

**IDENTIFIKASI ACTINOMYCETES BCD 2-02 SIMBION
SPONS ASAL PULAU BARRANG CADDI SEBAGAI
PENGHASIL SENYAWA ANTIBAKTERI**

IDENTIFICATION OF ACTINOMYCETES BCD 2-02 SYMBION
SPONGE FROM BARRANG CADDI ISLAND AS PRODUCING
ANTIBACTERIAL COMPOUNDS

ASYARI AL HUTAMA AZIS

N012191024



SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR

2023

**IDENTIFIKASI ACTINOMYCETES BCD 2-02 SIMBION
SPONS ASAL PULAU BARRANG CADDI SEBAGAI
PENGHASIL SENYAWA ANTIBAKTERI**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

ASYARI AL HUTAMA AZIS

**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2023

LEMBAR PENGESAHAN

**IDENTIFIKASI ACTINOMYCETES BCD 2-02 SIMBION
SPONS ASAL PULAU BARRANG CADDI SEBAGAI
PENGHASIL SENYAWA ANTIBAKTERI**

Disusun dan diajukan oleh
ASYARI AL HUTAMA AZIS
NIM N012191024

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Magister Farmasi
Sains Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

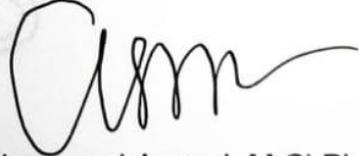
pada tanggal
16 Februari 2023

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan
Menyetujui,

Pembimbing Utama

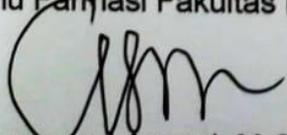
Pembimbing Pendamping


Dr. Herlina Rante, M.Si, Apt
NIP. 19771125 200212 2 003

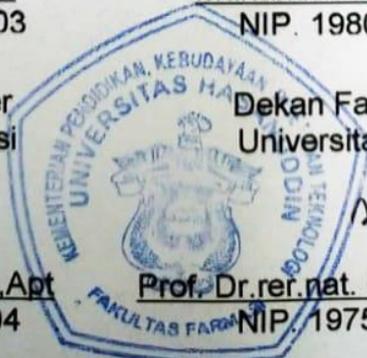

Muhammad Aswad, M.Si, Ph.D, Apt
NIP. 19800101 20031 2 1004

Ketua Program Studi Magister
Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin


Muhammad Aswad, M.Si, Ph.D, Apt
NIP. 19800101 20031 2 1004


Prof. Dr. rer. nat. Marianti A. Manggau., Apt
NIP. 19750925 20012 1 002



PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Asyari Al Utama Azis

NIM : N012191024

Program studi : Farmasi

Jenjang : S2

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

“Identifikasi Actinomycetes Bcd 2-02 Symbion Spons Asal Pulau Barrang Caddi Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri”

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pemikiran orang lain bahwa tesis yang saya tulis ini benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 16 Februari 2023

Yang Menyatakan



Asyari Al Utama Azis

PRAKATA

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatu.

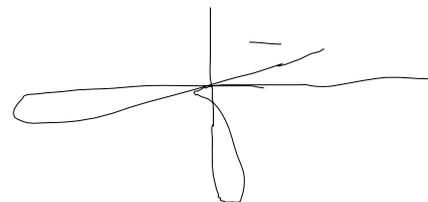
Alhamdulillah, Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *swt.* atas segala Rahmat dan Hidayah-Nya yang telah diberikan sehingga dapat menyelesaikan tesis ini dengan sebaiknya.

