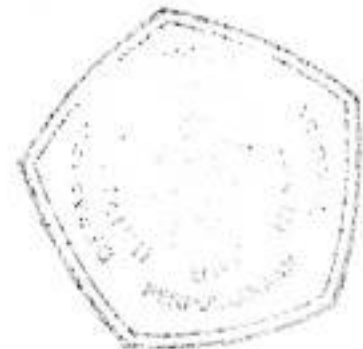


**ANALISIS KLT-BIOAUTOGRAFI SENYAWA
ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL
SPONS (*Callyspongia* sp.)**

OLEH

**ASTUTI ADNAN
93 03 047**



PERPUSTAKAAN PUSAT UNIV. HASANUDDIN	
Tgl. terima	14-3-2000
Asal dari	Fak. MIPA
Renyaknya	ILSATJERS
Harga	HADIAH
No. Inventaris	
No. Klas	

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
UJUNG PANDANG**

1998

SKRIPSI

ASTUTI ADNAN

93 03 047

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

UJUNG PANDANG

1998

**ANALISIS KLT-BIOAUTOGRAFI SENYAWA
ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL
SPONS (*Callyspongia* sp.)**

OLEH

**ASTUTI ADNAN
93 03 047**

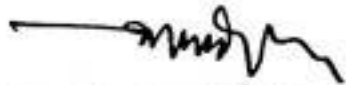
**Skripsi untuk melengkapi tugas dan memenuhi syarat
untuk memperoleh gelar sarjana**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
UJUNG PANDANG**

1998

**ANALISIS KLT-BIOAUTOGRAFI SENYAWA
ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL
SPONS (*Callyspongia* sp.)**

Di setuju oleh :
Pembimbing Utama



Drs. M. Natsir Djide, M.Si

NIP. 130 785 083

Pembimbing Pertama



Drs. Gemini Alam, M.Si

NIP. 131 876 957

Pembimbing Kedua



Drs. Andi Ilham Makhmud, Dipl.Sc.

NIP. 131 570 874

Pada tanggal, 7 Nopember 1998

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah rabbil alamin, puji dan syukur hamba haturkan kehadirat-Nya, karena atas berkat dan Inayah-Nyalah sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang merupakan tugas akhir sebagai mahasiswa pada Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini tidak sedikit rintangan dan hambatan yang penulis hadapi, namun dengan segala daya upaya serta bantuan dari berbagai pihak akhirnya skripsi ini dapat penulis selesaikan.

Untuk itu pertama sekali penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada Bapak Drs. M.Natsir Djide, M.S selaku pembimbing utama, Bapak Drs. Gemini Alam, M.Si selaku pembimbing pertama, serta Bapak Drs. Andi Ilham Makhmud, Dipl. Sc selaku pembimbing kedua yang selalu meluangkan waktu untuk memberikan petunjuk dan menyumbangkan pikiran serta tenaga dalam membimbing penulis mulai saat perencanaan penelitian hingga selesainya penyusunan skripsi ini.

Selanjutnya penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
2. Bapak Ketua/Sekretaris Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
3. Ibu Ermina Pakki, M.Si, selaku penasehat akademik yang banyak memberikan dorongan selama penulis menjalani bangku kuliah.

4. Bapak/Ibu Dosen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, khususnya dosen Jurusan Farmasi.
5. Bapak/Ibu Analisis Laboratorium Jurusan Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
6. Bapak Drs. Natsir Lateng, M.S dan Ibu Dra. Emma Suryati, yang turut menyumbangkan pikiran dan tenaga dalam penyusunan skripsi ini.
7. Rekan-rekan "Prasasti 93" ; Ira, Yoseph, Iin, Aster, Ismi-Rataq, Cully, Samri, Dira, Is-Tina, Aml, Yos, Otto, Hery, Go ,Indar, serta teman-teman lain yang tidak dapat penulis ucapkan satu persatu.
8. Kakak Hanaping,S.Si, Agus Umbara, S.Si, Jenny, Evy dan Wawan (Kelautan) yang banyak memberikan bantuan kepada penulis serta semua pihak yang tidak dapat disebut satu persatu.
9. Teman-teman sepondokan; Kak Upi, Kak Sani, Mbak Ola, Hasni, Dina, Ima, Ipa, Sulfi, Imma, Ani, Ira yang kesemuanya teman hidup penulis dalam menghadapi suka dan duka selama penulis menjalani bangku kuliah.

Rasa hormat dan bakti yang setinggi-tingginya penulis tujukan kepada Ayahanda Drs. Adnan Adam serta Ibunda Sulaeha, yang dengan ikhlas mendidik, memberikan bantuan moril maupun spiritual yang senantiasa diiringi oleh doa restu kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan pendidikan. Kepada kakanda Dra. Mulyati, Drs. Agussalim serta Asrijal, penulis mengucapkan terima kasih atas bantuan dan semangat yang diberikan kepada penulis selama menjalani pendidikan hingga penyelesaian skripsi ini.



Kepada semua pihak yang telah memberikan nasihat, petunjuk, bimbingan serta fasilitas, penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya dan semoga Allah SWT melimpahkan rahmatnya kepada kita semua, Amin.

Imbalan tak ternilai atas semuanya itu hanya mampu penulis kembalikan kepada Allah SWT untuk membalasnya.

Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan, terutama dalam bidang farmasi.

Ujungpandang, September 1998

Penulis

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian daya hambat senyawa dari ekstrak metanol, spons *Callyspongia* sp. terhadap bakteri uji dengan metode KLT-Bioautografi. Maksud dari penelitian ini yaitu menguji kemampuan ekstrak tersebut sebagai antibakteri sedang tujuannya untuk menentukan konsentrasi ekstrak metanol spons *Callyspongia* sp. dalam menghambat bakteri uji dengan metode KLT-Bioautografi. Metode ini meliputi pengamatan kemampuan ekstrak metanol untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji yang dipindahkan dari kromatogram ke medium agar melalui proses difusi. Zone hambatan ditunjukkan oleh adanya noda aktif dari ekstrak yang dipisahkan dengan KLT. Noda aktif tersebut selanjutnya diidentifikasi untuk menentukan golongan senyawa yang aktif terhadap bakteri uji. Hasil pengamatan menunjukkan dari 8 noda yang diperoleh dari pemisahan KLT dengan konsentrasi penotolan yang bervariasi, terdapat 2 noda yang mempunyai aktifitas antibakteri yaitu noda dengan Rf 0,55 dan 0,33. Dari hasil tersebut, tidak terlihat perbedaan nyata daya hambat pada berbagai variasi konsentrasi terhadap bakteri uji *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*. Selanjutnya, identifikasi golongan senyawa antibakteri dari isolat aktif dengan berbagai pereaksi kimia menunjukkan positif golongan terpenoid.

ABSTRACT

The inhibitory effect of methanolic extract of sponge *Callispongia* sp. on the growth of test bacteria by using TLC Bioautography method has been done. The intention of this research was to test the ability of the extract as an antibacterial compound and the aim was to decide which concentration of the extract had inhibitory effect on the growth of test bacteria by using TLC-Bioautography method. This method including observation on the ability of extract to inhibit the growth of test bacteria whereby was transferred from the TLC-chromatogram to an inoculated agar media through a diffusion process. Inhibitory zone was indicated by active spots from isolation extract by thin layer chromatography. The active spots was then continues to be identified it is chemical compound . The result was showed only two active spots of eight, which performed by TLC isolation method with various concentration. The Rf of active spots were 0,55 and 0,33. From the result, there is no highly significant inhibitory effect with various concentration to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. Chemical identification of active compound were done by chemical reagent which showed positive as terpenoid.



DAFTAR ISI

HALAMAN

UCAPAN TERIMA KASIH	iv
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II POLA PENELITIAN	4
BAB III TINJAUAN PUSTAKA	7
III.1 Uraian Hewan	7
III.1.1 Klasifikasi Hewan	7
III.1.2 Morfologi Hewan	7
III.2 Ekstraksi Bahan Alam	9
III.2.1 Ekstraksi	9
III.2.2 Ekstraksi Secara Maserasi	9
III.3 Metode Pemisahan dan Isolasi	9
III.3.1 Kromatografi Lapis Tipis	9
III.3.2 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif	10
III.4 Uraian Metode Bioautografi	11

iii.5 Tinjauan Mikrobiologis	15
iii.5.1 Klasifikasi Bakteri	15
iii.5.2 Mekanisme Anti Mikroba	16
BAB IV PELAKSANAAN PENELITIAN	17
IV.1 Alat dan Bahan	17
IV.1.1 Alat-alat Yang Digunakan	17
IV.1.2 Bahan-Bahan Yang Digunakan	18
IV. 2 Pengambilan dan Pengolahan Sampel	19
IV.2.1 Pengambilan Sampel	19
IV.2.2 Pengolahan Sampel	20
IV.3 Ekstraksi Sampel	20
IV.4 Penyiapan Alat dan Bahan	20
IV.4.1 Sterilisasi Alat	20
IV.4.2 Pembuatan Medium	21
IV.4.3 Peremajaan Bakteri Uji	21
IV.4.4 Pembuatan Suspensi Bakteri	22
IV.5 Pendeteksian secara KLT-Bioautografi	22
IV.5.1 Pemisahan Senyawa Secara Kromatografi Lapis Tipis	22
IV.5.2 Pengujian secara Bioautografi	23
IV.6 Isolasi Senyawa Antibakteri	23
IV.7 Identifikasi Senyawa Antibakteri	24
IV.7.1 Identifikasi Terpenoid	24
IV.7.2 Identifikasi Steroid	24
IV.7.3 Identifikasi Aldehida dan Keton	25
IV.7.4 Identifikasi Asam Amino	25

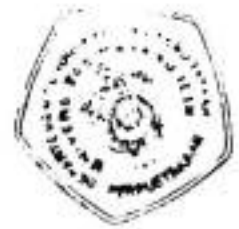
IV.7.5 Identifikasi Saponin	25
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	27
V.1 Hasil Penelitian	27
V.2 Pembahasan.....	29
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
VI.1 Kesimpulan	34
VI.2 Saran.....	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN.....	38
GAMBAR.....	40
TABEL.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

JUDUL	HALAMAN
SKEMA KERJA.....	38
KOMPOSISI MEDIUM	39

DAFTAR GAMBAR

JUDUL	HALAMAN
1. Kromatogram Lapis Tipis dengan Penampak Noda Sinar UV 366 nm.....	40
2. Kromatogram Lapis Tipis dengan Penampak Noda H ₂ SO ₄ 10%.....	41
3. Bioautogram Ekstrak dengan bakteri uji <i>Bacillus subtilis</i>	42
4. Bioautogram Ekstrak dengan bakteri uji <i>Escherichia coli</i>	43
5. Bioautogram Isolat Ekstrak dengan bakteri uji <i>Escherichia coli</i>	44
6. Kromatogram Lapis Tipis Isolat Ekstrak dengan pereaksi Antimon (III) Klorida dan Vanilin-Asam Sulfat	45
7. Kromatogram Lapis Tipis Isolat Ekstrak dengan pereaksi Lieberman-Burchard dan Asam Perklorat	46
8. Kromatogram Lapis Tipis Isolat Ekstrak dengan pereaksi 2,4-dinitrofenilhidrazin	47
9. Morfologi Spons (<i>Callyspongia</i> sp.).....	48



DAFTAR TABEL

JUDUL	HALAMAN
1. Nilai Rf Kromatogram Lapis Tipis dengan Penampak Noda Sinar UV 366 nm	49
2. Nilai Rf Kromatogram Lapis Tipis dengan Penampak Noda H ₂ SO ₄ 10%	50
3. Hasil Reaksi Identifikasi Isolat Ekstrak dengan Pereaksi kimia	51



BAB I PENDAHULUAN

Seiring dengan kecenderungan perubahan pola penyakit yang ada, maka usaha penemuan obat-obat baru terus dilakukan dan saat ini penelitian cenderung dikembangkan ke laut karena sebagian besar sumber daya alamnya belum dieksploitasi (1).

