $R_f$  yang sangat berdekatan atau menumpuk (Soeharsono, 1989).

## 6. Deteksi Noda

Jika zat yang dipisahkan sudah berwarna, maka noda hasil pemisahan akan nampak dengan sendirinya, tetapi jika zat yang dipisahkan tidak berwarna maka harus dilakukan deteksi noda. Deteksi menggunakan sinar UV gelombang pendek 256 nm atau gelombang panjang 265 nm yang paling sederhana untuk dilakukan. Apabila dengan



sinar UV, noda tidak dapat terdeteksi maka harus dicoba dengan reaksi kimia tertentu sehingga terjadi noda yang berwarna.

## 7. Angka Rf

Angka Rf berkisar antara 0,00 – 1,00 sedangkan harga Rf dikalikan 100 (faktor h), menghasilkan nilai dengan interval 0 – 100. Harga Rf dipengaruhi oleh beberapa faktor, namun jika semua variable dikendalikan, Rf cukup konstan pada kondisi yang disamakan. Tiap komponen mempunyai harga Rf yang khas. Komponen terpisah baik jika harga Rf berbeda minimal 0,1 (Soeharsono, 1989).

Fase diam yang dapat digunakan yaitu silika atau alumina yang dilapiskan pada lempeng kaca atau aluminium. Jika fase diam berupa silika gel maka berifat asam, jika fase diam alumina maka bersifat basa, fase gerak umumnya merupakan pelarut organik atau campuran pelarut organik (Setiawan, 2008). Komponen-komponen kimia bergerak naik mengikuti fase gerak karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan jarak yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya. Pergerakan tersebut tergantung pada sifat fisik, struktur molekul dan kelompok fungsional suatu senyawa (Lade dkk., 2014).

## **F. KLT- B (Kromatografi Lapis Tipis – Bioautografi)**

Metode yang spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kertas yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, antifungi, antibiotik dan antiviral disebut bioautografi. Pada bioautografi ini didasarkan atas efek biologi berupa antibakteri, anti protozoa, antitumor dan lain-lain dari substansi yang diteliti (Djide, 2003; Sartini, 2008). Kromatografi lapis tipis Bioautografi dilakukan untuk menemukan suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan cara melokalisir aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram. Bioautografi dapat dipertimbangkan karena paling efisien untuk mendeteksi komponen anti mikroba, sebab dapat melokalisir aktivitas meskipun dalam senyawa aktif tersebut terdapat dalam bentuk senyawa kompleks dan dapat pula diisolasi langsung dari komponen yang aktif.

## **G. *In Silico***

Metode *in silico* merupakan teknologi eksperimental tingkat tinggi untuk membantu mengungkap komposisi *molekuler* terperinci (Palsson, 2002). Studi *in silico* merupakan percobaan atau uji yang dilakukan dengan metode simulasi computer. Uji *in silico* menjadi metode yang digunakan untuk mengawali penemuan senyawa obat baru dan untuk meningkatkan efesiensi dalam optimasi aktivitas senyawa induk. Kegunaan uji *in silico* yaitu memprediksi,

memberi hipotesis, memberi penemuan baru atau kemajuan baru dalam pengobatan dan terapi (Hardjono, 2013).

Menurut (Geldenhuis, 2006), *in silico* ini cakupannya cukup luas, termasuk diantaranya: (1) Studi *docking* merupakan pembelajaran komputasi pada ligan atau obat yang akan berikatan dengan protein target, (2) Formasi Kimia, aktivitas dan struktur berkorelasi dengan menggunakan sarana statistika, (3) Bioinformatika merupakan target obat berasal dari data genom.

*Docking* adalah suatu upaya untuk memprediksikan konformasi protein atau molekul asam nukleat (DNA atau RNA) dan ligan yang merupakan molekul kecil ke dalam reseptor yang merupakan protein besar (Jensen, 2007). Dengan kata lain, molekuler *docking* mencoba untuk memprediksi struktur antarmolekul yang kompleks terbentuk antara dua atau lebih konstituen molekul dengan memperlihatkan sifat keduanya (Dias, 2008).

Melakukan molekuler *docking* kandidat senyawa obat dengan reseptor yang dipilih merupakan salah satu uji *in silico*. *Docking* merupakan suatu upaya untuk menselaraskan antara ligan yang merupakan molekul kecil kedalam reseptor yang merupakan molekul protein yang besar, dengan memperhatikan sifat keduanya (Jensen, 2007).

Molekuler *docking* merupakan suatu prosedur komputasi untuk memprediksikan konformasi protein atau molekul asam nukleat (DNA atau RNA), dan ligan yang merupakan molekul kecil atau protein lain. Dengan kata lain, molekuler *docking* mencoba untuk memprediksi struktur antarmolekul

yang kompleks terbentuk antara dua atau lebih konstituen molekul (Dias, 2008).