Tesis ini dibuat sebagai salah satu persyaratan memperoleh gelar Magister Farmasi Sains Fakultas Farmasi di Universitas Hasanuddin Makassar. Penulis menyadari bahwa selama penyusunan tesis ini terdapat kendala dan hambatan, namun dengan bantuan dari berbagai pihak, sehingga tesis ini dapat terselesaikan. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt, dan Muhammad Aswad, M.Si, Ph.D, Apt selaku komisi penasihat yang telah banyak memberi masukan, arahan dan bimbingan kepada penulis dalam penyusunan tesis ini.
2. Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt, Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt dan Dr. Risfah Yulianty S.Si, M.Si, Apt , selaku tim komisi penguji yang telah memberikan banyak kritik dan saran yang sangat membantu dalam penyusunan tesis ini.
3. Dekan, Wakil Dekan, Bapak-Ibu dosen, serta seluruh staf karyawan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah mendidik, memberikan sarana dan memotivasi penulis dari awal memasuki bangku kuliah hingga saat ini.

4. Kedua orang tua penulis, Ayahanda Abdul Azis dan Ibunda Helmiaty Nadjamuddin untuk semua doa, dukungan materil dan nonmateril serta kasih sayang tulus yang telah diberikan yang tidak akan mampu penulis balas. Kakak penulis, Astri Al Hutami untuk motivasi juga bantuan baik materi dan non materi serta kepada sanak keluarga yang turut mendoakan.
5. Seluruh laboran laboratorium Fakultas Farmasi UNHAS, khususnya kepada atas segala bantuan dalam pelaksanaan penelitian tesis ini.
6. Rekan-rekan magister pascasarjana angkatan 2019 yang telah banyak membantu, serta sahabat-sahabat saya semoga kesuksesan menyertai kita semua.
7. Semua pihak yang terlibat, yang tidak sempat tersebut namanya.

Makassar, 16 Februari 2023

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that form a complex, somewhat abstract shape. The signature is centered below the date and above the name.

Asyari Al Hutama Azis

ABSTRAK

ASYARI AL HUTAMA AZIS, Identifikasi Actinomycetes BCD 2-02 Symbion Spons Asal Pulau Barrang Caddi sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri

Resistensi antibiotik akhir-akhir ini mendorong pencarian senyawa bioaktif salah satunya melalui eksplorasi senyawa bioaktif laut. Actinomycetes dari spons laut memiliki potensi menghasilkan senyawa bioaktif yang bermanfaat sebagai antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui genus actinomycetes BCD 2-02 berdasarkan gen 16s rRNA dan mendapatkan profil metabolit sekunder dari isolat actinomycetes BCD 2-02 menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Densitometri. Ekstrak etil asetat isolat actinomycetes BCD 2-02 memiliki aktivitas antibakteri pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 2.5%, 5% dan 10%. Profil metabolit sekunder dari ekstrak etil asetat menggunakan KLT Densitometri dan diukur pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm dengan fase gerak Heksan: Etil asetat (1:3) didapatkan 6 dan 4 jumlah spot. Profil yang diperoleh dari fase gerak Kloroform: Heksan (3:1) adalah 10 dan 5 jumlah spot. Pada fase terbalik Metanol: Asetonitril: Asam formiat 10% (7:1:1) didapatkan 10 dan 7 jumlah spot. Isolat actinomycetes BCD 2-02 dilakukan karakterisasi molekuler menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) berdasarkan gen 16s rRNA. Analisis filogenetik gen 16s rRNA menunjukkan bahwa Actinomycetes BCD 2-02 memiliki kesamaan dengan bakteri *Nocardiopsis synnemataformans* dengan persentase identity 100%.

Keywords: Actinomycetes, TLC-Densitometry, gen 16s rRNA

ABSTRACT

ASYARI AL HUTAMA AZIS, Identification of Actinomycetes BCD 2-02 Symbion Sponge from Barrang Caddi Island as a Source of Antibacterial Compounds.