Empat perlima jumlah organisme yang ada didunia ini terdapat dilaut yang antara lain terdiri dari ikan, spons, karang lunak, ekinodermata, ascidian dan tunicates. Beberapa jenis organisme tertentu merupakan sumber potensial bahan alam. Selain itu ada juga jenis organisme tertentu yang menghasilkan toksin yang biasa disebut marIntoksin, dan karena aktifitas farmakologinya sehingga toksin tersebut mempunyai prospek untuk dimanfaatkan dalam bidang pengobatan. Beberapa peneliti melaporkan aktifitas substansi dari laut antara lain berkhasiat sebagai antimikroba, antelmintika, antivirus-antihiv, antikanker, dan antiinflamasi (2).

Salah satu jenis organisme laut yang memiliki biotoksin yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri yaitu spons merupakan biota laut yang termasuk ke dalam golongan invertebrata yang hidup pada ekosistem terumbu karang dimana aktifitas biotoksin terhadap bakteri yang menurut Suryati.E, dkk terbukti lebih baik dibanding antibiotika komersial yang banyak digunakan saat ini (3).

Pengembangan biotoksin dari spons untuk bakterisida menunjukkan prospek yang cukup cerah, karena jika terurai tidak akan memberikan dampak negatif terhadap lingkungan perairan yang sedang dibudidayakan. Berbeda dengan

Antibiotika dari bahan kimia yang digunakan saat ini, selain dapat terakumulasi dan menimbulkan resistensi, zat kimia tersebut juga bisa menghilangkan beberapa spesies mikroba yang sangat berperan dalam proses biodegrasi bahan organik pada lingkungan (4).

Seiring dengan perkembangan penelitian senyawa-senyawa antibiok baru, kebutuhan akan metode pendeteksian yang cepat dan efisien merupakan aspek yang sangat penting dalam proses penemuan senyawa aktif. Kompleksnya komponen kimia dari ekstrak tanaman dan biota laut telah memacu berkembangnya usaha isolasi senyawa-senyawa antibakteri dari ekstrak tersebut (5).

Dalam rangka pengembangan dan pemanfaatan spons berbagai bahan alam untuk pengobatan, maka dilakukan penelitian dengan menggunakan suatu metode untuk melokalisir senyawa aktif antibakteri pada kromatogram-KLT dari ekstrak metanol spons *Callyspongia* sp. Metode tersebut dikenal dengan metode KLT-Bioautografi, yang dilaksanakan berdasarkan atas teknik difusi agar, dimana senyawa antibakteri dari lempeng KLT diinokulasikan pada medium agar yang berisi suspensi bakteri uji. Noda pada KLT yang memberikan aktifitas antibakteri, selanjutnya dianalisis golongan senyawa kimia yang dikandungnya dengan menggunakan beberapa pereaksi kimia dengan cara penyemprotan yang akan memberikan warna spesifik (5).

Berdasarkan uraian tersebut di atas, penelitian ini dimaksudkan untuk skrining bahan alam dari biota laut yang meliputi pengujian kemampuan ekstrak metanol spons *Callyspongia* sp. sebagai antibakteri. Sedangkan tujuannya untuk menentukan konsentrasi ekstrak metanol spons *Callyspongia* sp. dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus Subtilis* dan *Escherichia Coli* dengan

metode KLT – Bioautografi serta mengidentifikasi golongan komponen kimia dari senyawa yang bersifat antibakteri tersebut.

Diharapkan dari hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai informasi awal untuk isolasi dan elusidasi struktur senyawa antibakteri dan hubungan struktur aktifitasnya dalam pengembangan bahan obat alam dari laut.

BAB II POLA PENELITIAN

II.1 Alat dan Bahan

Alat-alat dan bahan-bahan yang akan digunakan disiapkan sesuai kebutuhan penelitian.

II.2 Pengambilan dan Pengolahan Sampel

II.2.1 Pengambilan Sampel

Spons *Callyspongia* sp. diambil dari perairan pantai utara pulau Barrang Lompo Sulawesi Selatan.

II.2.2 Pengolahan Sampel

Bahan dibersihkan, di potong-potong kecil dan dimasukkan ke dalam toples yang berisi etanol untuk mengawetkan selama transportasi.

II.3 Ekstraksi Sampel

Etanol diuapkan dari sampel, kemudian sampel diekstraksi dengan pelarut metanol secara maserasi.

II.4 Penyiapan Alat dan Bahan

II.4.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan disterilkan sesuai petunjuk buku-buku resmi.

II.4.2 Pembuatan Medium

Medium Nutrien Agar dan Glukose Nutrien Agar dibuat sesuai kebutuhan untuk digunakan sebagai media pembiakan bakteri uji dan Pengujian secara KLT-Bioautografi.



II.4.3 Peremajaan Bakteri Uji

Biakan murni bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* diremajakan pada medium Nutrien Agar miring kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

II.4.4 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri yang telah diremajakan dibuat dalam bentuk suspensi NaCl 0,9% steril dan diukur transmittan pada 25%T.

II.5 Pendeteksian secara KLT-Bioautografi

II.5.1 Pemisahan Secara Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak metanol ditotolkan pada lempeng kromatografi lapis tipis dan dielusi dengan menggunakan cairan pengelusi yang cocok dan noda yang diperoleh diberi tanda pada lempeng KLT.

II.5.2 Pengujian secara Bioautografi

Penentuan noda yang mempunyai aktifitas antibakteri dengan metode Pengujian secara KLT-Bioautografi dengan menggunakan suspensi bakteri uji yang telah disiapkan.

II.6 Isolasi Senyawa Antibakteri

Isolasi senyawa aktif secara kromatografi lapis tipis preparatif dan pengujian bioautografi kembali isolat senyawa aktif antibakteri.

II.7 Identifikasi Senyawa Antibakteri

Identifikasi senyawa antibakteri hasil uji bioautografi menggunakan berbagai pereaksi kimia yang dapat memberikan warna spesifik .



II.8 Pembahasan

Pembahasan dilakukan dengan melihat hasil identifikasi dan dibandingkan dengan literatur.

II.9 Pengambilan Kesimpulan

Kesimpulan diambil berdasarkan hasil identifikasi dan pembahasan.

BAB III TINJAUAN PUSTAKA

III.1 Uraian Hewan

III.1.1 Klasifikasi Hewan (4,6,7)

Dunia	: Animalia
Divisio	: Porifera
Kelas	: Demospongiae
Anak kelas	: Ceractinomorpha
Bangsa	: Haplascleridae
Suku	: Callysponginidae
Marga	: Callyspongia
Spesies	: <i>Callyspongia</i> sp.

III.1.2 Morfologi Hewan

Spons adalah binatang multiselular yang sederhana, tidak dapat berpindah, dan sering dalam bentuk seperti tumbuhan. Perbedaan dari jenisnya adalah mempunyai variasi kulit, bentuk, globular, bercabang-cabang atau tidak beraturan, dan mempunyai diameter sekitar 1 mm sampai 1,8 mm (6 kaki). Berwarna abu-abu atau merah tua kekuning-kuningan dan yang lainnya berwarna merah cerah, kuning, biru atau hitam. Semua spons hidup dalam air dan melekat pada batu, kerangka atau benda padat lainnya. Sebagian besar jenisnya hidup di laut mulai dari garis pasang sampai kedalaman 7,3 km (4,5mil) tetapi ada satu famili tersebar luas di air tawar (8).

Spons mempunyai semacam perisai yang berupa susunan spikula yang berbentuk seperti duri atau jarum dengan ujung runcing. Spikula ini terbentuk dari senyawa silikat dan kalsium karbonat (4).

Spons hidup memanfaatkan makanan disekelilingnya dengan cara mengisap dan menyaring sehingga dikategorikan sebagai filter feeder (4).

Sekitar 5000 jenis spons dan terbagi dalam 4 kelas yaitu : kelas Calcarea, Hexactinellida, Demospongiae dan Sclerospongiae. Sebagian besar jenis spons adalah di kelas Demospongiae meliputi 95% tersebar mulai dari air dangkal sampai yang sangat dalam. Salah satu jenis dari kelas Demospongiae yaitu *Callyspongia* sp. (6).

Callyspongia sp. merupakan hewan berpori yang berwarna merah muda. Bentuknya seperti tabung silinder berlubang bulat sampai oval dengan tinggi mencapai 30 cm. Tunas baru biasanya tumbuh pada cabang besar. Spikula spons ini tersusun dari silikat dioksida, protein, dan spongin, atau campuran silikat dan spongin. Jenis spons ini banyak dijumpai di perairan intertidal yang ditumbuhi *Acrophora* (4).

Bioaktif spons mampu menghambat pertumbuhan bakteri karena umumnya mengandung peptida, terpenoid, glikosida, saponin dan steroid, amina, asam fenolat, skualen dan turunannya yang dihasilkan dari proses metabolit sekunder biota laut ini (3,9).

III.2 Ekstraksi Bahan Alam

III.2.1 Ekstraksi (10,11)

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi ini didasarkan atas perpindahan massa komponen aktif yang ada dalam simplisia ke dalam pelarut. Setelah pelarut menembus lapisan permukaan dinding sel, zat aktif yang terlarut berdifusi karena terjadinya perbedaan konsentrasi di luar dan di dalam sel, dan proses ini berulang sampai terjadi keseimbangan di dalam dan di luar sel.

III.2.2 Ekstraksi secara Maserasi (11,12)

Metode maserasi merupakan cara penyarian sederhana yang diperuntukkan untuk bahan alam yang tidak tahan pemanasan dan mempunyai tekstur yang lunak.

Mekanisme kerja dari metode maserasi ini adalah cairan penyarian akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan diluar sel maka larutan yang pekat akan berdifusi keluar sel. Peristiwa itu berulang sehingga terjadi keseimbangan didalam dan diluar sel.