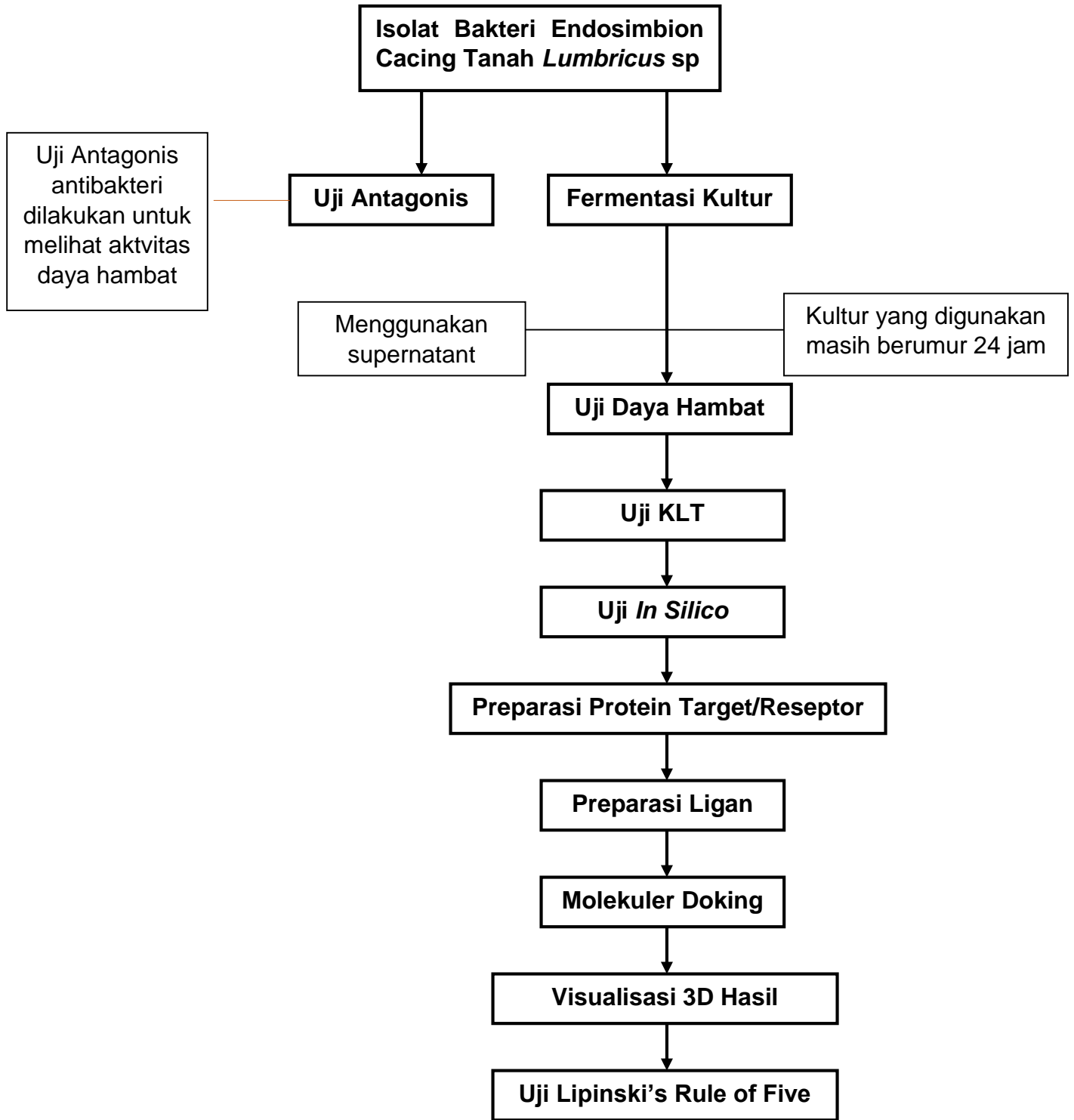
Docking juga menggambarkan suatu proses yang dilakukan oleh dua molekul secara bersamaan dalam ruang tiga dimensi. Molekuler docking telah memberikan kontribusi yang sangat penting dalam proses penemuan obat selama bertahun-tahun. Salah satu motivasi utama dalam penemuan obat adalah mengidentifikasi kedudukan molekul kecil yang inovatif, menunjukkan afinitas pengikatan yang tinggi, dan selektivitas pada target yang bersamaan dengan suatu kelayakan profil ADME (Adsorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi). Merancang obat-obatan memerlukan teknik untuk menentukan dan memprediksi geometri, konformasi, dan sifat elektronik molekul yang kecil (obat dengan berat molekul kurang dari 800) dan makromolekul (reseptor protein) (Krovat, 2005; Nogrady, 2005: 58).

Penambatan molekul dapat didefinisikan sebagai masalah optimasi yang akan menggambarkan orientasi ikatan terbaik dari ligan yang mengikat protein tertentu (Mukesh dan Kumar, 2011). Ligan adalah molekul kecil yang berinteraksi dengan daerah ikatan (binding site) pada protein. Beberapa kemungkinan koformasi dalam ikatan antara ligan dan protein target mungkin terjadi, yang disebut dengan mode ikatan (Onkara dkk, 2013).

Energi ikatan hasil docking merupakan parameter utama untuk mengetahui Kestabilan antara ligan dan protein. Interaksi antara ligan dan reseptor akan cenderung berada pada kondisi energi yang paling rendah.

Energi yang paling rendah menunjukkan bahwa molekul berada pada kondisi yang stabil, sehingga semakin rendah nilai binding affinity maka interaksi ligan reseptor semakin stabil (Mukesh dan Kumar, 2011).

## H. Kerangka Konseptual



## I. Defenisi Operasional

Adapun defenisi operasional pada penelitian ini yaitu sebagai berikut:

1. Isolat BLT1 bakteri endosimbion cacing tanah *Lumbricus* sp. merupakan sampel yang akan digunakan sebagai penghasil senyawa antibakteri.
2. Bakteri patogen *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermis* merupakan bakteri yang digunakan pada uji antagonis, uji daya hambat dan uji KLT
3. Uji *in vitro*: merupakan uji yang berbasis laboratorium diantaranya, peremajaan bakteri, uji antagonis, uji daya hambat dan uji KLT.
4. Uji *in silico*: merupakan uji yang berbasis komputer dan bioinformatika, salah satu metode *in silico* yang akan digunakan adalah *molecular docking*