Antibiotic resistance has recently encouraged the search for bioactive compounds, one of which is through the exploration of marine bioactive compounds. Actinomycetes from sea sponges have the potential to produce bioactive compounds that are useful as antimicrobials. This study aims to determine the genus of actinomycetes BCD 2-02 based on the 16s rRNA gene and obtain secondary metabolite profiles from actinomycetes BCD 2-02 isolates using Thin Layer Chromatography (TLC). Actinomycetes BCD 2-02 ethyl acetate isolate extract has antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* bacteria with a concentration of 2.5%, 5%, and 10%. Profile of secondary metabolites from ethyl acetate extract was determined using Densitometry TLC and measured at a wavelength of 254 nm and 366 nm. The profile obtained after developing using a mobile phase consisting of Hexane: Ethyl acetate (1:3) was 6 and 4 spots. The profile from Chloroform: Hexane (3:1) as the mobile phase resulted in 10 and 5 spots. In the reversed phase, Methanol: Acetonitrile: Formic acid 10% (7:1:1), there were 10 and 7 spots. Actinomycetes BCD 2-02 isolates were characterized by molecular characterization using Polymerase Chain Reaction (PCR) based on the 16s rRNA gene. Phylogenetic analysis of the 16s rRNA gene showed that Actinomycetes BCD 2-02 exhibited similarities with the bacterium *Nocardiopsis synnemataformans* with a 100% identity percentage.

Keywords: Actinomycetes, TLC-Densitometry, 16s rRNA

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iii
PRAKATA	iii
ABSTRAK	v
ABSTRACT	v
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Actinomycetes	6
B. Fase pertumbuhan mikroorganisme	8
C. Mikroba Uji	10
D. Uji Aktivitas AntiMikroba	11
E. Kromatografi Lapis Tipis	12

F. High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)	15
G. Kerangka Teori	17
H. Kerangka Konsep	18
BAB III METODE PENELITIAN.....	19
A. Rancangan dan Lokasi Penelitian	19
B. Alat dan Bahan Tahap Persiapan	19
C. Metode Kerja	20
BAB IV HASIL PENELITIAN.....	28
A. Peremajaan Actinomycetes BCD2-02	28
B. Fermentasi	28
C. Ekstraksi Senyawa Actinomycetes BCD 2-02	31
D. Identifikasi Molekuler dengan metode PCR	32
E. Uji Aktivitas Antimikroba	36
F. Identifikasi Makroskopik dan Mikroskopik	38
G. Analisis Densitometri	40
H. Analisis skirinning Ekstrak	45
BAB V PENUTUP.....	47
A. Kesimpulan	47
B. Saran	48
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN.....	56

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Sequence Assembly 1404 bp Result – PCR Products.....	34
Tabel 2. Top 10 Hit BLAST Results Against NCBI Database.....	34
Tabel 3. Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat isolate actinomycetes BCD 2-02 terhadap bakteri uji Staphylococcus aureus.	37
Tabel 4. Nilai Rf dari KLT Kromatografi fase normal	42
Tabel 5. Nilai Rf dari KLT Kromatografi fase terbalik	44
Tabel 6. Komposisi Media NA.....	57
Tabel 7. Komposisi Media MHA.....	57
Tabel 8. Komposisi Media SNA	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Bentuk spora yang diproduksi oleh Actinomycetes	8
Gambar 2. Isolat Actinomycetes BCD 2-02 dari spons	28
Gambar 3. Hasil fermentasi (a), Media starter Isolate BCD 2-02 dengan menggunakan shaker selama 3 hari (b), dan medium yang telah disaring	31
Gambar 4. Hasil Produk PCR dengan elektroforesis	33
Gambar 5. Analisis pohon filogenetik isolat actinomyvetes BCD 2-02 berdasarkan gen 16sr RNA.....	35
Gambar 6. Karakteristik BCD 2-02 masa inkubasi 7 hari, A. Pertumbuhan koloni pada medim SNA, B. Rantai spora pada pembesaran 10x, C. Rantai Spora pada pembesaran 40x	39
Gambar 7. Profile kromatografi ekstrak etil asetat isolate actinomycetes BCD 2-02 dengan fase gerak heksan: etil = 1:3 (A1) sinar UV366 nm; (A2) sinar UV254 nm; dan heksan: Chloroform = 1:3 (B1) sinar UV366 nm; (B2) sinar UV254 nm;	40
Gambar 8. Hasil densitogram ekstrak etil asetat isolate actinomycetes BCD 2-02 dengan fase gerak heksan: etil = 1:3 (A1) sinar UV254 nm; (A2) sinar UV366 nm; dan heksan: Chloroform = 1:3 (B1) sinar UV254 nm; (B2) sinar UV366 nm;.....	41
Gambar 9. Profile kromatografi ekstrak etil asetat isolate actinomycetes BCD 2-02 dengan fase gerak methanol: asetonitril: asam	