III.3 Metode Pemisahan dan Isolasi

III.3.1 Kromatografi Lapis Tipis (13,14,15)

Kromatografi lapis tipis adalah salah satu analisis yang digunakan untuk memisahkan komponen secara cepat berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi. Adsorben merupakan serbuk halus yang dibuat secara merata dan

tipis (0,1 - 0,2 mm) diatas lempeng kaca sebagai fase diam dan cairan pengembang sebagai fase gerak. Karena adanya perbedaan daya serap adsorben terhadap komponen, maka komponen akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda. Hal ini yang menyebabkan terjadinya pemisahan. Perbandingan antara jarak yang ditempuh komponen dengan jarak yang ditempuh cairan pengembang (pengelusi) disebut Rf.

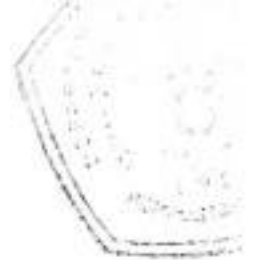
$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh komponen}}{\text{Jarak yang ditempuh cairan pengelusi}}$$

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi nilai Rf adalah :

1. Struktur kimia dari senyawa yang dipisahkan.
2. Derajat keaktifan adsorben
3. Kemurnian dan konsentrasi fase gerak
4. Kejenuhan chamber
5. Jumlah cuplikan yang digunakan

III.3.2 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (15,16)

Salah satu metode pemisahan yang memerlukan pembiayaan paling murah dan memakai peralatan sederhana ialah kromatografi lapis tipis preparatif. Pemisahan komponen kimia dengan metode kromatografi lapis tipis preparatif pada dasarnya sama dengan kromatografi lapis tipis biasa yaitu prinsip adsorpsi dan partisi. Namun perbedaan yang nyata adalah pada KLT preparatif menggunakan lempeng yang besar berukuran 20 x 20 cm dan sampel ditotolkan berupa garis pada salah satu sisi lempeng, sehingga komponen kimia yang telah terelusi akan terpisah membentuk pita-pita berupa garis horisontal



yang tampak dibawah sinar UV. Pita-pita yang terbentuk ditandai dengan pensil, kemudian dikeruk dan ditampung sebagai fraksi-fraksi.

III.3 Uraian Metode Bioautografi

Menurut Betina (1972) , Bioautografi adalah metode pendeteksian untuk penemuan senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan melokalisir aktivitas antimikroba pada kromatogram. Metode ini didasarkan atas efek biologi (antibakteri, antiprotozoa, antitumor, dll) dari substansi yang diteliti. Dibandingkan dengan kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis (KLT) mempunyai kekuatan pemisahan yang lebih besar dan lebih cepat dari kedua teknik tersebut. Ciri khas dari prosedur bioautografi adalah di dasarkan atas teknik difusi agar, dimana senyawa antibakteri dipindahkan dari lapisan kromatografi ke medium agar yang telah diinokulasi. Zone inhibisi ditampakkan oleh aktivitas dehidrogenase dari pereaksi pendeteksi. Prosedur ini mempunyai beberapa kekurangan dan kemudian diperbaiki dengan melakukan modifikasi tertentu (17,18).

Bioautografi dapat dipertimbangkan paling efisien untuk mendeteksi komponen antimikroba sebab dapat melokalisir aktivitas meskipun dalam senyawa kompleks dan dapat langsung diisolasi dari komponen yang aktif (19).

Bioautografi dapat dibagi dalam tiga kelompok yaitu (17,18,19) :

- a) Bioautografi langsung, dimana mikroorganismenya tumbuh secara langsung diatas lempeng kromatografi lapis tipis.
- b) Bioautografi kontak, dimana senyawa antimikroba dipindahkan dari lempeng KLT ke medium agar yang telah diinokulasi melalui kontak langsung.
- c) Bioautografi pencelupan, dimana medium agar telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri dituang diatas lempeng KLT.

A. Bioautografi Langsung

Prinsip kerja dari metode ini yaitu suspensi mikroorganisme dalam medium cair disemprotkan pada permukaan kromatogram yang telah dihilangkan sisa eluen yang menempel pada lempeng. Kemudian diinkubasi pada suhu yang cocok.

Kromatogram di keringkan secara hati-hati dengan "hair dryer" untuk menghilangkan sisa eluen. Senyawa dideteksi pada UV 254 nm dan 366 nm. Suspensi bakteri sebanyak 5-6 ml disebarakan diatas lempeng KLT (20 x 20 cm) menggunakan alat pemuter ("roller") yang dilapisi dengan kertas kromatografi (Whatman, Clijton). Lempeng KLT diinkubasi semalam dalam boks plastik dengan dilapisi kertas, kemudian disemprot dengan 5 ml larutan cair TTC (20 mg/ml), atau INT(5 mg/ml), INTB (5mg/ml) serta MTT(2,5 mg/ml), dan diinkubasi kembali selama 4 jam pada 37°C.

B. Bioautografi Kontak

Metode ini didasarkan atas difusi dari senyawa yang telah dipisahkan dengan Kromatografi Lapis Tipis atau Kromatografi Kertas. Lempeng kromatografi ini ditempatkan diatas permukaan medium Nutrien Agar yang telah diinokulasikan dengan mikroorganisme yang sensitif terhadap senyawa antimikroba yang dianalisa. Setelah 15-30 menit, lempeng kromatografi kemudian dipindahkan dari permukaan medium. Senyawa antibakteri yang telah berdifusi dari kromatogram ke dalam medium agar akan menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi pada waktu dan temperatur yang tepat hingga noda yang menghambat mikroorganisme tampak pada permukaan.



Zone ini dapat lebih jelas tampak dengan penggunaan indikator aktivitas dehidrogenase.

C. Bioautografi Pencelupan

Dalam metode ini, lempeng kromatografi yang telah dielusi diletakkan dalam cawan petri sehingga permukaan tertutupi oleh medium agar yang berfungsi sebagai "base layer". Setelah medium agar memadat, selanjutnya dituang medium agar yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme yang berfungsi sebagai "seed layer", dan diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai.

Beberapa modifikasi metode KLT-Bioautografi telah dilakukan. Nicolous dkk menuangkan medium agar berisi 2,3,5-trifeniltetrazoliumklorida (TTC) dan ditanami dengan organisme yang diuji diatas kromatogram. Sedangkan Kline dan Golab menyemprotkan medium agar secukupnya pada lempeng KLT dan segera dipadatkan. Medium agar yang lain didinginkan pada 48°C dan diinokulasi dengan organisme yang diuji, dituangkan langsung pada permukaan lempeng yang telah disiapkan. Zone inhibisi diidentifikasi setelah diinkubasi, dengan melihat langsung pada lempeng KLT yang tidak tembus cahaya. Bickel dkk, menindihkan lempeng kromatografi pada medium agar pembedahan (17).

Beberapa prosedur yang dikemukakan diatas masing-masing mempunyai kelebihan dan kekurangan. Menurut Horman dan Fuchs, bioautografi kontak merupakan tipe yang paling sering digunakan. Masalah perbedaan difusi dari senyawa-senyawa dari kromatogram ke plat agar dipermudah dengan deteksi bioautografi secara langsung, tetapi metode ini membutuhkan peralatan mikrobiologi yang cukup rumit. Sedangkan Land dan Lyon, menyatakan

bioautografi secara langsung, untuk aktifitas antibakteri sangat sensitif dan melokalisir senyawa-senyawa yang aktif, tetapi mempunyai kekurangan karena keterbatasan mikroorganisme yang dapat tumbuh secara langsung diatas lapisan kromatografi. ketersebaran bakteri pada lempeng dan memungkinkan terjadi kontaminasi. Sedang metode bioautografi pencelupan merupakan metode yang paling tepat sebab tidak dipengaruhi oleh kemungkinan adanya kontaminasi (18,19).

Bacillus subtilis dan *Escherichia coli* dipilih sebagai bakteri uji yang mewakili bakteri gram positif dan gram negatif. Untuk memperoleh kondisi optimal pertumbuhan bakteri pada lempeng silika gel, berbagai parameter dapat dimodifikasi, seperti volume suspensi bakteri, larutan pereaksi, periode inkubasi untuk pertumbuhan bakteri dan reaksi enzimatik (5).

Kecocokan fase diam selain silika gel juga telah diselidiki. *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* dapat tumbuh pada lempeng yang berlapis selulosa, tetapi pada poliamida 11 dan aluminium oksida netral kurang baik pertumbuhannya. Mengenai pemilihan eluen, diutamakan menggunakan pelarut dengan volatilitas rendah, seperti n-butanol, dapat digunakan jika sebelum pengujian dapat dihilangkan secara sempurna dari lempeng kromatografi. Tetapi dalam beberapa hal adanya asam atau basa seperti asam asetat yang masih tertinggal pada lempeng setelah pengeringan akan menghambat pertumbuhan bakteri (5).

Pada bioautografi langsung dan bioautografi pencelupan, zone penghambatan dapat dilihat secara langsung pada lempeng KLT. Perbandingan kromatogram yang dilakukan pada kondisi yang sama dapat juga digunakan

pereaksi kromagenik yang sesuai dan akan memberikan informasi berguna tentang sifat alami dari bahan aktif (19).

III.4 Tinjauan Mikrobiologis

III.4.1. Klasifikasi bakteri (20,21)

1. *Escherichia coli*

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Enterobacteriaceae
Marga	: <i>Escherichia</i>
Jenis	: <i>Escherichia coli</i>

Sifat dan morfologinya :

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif, bentuk batang, besarnya 0,5 sampai 3 u, tidak berspora, bergerak dengan flagel pentrik atau tidak bergerak. Hidup secara aerob dan fakultatif aerob serta dapat hidup dalam media buatan. Menghasilkan asam dan gas dari gula. Habitat secara normal dapat dijumpai dalam usus manusia maupun pada beberapa binatang bertulang belakang.

2. *Bacillus subtilis*

Divisio	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Familia	: Bacillaceae

Genus : *Bacillus*

Species : *Bacillus subtilis*

Sifat dan morfologi :

Yang termasuk dalam genus *Bacillus* adalah bakteri berbentuk batang besar, gram positif yang berbentuk rantai. Sel-sel berukuran 1 x 3,4 u, mempunyai ujung-ujung berbentuk empat persegi; spora terletak pada tengah basil yang tidak bergerak. *Bacillus subtilis* dan kebanyakan dari genus *Bacillus* lainnya adalah organisme saprofitik yang lazim terdapat dalam tanah, air dan udara serta tumbuh-tumbuhan.

III.4.2 Mekanisme Kerja Antimikroba (22)

Antibakteri merupakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) atau bahan yang dapat membunuh bakteri (bakterisida). Mekanisme kerja dari antimikroba antara lain :

1. Menghambat Metabolisme Sel Mikroba
2. Menghambat Sintesis Dinding Sel Mikroba
3. Mengganggu Keutuhan Membran Sel Mikroba
4. Mengganggu Sintesis Protein Sel Mikroba
5. Menghambat Sintesis Asam Nukleat Sel Mikroba.

BAB IV
PELAKSANAAN PENELITIAN

IV.1 Alat dan Bahan

IV.1.1 Alat-alat yang digunakan

1. Bejana kromatografi
2. Bejana maserasi
3. Botol Penyemprot
4. Cawan petri
5. Erlenmeyer 200 ml, 500 ml (Pyrex)
6. Inkubator (Memmert)
7. Laminar Air Flow (Envirco)
8. Lampu UV 366 nm
9. Lempeng kaca
10. Lempeng TLC 60 F₂₅₄ (E.Merck)
11. Mikropipet 2 μ l, 4 μ l, 6 μ l, 8 μ l
12. Otoklaf (Portable)
13. Oven (Elektrolux)
14. Pipa kapiler
15. Rotavapor
16. Spektrofotometer UV
17. Spoit
18. Vial

- | | |
|-----------------------------|------------|
| 19. Gelas piala | (Pyrex) |
| 20. Gelas Ukur 10 ml, 50 ml | (Pyrex) |
| 21. Timbangan gram | (Ohaus) |
| 22. Timbangan analitik | (Sartoris) |
| 23. Corong gelas | |
| 24. Pipet tetes | |
| 25. Kompor listrik | |
| 26. Pinset | |
| 27. Tabung reaksi | |
| 28. Gunting | |

IV.1.2 Bahan-bahan yang Digunakan

1. Spons (*Callispongia* sp.)
2. Etanol
3. Metanol
4. Agar
5. Ekstrak daging (Diffco)
6. Ekstrak ragi (Diffco)
7. Glukosa
8. Pepton (Diffco)
9. Natrium Klorida
10. Larutan NaCl fisiologis steril 0,9%
11. Biakan murni *Bacillus subtilis*
12. Biakan murni *Escherichia coli*



13. Etil asetat
14. Heksana
15. Kloroform
16. Air suling
17. Asam sulfat P
18. Amilum
19. Tetrasiklin
20. Silika gel G 60
21. Pereaksi Antimon (III) klorida
22. Pereaksi Lieberman-Burchard
23. Pereaksi Anisaldehida
24. Pereaksi Ninhidrin
25. Pereaksi 2,4 -Dinitrofenilhidrazin
26. Pereaksi Vanilin - Asam Sulfat
27. Pereaksi Asam Perkorat

IV.2 Pengambilan dan Pengolahan Sampel

IV.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel adalah spons *Callyspongia* sp. diambil di perairan pantai bagian utara pulau Barrang Lompo dengan menggunakan "snorkel", pada kedalaman 1-2 meter.

IV.2.2 Pengolahan Sampel

Sampel yang telah diambil dibersihkan dan dipotong-potong kecil kemudian dimasukkan kedalam toples dan direndam dengan etanol, untuk mengawetkan selama transportasi.

IV.3 Ekstraksi Sampel

Sampel pertama-tama dibebaskan dari etanol yang digunakan sebagai pengawet, diuapkan hingga kering kemudian di timbang 500 gram sampel dan dimasukkan ke dalam bejana maserasi dan dituangi dengan metanol 4000 ml dan ditutup. Penyarian secara maserasi ini dilakukan selama 5 hari dan dibiarkan terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari, sari diserkai dan ampas diekstraksi kembali dengan cairan penyari yang baru. Pengerjaan ini dilakukan hingga diperoleh hasil maserasi yang bening dan tidak memberikan noda pada lempeng KLT. Ekstrak metanol dikumpulkan dan dipekatkan dengan rotavapor sampai kering, lalu ditimbang. Sejumlah kecil ekstrak metanol ini dipisahkan untuk analisis secara kromatografi lapis tipis menggunakan silika gel G60 F₂₅₄, cairan pengelusi kloroform : metanol (10 : 1) serta heksana : etilasetat (8 : 2) dengan penampak noda sinar ultra violet 366 nm dan asam sulfat 10%. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 1, 2 dan tabel 1, 2.

IV.4 Penyiapan Alat dan Bahan

IV.4.1 Sterilisasi Alat

Semua alat yang akan digunakan dicuci dengan deterjen kemudian dibilas dengan air. Untuk peralatan gelas sterilkan dalam oven pada suhu 170°C selama 2 jam, sedangkan peralatan yang dapat rusak oleh panas dan bahan-bahan yang akan digunakan disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Ose dan pinset disterilkan dengan cara dipijarkan dengan menggunakan api langsung.

IV.4.2 Pembuatan medium

Medium yang digunakan yaitu :

1. Medium Nutrien Agar (komposisi terlampir).

Bahan-bahan dimasukkan kedalam erlenmeyer dan dilarutkan dalam air suling hingga volume 800 ml, lalu dicek pH 7,0, kemudian dicukupkan volumenya dengan air suling hingga 1000 ml, setelah itu disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2. Medium Glukosa Nutrient Agar (komposisi terlampir).

Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam air suling, kemudian dipanaskan sampai mendidih hingga semua bahan larut, dan pH-nya diatur dengan HCl 5 N sampai diperoleh pH 5,7 + 0,1. Air yang hilang selama pemanasan diganti dengan menambahkan air suling hingga 1000 ml. Disaring dengan kapas, kemudian medium tersebut disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Kemudian dibiarkan hingga suhunya mencapai 45-50°C. Selanjutnya pHnya diatur kembali dengan larutan NaOH 40% steril hingga diperoleh pH 7,0 + 0,2 didalam "Laminar Air Flow".

IV.4.3 Peremajaan Bakteri Uji

Mikroba uji berupa bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* yang berasal dari biakan murni masing-masing. Diambil satu ose lalu diinokulasikan dengan cara digoreskan pada medium Nutrien Agar miring lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

IV.4.4 Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri uji berumur 24 jam dari agar miring disuspensikan dengan bantuan larutan NaCl 0,9% steril dengan butir-butir kaca kemudian dituang ke dalam botol roux yang berisi medium Nutrien Agar kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Penetapan transmittan suspensi biakan diatur sehingga pengenceran yang diperoleh pada panjang gelombang 580 nm memiliki transmittan 25% terhadap blanko NaCl 0,9% steril dengan menggunakan kuvet berdiameter 13 mm.

IV.5 Pendeteksian secara KLT-Bioautografi

IV.5.1 Pemisahan Senyawa Secara Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak metanol sebanyak 100 mg dilarutkan dalam 10 ml cairan pengelusi yang digunakan. Ekstrak metanol ini ditotolkan pada lempeng kromatografi lapis tipis (KLT) ukuran 8 x 6 cm dengan volume totalan 2 μ l, 4 μ l, 6 μ l, dan 8 μ l menggunakan mikropipet, sehingga konsentrasi ekstrak metanol yang ditotolkan berturut-turut 10 μ g/ μ l, 20 μ g/ μ l, 30 μ g/ μ l dan 40 μ g/ μ l. Ditotolkan pula antibiotika Tetrasiklin sebagai pembanding pada lempeng yang sama dengan konsentrasi penotolan 10 μ g/ μ l. Ekstrak dan pembanding ditotolkan kira-kira 1 cm dari tepi bawah lempeng kemudian dibiarkan beberapa saat hingga kering. Setelah itu lempeng dimasukkan ke dalam bejana kromatografi berisi cairan pengelusi kloroform : metanol (10:1) yang telah dijenuhkan. Lempeng dibiarkan terelusi hingga batas 1 cm dari tepi atas lempeng. Lempeng dikeluarkan dari bejana dan diangin-anginkan hingga cairan pengelusnya menguap. Kromatogram yang dihasilkan diamati nodanya

di bawah sinar ultra violet pada panjang gelombang 366 nm. Noda-noda yang memberikan fluoresensi ditandai pada lempeng.

IV.5.2 Pengujian secara KLT-Bioautografi

Medium Glukose Nutrient Agar (GNA) steril yang telah didinginkan sebanyak 10 ml diinokulasikan dengan masing-masing bakteri uji sebanyak 0,5 ml dan dituang ke dalam cawan petri yang dilakukan secara aseptik. Setelah medium agak memadat, lempeng KLT yang telah dielusi diletakkan di atas permukaan medium agar. Setelah 30 menit, lempeng tersebut dipindahkan. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zone hambatan ditampakkan pada medium agar, dan dibandingkan dengan kromatogram hasil pengujian KLT. Dilakukan kontrol ruangan dengan membiarkan cawan petri yang berisi medium GNA terbuka setiap 5 menit pada setiap langkah yang berbeda dalam pengujian. Petri kemudian diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Hasilnya dilihat pada gambar 3 dan 4.

IV.6 Isolasi Senyawa Antibakteri

Sejumlah ekstrak metanol diisolasi dengan metode kromatografi lapis tipis preparatif menggunakan lempeng kaca dengan ukuran 20x20cm. Lempeng KLT yang telah disiapkan diberi garis 2 cm dari tepi bawah. Ekstrak metanol kemudian dilarutkan dengan sedikit cairan pengelusi yang digunakan kemudian ditotolkan dengan menggunakan spoit. Penotolan dilakukan secara kontinyu sepanjang garis batas, kemudian dibiarkan hingga kering. Lempeng dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan cairan pengelusi kloroform : metanol (10:1) dan dibiarkan terelusi. Setelah sampai garis batas atas lempeng diangkat dan dibiarkan beberapa saat hingga kering. Bercak

dideteksi metanol dan disaring hingga diperoleh filtrat yang jernih. Filtrat yang merupakan isolat dipekatkan. Masing-masing isolat dianalisis kembali secara bioautografi. Noda-noda yang tampak jernih dicatat sebagai senyawa antibakteri.

IV.7 Identifikasi Senyawa Antibakteri (23,24)

IV.7.1 Identifikasi Terpenoid

Isolat yang diperoleh dianalisis secara Kromatografi Lapis Tipis dengan fase diam silika gel G60 F₂₅₄ dan caran pengelusi kloroform : metanol (10:1). Kromatogram diamati dengan menggunakan pereaksi kimia :

1. Vanilin-Asam sulfat (1 gram vanilin dilarutkan dalam 100 ml H₂SO₄ 50%)
Kromatogram dipanaskan pada suhu 110°C selama 5-10 menit diamati dengan munculnya warna ungu. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 3.
2. Antimon (III) klorida dalam kloroform (dilarutkan 10 g Antimon (III) klorida dalam 50 ml kloroform)

Kromatogram dipanaskan pada 110-120°C selama 5-10 menit, diamati dengan timbulnya warna ungu dan merah jingga. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 3.

IV.7.2 Identifikasi steroid

Sari aktif dari hasil isolasi ditotolkan pada lempeng silika gel G60 F₂₅₄ dan dielusi dengan cairan pengelusi kloroform : metanol (10:1) dan masing-masing lempeng disemprot dengan :

1. Larutan asam perklorat 20% (20 ml asam perklorat dalam 100 ml air)
Kromatogram dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit sampai tercapai intensitas warna maksimum. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 3.