formiat = 7:1:1 (a) penampakan noda di bawah sinar UV 366
nm; (b) penampakan noda di bawah sinar UV 254 nm... 43

Gambar 10. Hasil Densitogram ekstrak etil asetat isolate actinomycetes
BCD 2-02 dengan fase gerak methanol: asetonitril: asam
formiat = 7:1:1 (a) penampakan noda di bawah sinar UV 366
nm; (b) penampakan noda di bawah sinar UV 254 nm. 44

Gambar 11. Hasil analisis skrining fitokimia (A); pereaksi H_2SO_4 (B)
pereaksi $FeCl_3$46

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Skema Kerja.....	56
Lampiran 2. Komposisi Media.....	57
Lampiran 3. Perhitungan.....	58
Lampiran 4. Uji Aktivitas Antimikroba.....	60
Lampiran 5. Data Molekuler Gen 16s rRNA.....	61

BAB 1

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah bagi dunia Kesehatan dan masih menjadi penyebab utama kematian di dunia terutama bagi negara negara berkembang termasuk juga Indonesia. Kemunculan penyakit infeksi ditengah tengah masyarakat diduga diakibatkan oleh beberapa faktor seperti faktor social-ekonomi, lingkungan dan ekologi. Infeksi dapat disebabkan oleh beberapa mikroorganismenya diantaranya bakteri, virus, jamur dan protozoa. Pengobatan yang dapat dilakukan untuk menekan tumbuhnya bakteri pathogen dengan penggunaan antimikroba. Saat ini, peningkatan penggunaan antimikroba dikaitkan dengan konsumsi antimikroba yang tidak tepat dapat memberikan dampak pada bakteri secara klinis yang mengarah pada pengembangan resistensi antimikroba. (Tang *et al.*, 2020)

Survey tentang resistensi antimikroba yang didapat di rumah sakit dicina pada tahun 2019 melaporkan bahwa 53,86% antimikroba karbapenem mengalami resistensi terhadap spesies *Acinetobacter baumannii* dan 21,60% terhadap *Pseudomonas aeruginosa* juga pada antimikroba *methicillin* terjadi resistensi sekitar 30% terhadap semua *Staphylococcus aureus* (Zhang *et al.*, 2019).

Timbulnya resistensi terhadap berbagai antimikroba mendorong untuk perlu dilakukannya pencarian senyawa bioaktif baru yang aktif dalam menghambat bakteri pathogen. Pencarian senyawa bioaktif baru dilakukan untuk menghasilkan produk alami yang memiliki aktivitas farmakologi yang baik. Salah satu sumber penghasil antimikroba yang memiliki potensi adalah *actinomyecetes*. Actinomicetes telah dikenal menghasilkan produk metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologis yang berbeda beda yaitu diantaranya sebagai antiparasit (Elsayed *et al.*, 2017), antibakteri (Bibi *et al.*, 2020) dan antijamur (El-Amraoui *et al* , 2013).

Actinomycetes dapat diisolasi dari berbagai sumber yang berbeda salah satu diantaranya berasal dari sumber ekosistem laut. Ekosistem laut memiliki keanekaragaman hayati sangat besar juga kondisi fisiologis dan structure biologis dari mikroorganisme yang memungkinkan dapat bertahan dibawah tekanan, salinitas dan suhu. Spons salah satu metazoa kuno dari *filum porifera* tertua yang dapat bertahan hidup dengan berbagai cara dan pada kondisi lingkungan yang ekstrim (Brinkmann *et al.*, 2017).