2. Pereaksi Lieberman-Bouchard (campuran H_2SO_4 pekat 1 ml, anhidrida asetat 20 ml dan kloroform 50 ml)

Kromatogram dipanaskan pada $85-95^\circ C$ selama 15 menit, diamati timbul warna violet-hijau-biru. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 3.

IV.7.3 Identifikasi aldehida dan keton

Masing-masing isolat ditotolkan pada lempeng silika gel 60 F_{254} dan dielusi dengan menggunakan cairan pengelusi kloroform : metanol (10:1), kemudian kromatogram disemprot dengan pereaksi 1,4-dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH). Dipanaskan pada $110^\circ C$ selama 10-20 menit, diamati timbul warna kuning sampai kuning orange. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 3.

IV.7.4 Identifikasi asam amino

Masing-masing isolat ditotolkan pada lempeng silika gel 60 F_{254} dan dielusi dengan menggunakan cairan pengelusi kloroform : metanol (10:1), kemudian disemprot dengan pereaksi Ninhidrin (95 ml larutan 0,2% pereaksi dalam butanol ditambah 5 ml HOAc 10%). Dipanaskan pada $120-150^\circ C$ selama 10-15 menit. Diamati timbul warna biru. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 3.

IV.7.3 Identifikasi Saponin

Masing-masing isolat ditotolkan pada lempeng silika gel 60 F_{254} dan dielusi dengan menggunakan cairan pengelusi kloroform : metanol (10:1). Disemprot dengan pereaksi Anisaldehida dalam Asam sulfat (ditambahkan secara hati-hati 8ml H_2SO_4 dan 0,5 ml anisaldehida yang didinginkan dengan menggunakan es ke dalam campuran 85 metanol dan 10 ml asam asetat

glasial), dipanaskan pada 90-125°C selama 10 - 15 menit. Berbagai warna pada kromatogram dapat timbul.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

V.1 Hasil Penelitian

Setelah dilakukan ekstraksi, maka penentuan senyawa antibakteri secara KLT-Bioautografi dan isolasi serta identifikasi golongan komponen kimia dengan pereaksi kimia terhadap ekstrak metanol spons *Callyspongia* sp diperoleh hasil sebagai berikut:

A. Ekstraksi Sampel

Sebanyak 500 gram sampel yang telah diekstraksi dengan pelarut metanol 4000 ml secara maserasi diperoleh ekstrak kering sebanyak 90.55 gram.

B. Identifikasi Secara Kromatografi Lapis Tipis

Identifikasi komponen kimia ekstrak metanol secara kromatografi lapis tipis menggunakan cairan pengelusi :

1. Kloroform : Metanol (10:1) dengan penampak noda sinar UV 366 nm menunjukkan 8 noda dan dengan asam sulfat 10% menunjukkan 9 noda.
2. Heksana : Etil Asetat (8:2) dengan penampak noda sinar UV 366 nm menunjukkan 2 noda dan dengan asam sulfat 10% menunjukkan 3 noda (Gambar 1,2 dan Tabel 1,2)

C. Analisa KLT-Bioautografi1.

1. Bioautogram hasil penentuan senyawa antibakteri ekstrak metanol dengan cairan pengelusi kloroform : metanol (10:1) diperoleh dua noda yang aktif dengan Rf 0,55 dan 0,33 dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* (Gambar 3 dan 4)
2. Bioautogram Tetrasiklin sebagai pembanding dengan cairan pengelusi kloroform : metanol (10:1) juga mampu menghambat pertumbuhan kedua jenis bakteri tersebut (Gambar 3 dan 4).

D. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antibakteri

Senyawa dengan nilai Rf 0,55 dan 0,33 yang masing-masing disebut noda I dan noda II diisolasi secara Kromatografi Lapis Tipis Preparatif serta diidentifikasi dengan berbagai pereaksi kimia dimana pereaksi Vanilin-Asam Sulfat yang masing-masing noda memberikan warna ungu dan coklat, warna merah ungu dan jingga merah dengan Antimon (III) klorida, Asam Perklorat memberikan warna hijau dan merah jambu, Lieberman-Burchard memperlihatkan warna hijau biru dan biru serta 2,4 dinitrofenilhidrazin memberikan warna kuning yang memberikan hasil positif golongan terpenoid.



2. Pembahasan

Spons *Callyspongia* sp. yang diperoleh dari perairan bagian utara pulau Barrang Lompo menunjukkan populasi yang cukup besar pada kedalaman 1 - 2 meter. Hal ini disebabkan karena permukaan laut biasanya mengandung banyak unsur organik yang dimanfaatkan sebagai bahan makanan bagi kebanyakan biota laut. Sampel yang telah diperoleh langsung direndam dengan pelarut etanol dengan maksud untuk menarik kandungan air dalam sel dan jaringan spons. Kemampuan pelarut etanol untuk menarik kandungan air yaitu sekitar 40%, telah terbukti lebih besar dibandingkan dengan pelarut metanol yang bisa mengikat air hanya sekitar 25%. Penggunaan pelarut etanol juga sesuai dengan Leblanc, M (1997) (7) bahwa spons direndam dalam larutan etanol 80% - 90% dengan tujuan untuk mengawetkan spons selama perjalanan, sehingga dapat mencegah terjadinya proses pembusukan dan dengan demikian zat aktif yang terkandung dalam spons tetap utuh.

Pada penelitian ini, sampel diekstraksi secara maserasi karena jenis spons ini mempunyai struktur tubuh yang lunak sehingga dinding selnya mudah ditembus oleh cairan penyari walaupun tanpa pemanasan. Dari hasil ekstraksi dengan menggunakan 500 gram sampel menggunakan 4000 ml pelarut metanol diperoleh ekstrak metanol kering sebanyak 90,55 gram. Jumlah yang cukup besar ini disebabkan karena kemampuan pelarut metanol yang bersifat semipolar untuk melarutkan senyawa polar dan non polar.

Identifikasi ekstrak metanol secara kromatografi lapis tipis menggunakan cairan pengelusi kloroform : metanol (10 :1) memperlihatkan 8 noda dengan menempak noda sinar UV 366 nm dan dengan asam sulfat 10% diperoleh

9 noda. Dengan cairan pengelusi heksana : etil asetat (8 :2) di peroleh 2 noda dengan penampak noda sinar UV 366 nm dan dengan asam sulfat 10% diperoleh 3 noda. Adanya keterbatasan alat lampu UV yang digunakan hanya dapat mendeteksi senyawa pada panjang gelombang 254 - 366 nm, sehingga senyawa yang kemungkinan berada pada daerah UV hampa ($\lambda = 160 - 200 \text{ nm}$) tidak tampak. Dengan adanya penyemprotan dengan larutan H_2SO_4 10% yang merupakan oksidator, maka dapat memuluskan ikatan rangkap senyawa yang tidak tampak sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang menjadi lebih panjang sehingga dapat tampak oleh mata. Dari hasil tersebut diatas menunjukkan bahwa kebanyakan senyawa aktif lebih banyak terelusi dengan menggunakan cairan pengelusi yang lebih polar dibandingkan dengan cairan pengelusi yang bersifat kurang polar. Hal ini disebabkan karena senyawa aktif pada umumnya adalah senyawa polar yang mempunyai sifat saling tarik-menarik karena adanya perbedaan keelektronegatifan yang menyebabkan senyawa polar ini reaktif. Senyawa polar inilah yang terekstraksi oleh cairan pengelusi yang bersifat lebih polar.

Pada Pengujian senyawa antibakteri dengan menggunakan metode KLT-Bioautografi, dipilih metode bioautografi kontak karena lebih mudah, sederhana dan paling sering digunakan. Hal ini juga didukung oleh hasil penelitian Hamburger dan Cordell (1987) (5), dengan bioautografi kontak diperoleh proses perpindahan senyawa aktif kedalam medium agar yang dapat menghasilkan zone hambatan yang lebih besar dengan berkurangnya sensitifitas dan kemampuan membedakan antara senyawa aktif dengan nilai Rf yang sama. Dibandingkan dengan metode bioautografi langsung dimana penyebaran bakteri

pada lempeng sering tidak merata dan kemungkinan terjadinya kontaminasi lebih besar, begitu pula halnya dengan bioautografi pencelupan dimana zone hambatannya agak sukar diamati, maka dengan bioautografi kontak ketersebaran bakteri dapat dijamin serta zone hambatan dapat langsung diamati pada medium agar.

Senyawa antibakteri yang teruji dengan dengan metode KLT-Bioautografi dari ekstrak metanol spons *Callyspongia* sp. menunjukkan bahwa dari 8 noda dengan penampak noda sinar UV 366 nm memperlihatkan 2 noda yang aktif menghambat masing-masing pertumbuhan bakteri uji yang digunakan yaitu *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* yaitu pada Rf 0,55 dan Rf 0,33. Dari kedua nilai Rf ini yang memperlihatkan zone penghambatan yang terbesar terhadap kedua bakteri uji yaitu pada Rf 0,33.

Berdasarkan hasil bioautogram, terlihat kemampuan ekstrak metanol dari spons *Callyspongia* sp. dalam menghambat bakteri uji *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli* tidak menampakkan perbedaan yang nyata pada berbagai konsentrasi penotolan. Hal ini dapat disebabkan oleh sensitivitas kedua bakteri terhadap ekstrak tersebut hampir sama.

Kemampuan ekstrak spons untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji ini disebabkan karena dapat merusak pembentukan dinding sel bakteri, menggumpalkan protein bakteri karena perbedaan sifat keasaman (pH), serta hidrolisis dan difusi cairan sel yang disebabkan karena perbedaan tekanan osmosa. Kemampuan bioaktif spons untuk menghambat pertumbuhan bakteri

kemungkinan juga disebabkan sifat fisiologis spons yang dapat memanfaatkan bakteri disekitarnya sebagai sumber nutrisi (3,4).

Pemilihan antibiotika Tetrasiklin sebagai pembanding yang ditotolkan bersama dengan sampel uji pada lempeng sama karena antibiotika ini mempunyai spektrum yang luas dan efektif menghambat bakteri gram positif dan gram negatif, baik bentuk kokus, basil maupun jenis spiral. Dari hasil bioautogram, memperlihatkan kemampuan antibakteri dari Tetrasiklin lebih besar dibandingkan dari ekstrak metanol spons *Callyspongia* sp. karena merupakan senyawa murni sedangkan ekstrak masih bisa mengandung senyawa-senyawa lain yang saling berinteraksi sehingga dapat mengurangi daya antibakteri dari ekstrak spons.

Pengontrolan ruangan terhadap kontaminasi bakteri udara memperlihatkan tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri pada medium dalam cawan petri yang diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hal ini menunjukkan bahwa pelaksanaan langkah-langkah kerja penelitian masih di dalam kondisi yang layak untuk pengujian mikrobiologis.