Actinomycetes laut dapat diperoleh dari kelompok spons laut. Spons laut (filum Porifera) adalah komunitas mikroba yang berlimpah dan beragam mewakili salah satu dari komplek terbesar simbiosis dari asosiasi spons-mikroba (Sun *et al.*, 2015). Asosiasi mikroba menempati sekitar 40% dari volume spons yang memiliki konstribusi besar pada metabolisme inang melalui fotosintesis ataupun fiksasi nitrogen (Taylor *et al.*, 2007). Komunitas

mikroba yang terkandung pada spons termasuk bakteri simbion, archae dan eukariotik uniseluler (Hentschel *et al.*, 2012).

Telah dilaporkan bahwa ada lebih dari 22.000 metabolit sekunder mikroba yang diketahui, 70% di antaranya adalah diproduksi oleh actinomycetes, 20% dari jamur, 7% dari *Bacillus* spp. dan 1–2% oleh bakteri lain (Subramani and Aalbersberg, 2012). Beberapa penelitian lain telah dilakukan terkait actinomycetes dari spons laut diantaranya dilakukan oleh Rante yang telah menemukan Isolat actinomycetes yang termasuk *Streptomyces* sp. menghasilkan metabolit sekunder dan aktif terhadap bakteri *S.aureus* resisten antibiotik (Rante *et al.*, 2010).

Dari beberapa penelitian yang telah dipublikasikan menunjukkan bahwa actinomycetes laut memiliki potensi menghasilkan senyawa metabolit sekunder baru. Sebanyak 411 produk alami senyawa metabolit sekunder dari actinomycetes laut yang telah dilakukan karakterisasi dan 22% diantaranya diperoleh dari actinomycetes yang bersimbiosis dengan spons (Abdelmohsen *et al.*, 2014). Senyawa metabolit sekunder yang memiliki potensi terkait aktinomicetes diantaranya adalah *natamycin*, (Atta *et al.*, 2015), *deoxyuridines* (Li *et al.*, 2011).

Penelitian yang telah dilakukan Rante pada tahun 2020 telah melakukan isolasi actinomycetes yang diperoleh dari pulau barang caddi, Sulawesi Selatan dan beberapa jenis isolate didapatkan pada penelitian ini salah satunya adalah isolate actinomycetes BCD 2-02. Isolate Actinomycetes BCD 2-02 diduga memiliki senyawa metabolit sekunder

sebagai antibakteri (Rante *et al.*, 2020). Potensi Isolate actinomycetes BCD 2-02 yang diperoleh dari pulau barang caddi dapat dikembangkan untuk dilakukan beberapa identifikasi sehingga mendapatkan profil metabolit sekunder dari sampel actinomycetes.

Dari uraian di atas, tujuan penelitian ini dilakukan identifikasi untuk mendapatkan profile metabolit sekunder actinomycetes yang bersimbiosis dengan spons yang terletak di pulau barang caddi yang diharapkan dapat menjadi gambaran senyawa antimikroba yang memiliki potensi aktivitas farmakologi antimikroba yang baik dan salah satu upaya mengatasi permasalahan resistensi bakteri patogen.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan pada latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana aktivitas antibakteri metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat actinomycetes BCD 2-02?
2. Bagaimana profil metabolit sekunder yang dihasilkan oleh actinomycetes BCD 2-02?
3. Bagaimana karakterisasi molekuler isolate aktinomisetes berdasarkan gen 16S rRNA?

C. Tujuan penelitian

1. Menentukan aktivitas antibakteri metabolit sekunder dari isolat actinomycetes BCD 2-02 terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.
2. Menentukan profil metabolit sekunder dari isolat actinomycetes BCD 2-02 menggunakan instrument TLC Densitometri
3. Menentukan genus isolat actinomycetes BCD 2-02 menggunakan gen 16s rRNA.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pengembangan ilmu pengetahuan dibidang kesehatan, terkhusus dalam bidang mikrobiologi dan infeksi. Pemanfaatan bakteri yang berasosiasi dengan spons terkhusus actinomycetes yang banyak terdapat dalam spons sebagai antibakteri.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

A. Actinomycetes

Actinomycetes sebagai sumber penting senyawa bioaktif alami. Dari sekitar 18.000 senyawa bakteri bioaktif yang dikenal saat ini, lebih dari 10.000 telah diproduksi oleh actinomycetes dari genus *Streptomyces* selama 70 tahun terakhir. Banyak antibiotik yang tersedia secara komersial seperti tetrasilicin, eritromisin, vankomisin, dan streptomisin berasal dari metabolisme sekunder bakteri Actinomycetes. Selain itu, actinomycetes juga menghasilkan banyak metabolit non-antibiotik, seperti enzim, penghambat enzim, pengatur imunologi, antioksidan. reagen dan sebagainya (Sofariyanti *et al.*, 2019).

Actinomycetes adalah bakteri gram positif dengan kadar guanin dan sitosin yang tinggi dan memiliki morfologi jamur. Kelompok bakteri ini memiliki sifat fisiologis, biokimia, dan struktur sel spesifik yang beradaptasi dengan tekanan lingkungan (tekanan, salinitas, dan suhu), yang diwujudkan dengan produksi metabolit senyawa bioaktif, sehingga aktinomisetes digunakan sebagai sumber metabolit sekunder dengan aktivitas biologis yang berbeda (Retnowati *et al.*, 2017) .

Secara umum, actinomycetes biasanya dibagi menjadi dua kelompok. Kelompok pertama adalah *Streptomyces* dan yang kedua disebut Actinomycetes yang langka. *Streptomyces* adalah genus paling dominan dalam clade Actinomycetes dan kemampuan genus ini untuk menghasilkan

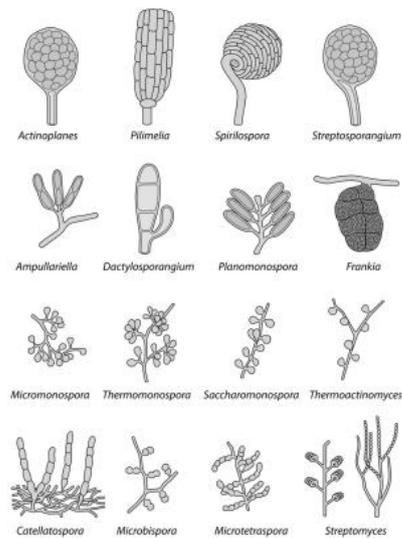
senyawa bioaktif telah dipelajari secara ekstensif. Sedangkan Actinomycetes yang langka, istilah yang digunakan untuk menyebut genera selain Streptomyces. Actinomycetes langka terdiri dari 201 genera dan relatif lebih sulit diisolasi dan pertumbuhannya lebih lambat daripada Streptomyces (Nurkanto and Agusta, 2015); (Krismawati *et al.*, 2015).

1. Miselium

Actinomycetes membentuk miselium substrat dan dapat berdiferensiasi pada permukaan padat untuk membentuk hifa udara yang cenderung menghasilkan spora reproduksi. Miselium substrat terbentuk dari pertumbuhan spora yang berkecambah. Miselium substrat bercabang sering monokotil, tetapi dalam kasus yang jarang terjadi, seperti *Thermoactinomyces*, bercabang dikotil. Selain itu, family Micromonosporaceae menghasilkan miselium substrat yang luas dengan atau tanpa miselium aerial rudimenter (Barka *et al.*, 2016)

2. Spora

Spora sangat penting dalam taksonomi actinomycete. Tahap awal sporulasi pada beberapa aktinomisetes oligosporus dapat diidentifikasi dengan proses tunas. Spora dapat terbentuk pada substrat dan/atau miselium udara sebagai sel tunggal atau dalam rantai dengan panjang yang bervariasi.