Senyawa yang mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri (noda dengan Rf 0,55 dan 0,33) berdasarkan hasil analisis bioautografi pendahuluan diisolasi secara kromatografi lapis tipis preparatif. Pengujian bioautografi kembali dengan maksud untuk memastikan isolat tersebut memberikan daya hambat pada medium dengan nilai Rf yang sama dengan uji bioautografi pendahuluan. Noda dengan nilai Rf 0,55 selanjutnya disebut noda I dan dengan nilai Rf 0,33 disebut noda II.

Identifikasi senyawa antibakteri dengan penggunaan berbagai pereaksi kimia memberikan hasil positif terhadap pereaksi Vanilin-Asam Sulfat dimana noda I memberikan warna ungu dan noda II warna coklat, sedangkan dengan Antimon (III) klorida noda I memberikan warna merah ungu sedang noda II memberikan warna jingga merah. Penampakan warna ini disebabkan oleh pemutusan ikatan rangkap oleh Antimon (III) klorida yang menghasilkan senyawa π kompleks yang tampak oleh mata. Dari hasil ini memberikan hasil positif bahwa senyawa tersebut termasuk golongan terpenoid. Pereaksi Lieberman-Burchard dan Asam Perklorat yang merupakan pereaksi khas untuk uji steroid memberikan hasil positif adanya senyawa steroid. Pereaksi 2,4 dinitrofenilhidrazin memberikan hasil positif adanya gugus aldehida dan keton. Pereaksi ini berikatan dengan gugus aldehida atau keton membentuk hidrazon dan osazon yang memberikan warna kuning orange pada lempeng. Untuk uji asam amino, tidak memberikan hasil yang positif terhadap pereaksi Ninhidrin, pereaksi anisaldehida juga tidak positif untuk uji saponin.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian analisis KLT- Bioautografi senyawa antibakteri ekstrak metanol spons *Callyspongia* sp., ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Terdapat dua noda aktif sebagai antibakteri dengan nilai R_f 0,55 dan 0,33.
2. Tidak ada perbedaan nyata antara konsentrasi ekstrak metanol dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*.
3. Senyawa aktif yang diidentifikasi sebagai antibakteri, diduga senyawa golongan terpenoid.

VI.2 Saran

- ° Perlu dilakukan penelitian isolasi dan penentuan struktur kimia senyawa aktif antibakteri dari spons (*Callyspongia* sp.)
- *Perlu dilakukan uji antibakteri senyawa aktif spons (*Callyspongia* sp.) terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Nybakken, J.W., (1993). " Marine Biology ", Third Edition, Harper Collins Collage Publishers, 982
2. Safari,R., (1996). "Produk Alam Laut sebagai Lead Compound untuk Farmasi dan Pertanian". seminar sehari Perspektif Baru dalam Drug Discovery, 26 Oktober 1996, Ujung Pandang, 3
3. Suryati,E., Ahmad,T., (1996), "Peluang Pemanfaatan Bioaktif Spons untuk Bakterisida". Temu Ilmiah Veteriner, Maret, Bogor, 5-7
4. Ahmad, T., Suryati.E.,(1996), "Spons Sumber Bakterisida Alami ". Majalah Trubus edisi 318, tahun XXVII, Mei 1996, 78-81
5. Hamburger,M.O., dan Cordell,G.A., (1987), "Direct Bioautographic TLC Assay for Compounds Possesing **Antibacterial** Activity ", J. Nat. Prod., volume 50, no 1, 19-22
6. Bernes,R.D., (1980)," Invertebrate Zoologi ", fourth Edition, Holt-Saunders International Edition, Gettysburg College, Pennsylvania, 104-106
7. Leblanc.M., (1997). " Papers on Guide The Sponge Collection and Identification ", University of British Columbia, Canada ,5-7
8. Storer,T.I.,Usinger,R.L., Nybakken J.W., Stebbins, R.C., (1977). " Element of Zoology ", Fourth Edition, Mc. Graw-Hill Book Company, Inc., New York, 269-272
9. Minale.L., (1974). " Terpenoid from Marine Sponge ", Aspects of Sponge Biology Academic Press, New York, 175.177

10. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, (1986), "Sediaan Galenik", edisi II, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Bhakti Husada, Jakarta, 10-13
11. Darise,M., Wiryowidagdo,S., Tobo,F., (1996) " Komponen Kimia Dalam Praktek Phytochemistry ", Laboratorium Fitokimia Jurusan Farmasi, F-MIPA, UNHAS, Ujung Pandang, 11-15
12. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, (1979), "Farmakope Indonesia", edisi III, Departemen Kesehatan, Republik Indonesia, Jakarta, 780-784
13. Sastrohamidjojo,H., (1979), "Kromatografi", Liberty Yogyakarta, 26,30,39
14. Stahl,E., (1985), "Analisis Obat Secara Kromatografi Dan Mikroskopi", ITB, Bandung, 3-10
15. Gritter,R.J., Bobbitts,J.M., Schwarting,A.E., (1991), "Pengantar Kromatografi", ITB Bandung,107,108,137-139
16. Hostettmann,K., Hostettmann,M., Marston,A., (1985), "Cara Kromatografi Preparatif, Penggunaan pada Isolasi Senyawa Alam", ITB, Bandung, 9-26
17. Betina,V., (1972), "Pharmaceutical Applications of Thin Layer and Paper Chromatography", Amsterdam, 503-507
18. Rios,J.L., Recio,M.C., Villar,A., (1988), "Screening Methods For Natural Products With Antimicrobial Activity", Journal of Echinoparmacology, No.23, Departemen Farmacology, Faculted de Farmacia, Universided Complutenic de Madrid, Madrid, 122,136-140,144.

19. Rahalison,L., Hostettmann,K., (1991), " A Bioutographic Agar Overlay Method for the Detection of Antifungal Compounds from Higher Plants", *Phytochemical Analysis*, Vol. 2, University de Lausanne, Switzerland, 199-203.
20. Dwidjoseputro,D., (1990), "Dasar-Dasar Mikrobiologi", Cetakan Kesepuluh, Penerbit Djambatan, Malang,131-132
21. Buchanan,R.E., Gibbons, N.E., (1975), "Bergey's Manual of Determinate Bacteriology", edisi 8, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 18-19
22. Geniswarna,S.G., (1995), "Farmakologi dan Terapi", edisi 4, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran-Universitas Indonesia, Jakarta,572-573.
23. Jork,H., Funk,W., Fischer,W., Wimmer,H., (1990), "Thin-Layer Chromatography, Reagents and Detection Methods", Vol I, translated by Frank and Jennifer A. Hampson, Weinheim (Federal Republic of Germany), 195,206,273,354,364.
24. Bambang,S., (1953), " Pereaksi Kromatografi Lapis Tipis ", Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta, 24,26.

LAMPIRAN II
KOMPOSISI MEDIUM YANG DIGUNAKAN

1. Medium Nutrient Agar, dengan komposisi :

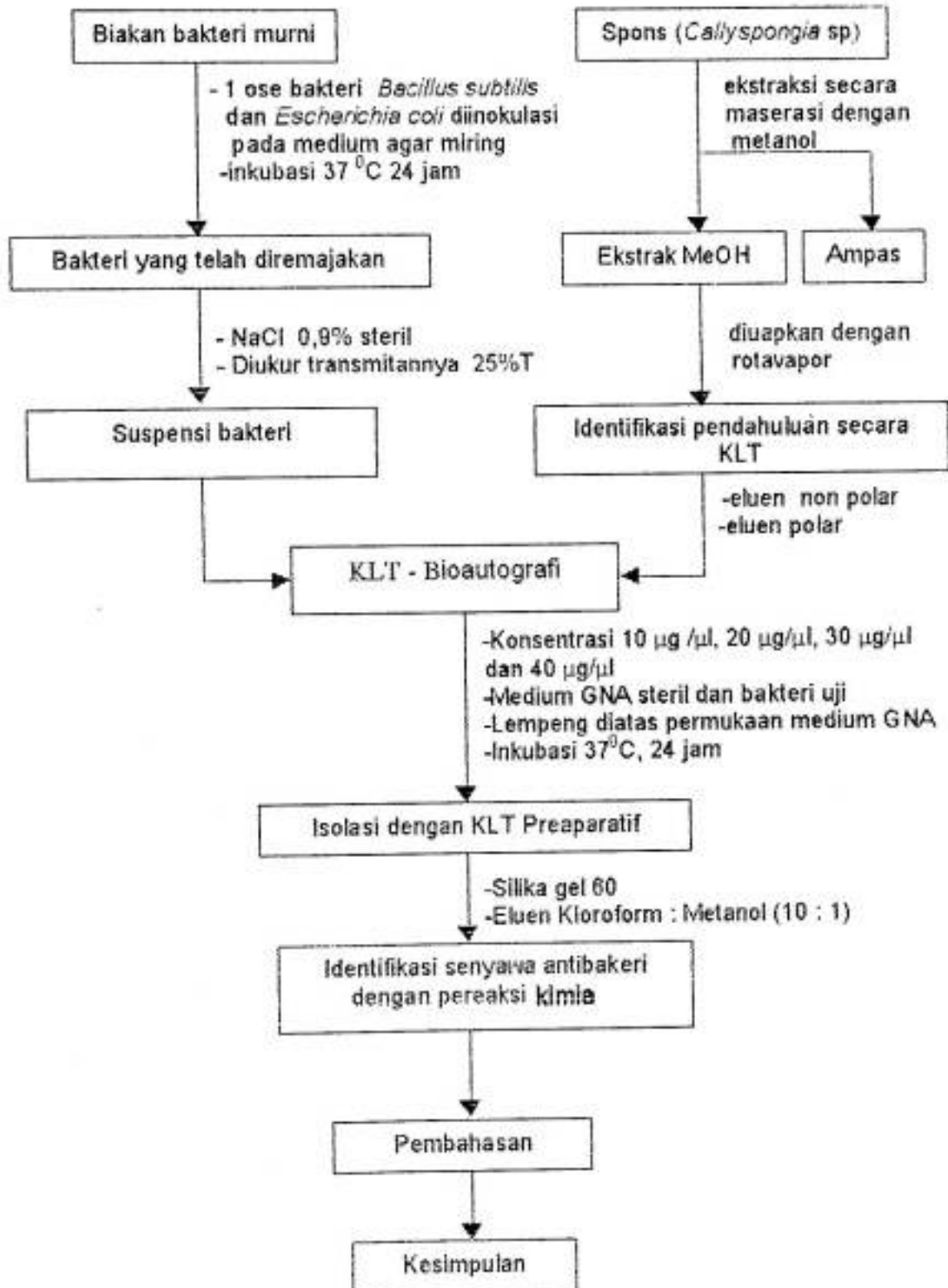
Ekstrak daging	3 gram
Pepton	5 gram
Agar	15 gram
Air suling hingga	1000 ml
pH	7,0

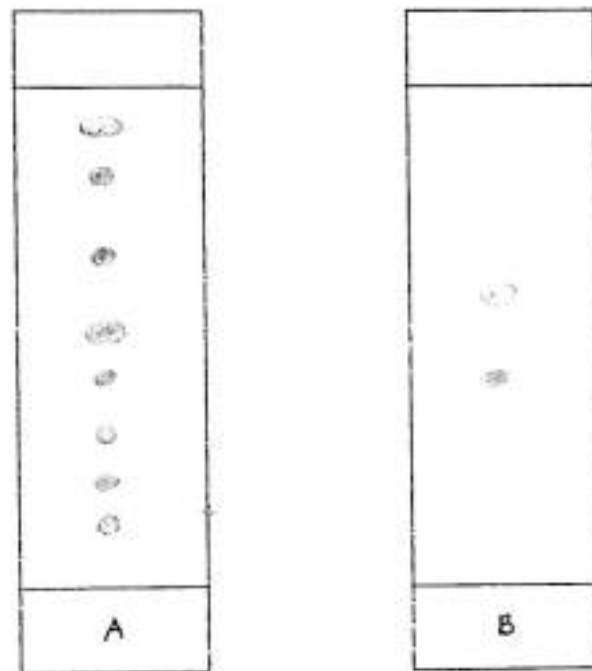


2. Medium Glukose Nutrient Agar, dengan komposisi :

Glukosa	10 gram
Ekstrak khamir	5 gram
Pepton	10 gram
NaCl	2.5 gram
Agar	15 gram
Air suling hingga	1000 ml
pH	7.0 + 0,2

SKEMA KERJA





Gambar 1. Kromatogram Lapis Tipis Ekstrak Metanol Spons (*Callispongia sp*) dengan penampak noda sinar UV 366 nm

Keterangan :

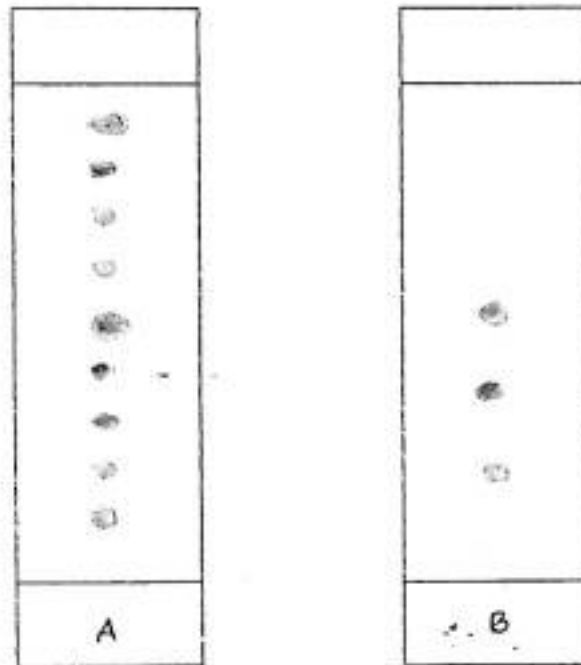
A = Cairan pengelusi kloroform : metanol (10 : 1)

B = Cairan pengelusi heksana : etil asetat (8 : 2)

Penampak noda = Sinar UV 366 nm

Adsorben = Silika gel 60 F₂₅₄

Ukuran Lempeng = 8 x 2 cm



Gambar 1. Kromatogram Lapis Tipis Ekstrak Metanol Spons (*Callyspongia sp*)
dengan penampak noda asam sulfat 10%

Keterangan :

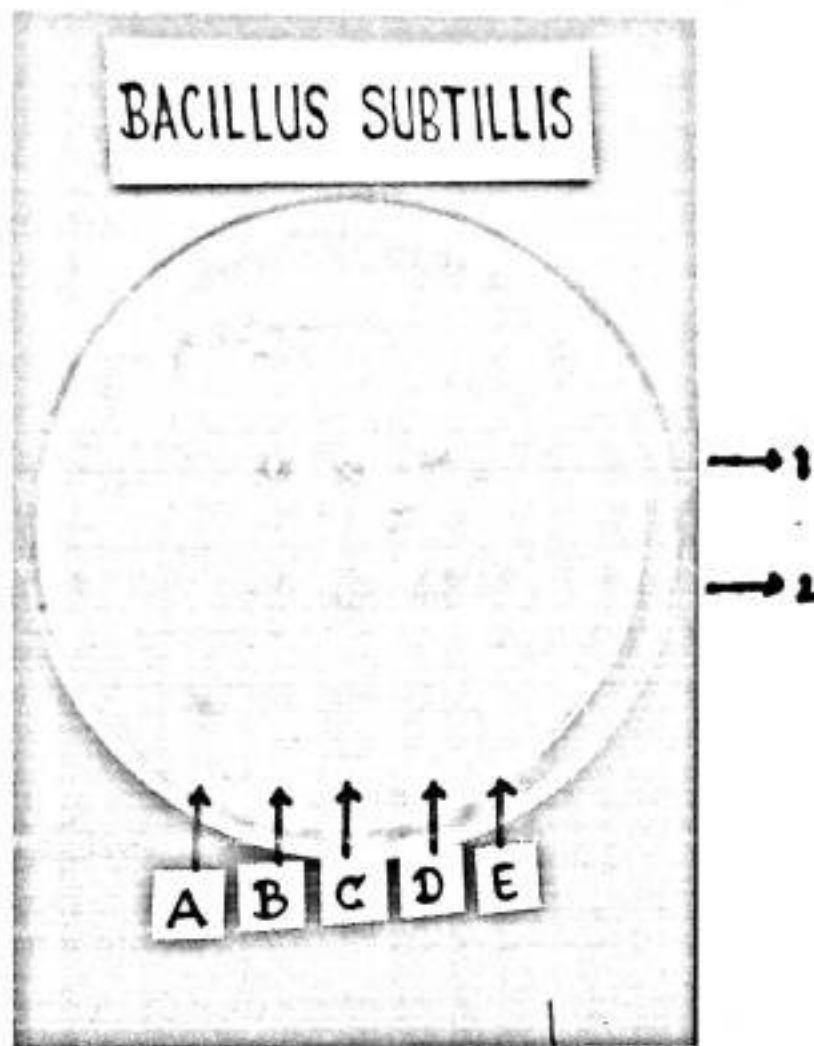
A = Cairan pengelusi kloroform : metanol (10 : 1)

B = Cairan pengelusi heksana : etil asetat (8 : 2)

Penampak noda = Asam sulfat 10 %

Adsorben = silika gel 60 F₂₅₄

Ukuran lempeng = 8 x 2 cm



Gambar 3. Bioautogram ekstrak metanol spons *Callyspongia* sp. dengan cairan pengelusi kloroform : metanol (10:1) dan bakteri uji *Bacillus subtilis*.

Keterangan:

A = Antibiotika Tetrasiklin $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

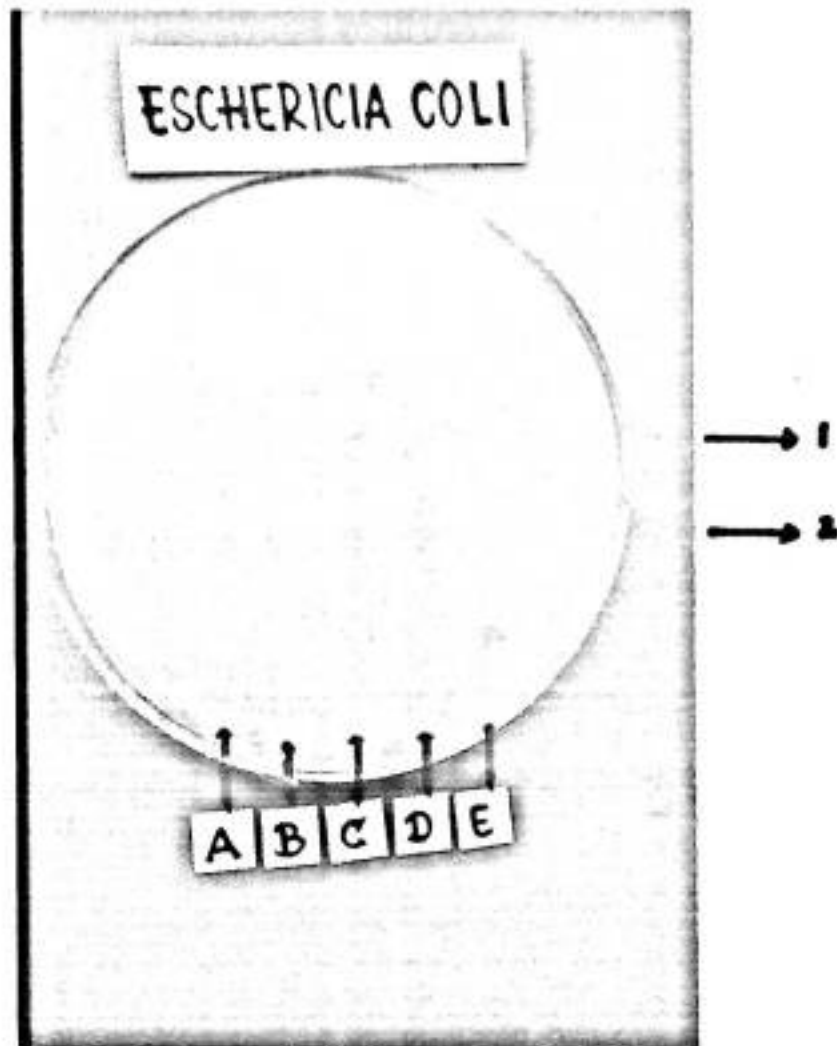
B = Konsentrasi ekstrak metanol $40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

C = Konsentrasi ekstrak metanol $30 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

D = Konsentrasi ekstrak metanol $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

E = Konsentrasi ekstrak metanol $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

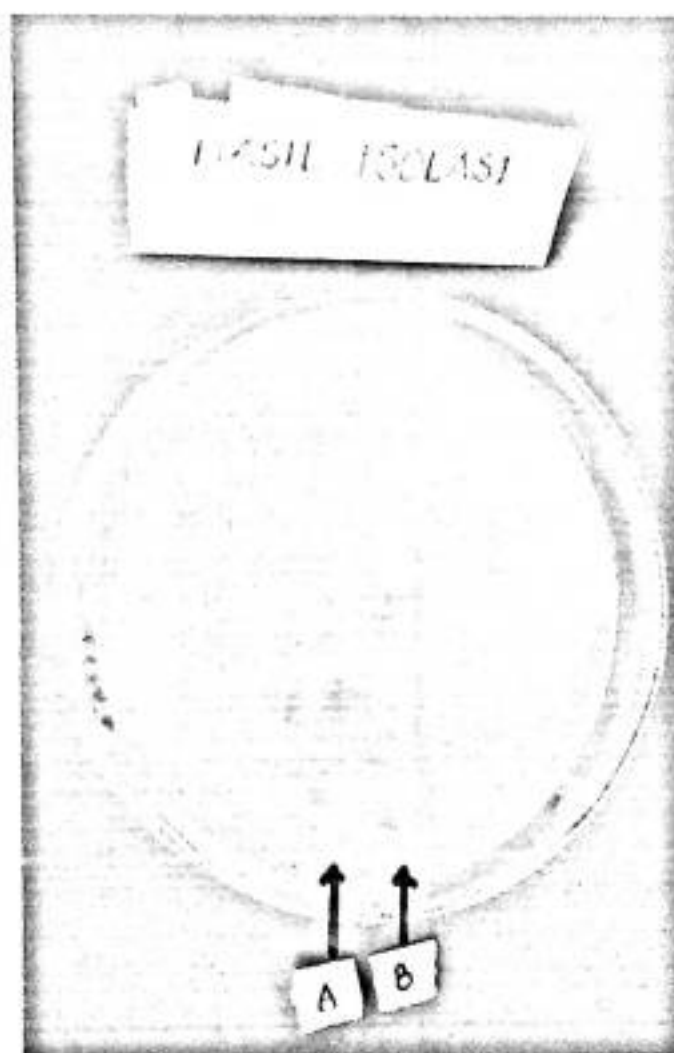
Noda 1 = Rf 0,55 dan noda 2 = Rf 0,33



Gambar 4. Bioautogram ekstrak metanol spons *Callispongia* sp. dengan cairan pengelusi kloroform : metanol (10:1) dengan bakteri uji *Escherichia coli*

Keterangan :

- A. Konsentrasi ekstrak metanol 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- B. Konsentrasi ekstrak metanol 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- C. Konsentrasi ekstrak metanol 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- D. Konsentrasi ekstrak metanol 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- E. Antibiotika Tetrasiklin 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- F. Noda 1 = Rf 0,55 dan noda 2 = Rf 0,33

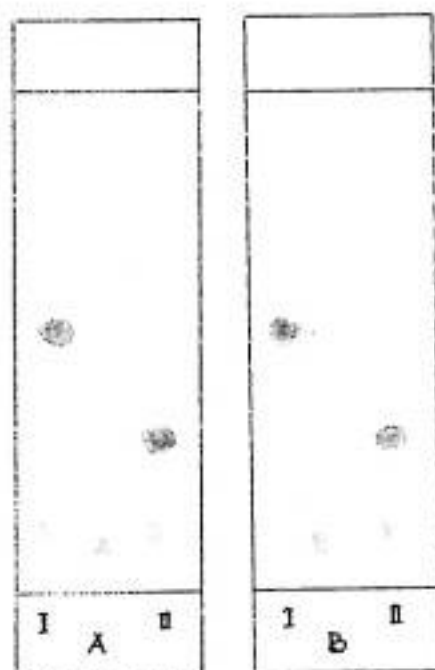


Gambar 5. Bioautogram isolat ekstrak metanol spons *Callyspongia* sp. dengan cairan pengelusi kloroform : metanol (10:1) dan bakteri uji *Escherichia coli*.

Keterangan :

A = Isolat dengan nilai Rf 0,33

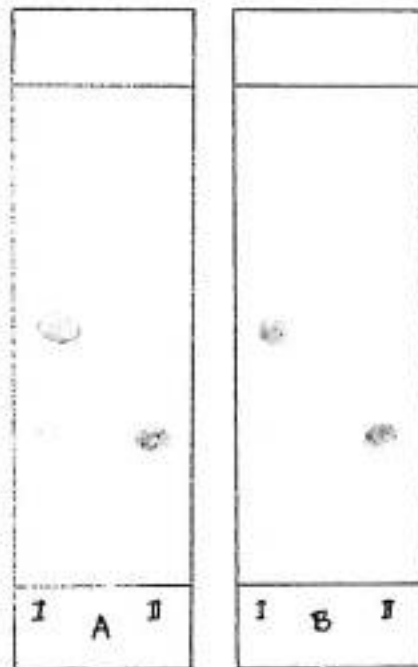
B = Isolat dengan nilai Rf 0,55



Gambar 6. Kromatogram isolat ekstrak dengan pereaksi kimia Vanilin - Asam Sulfat dan Antimon (III) klorida

Keterangan :

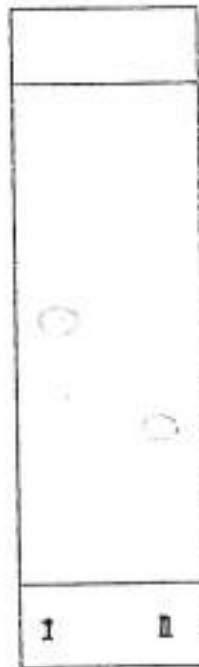
- A. Pereaksi kimia = Vanilin-Asem Sulfat
- B. Pereaksi kimia = Antimon (III) Klorida
- 1. Cairan pengelusi = Kloroform : Metanol (10:1)
- 2. Adsorben = Silika gel 60 F₂₅₄
- 3. Ukuran lempeng = 8 x 2 cm



Gambar 7. Kromatogram isolat ekstrak dengan pereaksi kimia Asam Perklorat dan Lieberman-Burchard

Keterangan :

- A. Pereaksi kimia = Asam Perklorat
- B. Pereaksi kimia = Lieberman-Burchard
- 1. Cairan pengelusi = Kloroform : Metanol (10:1)
- 2. Adsorben = Silika gel 60 F₂₅₄
- 3. Ukuran lempeng = 8 x 2 cm



Gambar 8. Kromatogram isolat ekstrak dengan pereaksi kimia 2,4-dinitrofenilhidrazin

Keterangan :

- A. Pereaksi kimia = 2,4 dinitrofenilhidrazin
- 1. Cairan pengelusi = Kloroform : metanol (10 :1)
- 2. Adsorben = Silika gel 60 F₂₅₄
- 3. Ukuran lempeng = 8 x 2 cm

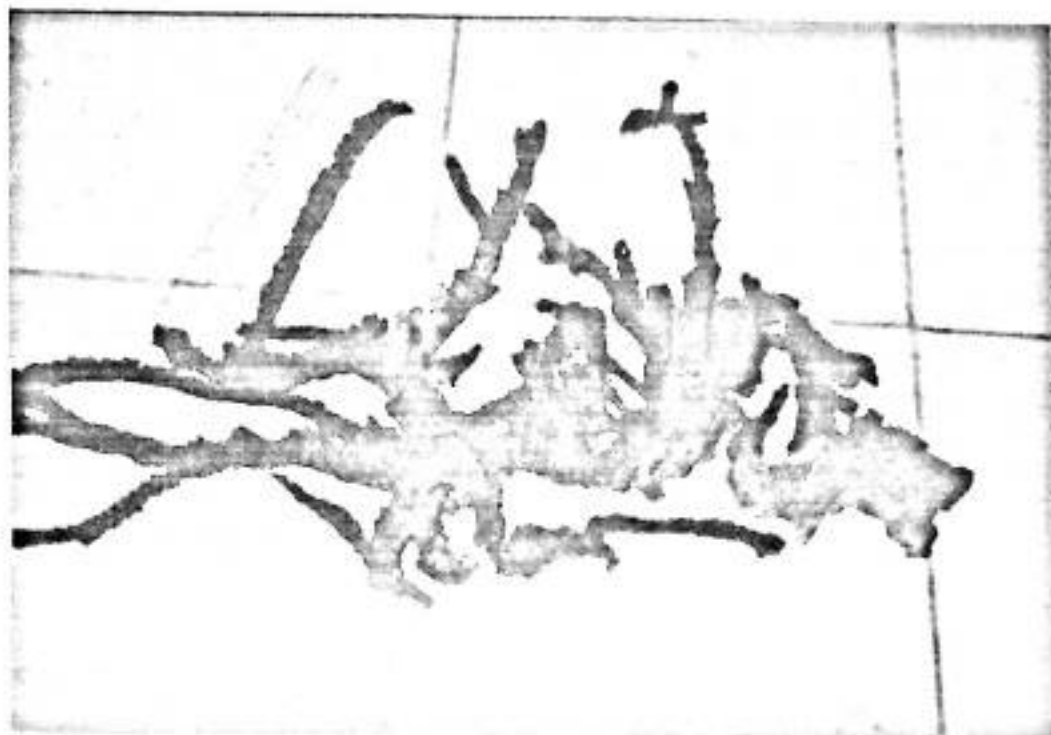


Figure 9. 2. - - - - - (1940) (1940)

Tabel 1. Nilai Rf Kromatogram Lapis Tipis Ekstrak Metanol Spons *Callispongia* sp. dengan Penampak Noda Sinar UV 366 nm

No Noda	Rf		Warna Noda	
	A	B	A	B
1.	0,93	0,58	Hijau	Hijau
2.	0,86	0,42	Merah Jambu	Merah Jambu
3.	0,68		Biru	
4.	0,55		Biru	
5.	0,45		Biru	
6.	0,33		Hijau	
7.	0,25		Biru	
8.	0,16		Kuning	



Keterangan :

A= Cairan Pengelusi Kloroform : Metanol (10 :1)

B= Cairan Pengelusi Heksana : Etil Asetat (8 :2)

Penampak Noda = Sinar UV 366 nm

Adsorben = Silika gel 60 F₂₅₄

Ukuran lempeng = 8 x 2 cm

Tabel 2. Kromatogram Lapis Tipis Ekstrak Metanol Spons *Callyspongia* sp. Dengan Penampak Noda Asam Sulfat 10 %

No. Noda	Rf		Warna Noda	
	A	B	A	B
1.	0,93	0,58	coklat tua	coklat tua
2.	0,86	0,42	merah ungu	merah ungu
3.	0,80	0,25	jingga coklat	jingga coklat
4.	0,68		coklat	
5.	0,55		ungu	
6.	0,45		biru	
7.	0,33		biru	
8.	0,25		coklat	
9.	0,16		coklat	

Keterangan :

A= Cairan Pengelusi Kloroform : Metanol (10 :1)

B= Cairan Pengelusi Heksana : Etil Asetat (8 :2)

Penampak Noda = Asam sulfat 10%

Adsorben = Silika gel 60 F₂₅₄

Ukuran Lempeng = 8 x 2 cm

Tabel 3. Hasil Reaksi Identifikasi Isolat Ekstrak Metanol Spons *Callyspongia* sp.
 Dengan Pereaksi Kimia

No.	Uji	Pereaksi Semprot	Hasil	Ket.
1.	Terpenoid	Antimon (III) klorida	merah ungu	(+)
			jingga merah	
2.	Terpenoid	Vanilin-Asam Sulfat	ungu	(+)
			coklat	
3.	Steroid	Lieberman-Burchard	hijau-biru	(+)
			biru	
4.	Steroid	Asam Perklorat	hijau	(+)
			merah jambu	
5.	Asam Amino	Ninhidrin	coklat	(-)
6.	Saponin	Anisaldehida	-	(-)
7.	Aldehida, keton	2,4-dinitrofenilhidrazin	kuning	(+)