Gambar 1. Bentuk spora yang diproduksi oleh Actinomycetes (Barka et al., 2016)

Jumlah rantai spora sangat bervariasi dari genus ke genus. genus Mikromonospora, Salinispora, Thermomonospora, Saccharomonospora, dan Promicromonospora menghasilkan spora yang terisolasi, sedangkan Microbispora menghasilkan spora dalam pasangan longitudinal. Anggota marga Actinomadura, Saccharopolyspora, Sporichthya, dan beberapa Nocardia spp (Barka *et al.*, 2016).

B. Fase pertumbuhan mikroorganisme

Pertumbuhan mikroorganisme dibagi ke dalam beberapa fase sebagai berikut (Djide dan Sartini, 2014).

1. Fase Permulaan

Pada fase ini, mikroorganisme melakukan penyesuaian diri terhadap lingkungan yang baru. Pertumbuhan lebih lanjut dapat terjadi karena berbagai macam enzim dan zat perantara dibentuk pada fase ini.

1. Fase Pertumbuhan Dipercepat

Pada fase ini mikroorganisme akan mulai melakukan pembelahan diri namun waktu generasinya masih panjang. Fase permulaan dan fase pertumbuhan yang dipercepat sering disebutkan sebagai *lag phase*.

2. Fase Pertumbuhan Logaritma

Pada fase ini, kecepatan pertumbuhan paling cepat serta waktu generasinya singkat dan konstan. Sintesa bahan sel sangat cepat dan konstan. Keadaan ini terus terjadi hingga salah satu hingga beberapa nutrisi habis atau terjadinya penimbunan zat-zat yang bersifat racun hasil metabolisme sehingga pertumbuhan mikroorganisme terhambat.

3. Fase Pertumbuhan Diperlambat

Fase ini, pertumbuhan mikroorganisme mulai terhambat karena nutrisi yang dibutuhkan sudah berkurang atau zat-zat yang bersifat racun hasil metabolisme tertimbun.

4. Fase Stasioner atau Fase Konstan

Pada fase ini, pertumbuhan mikroorganisme sudah terhambat dan terjadi pengurangan karena nutrisi yang dibutuhkan sudah berkurang atau zat-zat yang bersifat racun hasil metabolisme tertimbun yang menyebabkan jumlah mikroorganisme yang mati dan hidup sama.

5. Fase Kematian yang Dipercepat atau Fase Kematian Logaritma

Kedua fase ini sering disebut sebagai fase penurunan kematian, pada fase ini kecepatan membelah menjadi nol sedangkan kecepatan kematian terus meningkat. Bila sampai ke fase kematian logaritma maka

kecepatan kematian menjadi maksimum.

C. Mikroba Uji

1. *Staphylococcus aureus*

Berikut taksonomi dari klasifikasi *Staphylococcus aureus*.

(Rachmawaty *et al.*, 2009)

Kingdom	: Procaryota
Divisio	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Order	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk kokus, bersifat non-motil, non-spora, dan anaerob fakultatif. Bakteri *S. aureus* menyerupai bola dengan garis tengah \pm 1 mikrometer dan dapat tersusun menyerupai buah anggur, empat-empat (tetrad), membentuk rantai (3-4 sel), berpasangan atau satu-satu. Bakteri *S. aureus* tumbuh pada suhu 6,5-46°C dan pH 4,2-9,3. Koloninya tumbuh dengan diameter mencapai 4 mm dalam waktu 24 jam. Bentuk koloni berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau pada perbenihan padat. Bakteri *S. aureus* membentuk koloni yang berwarna abu-abu sampai kuning emas tua

(Dewi, 2013).

D. Uji Aktivitas AntiMikroba

1. Uji Aktivitas Antimikroba

Pengujian aktivitas antimikroba secara *in vitro* dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode dilusi (Balouiri *et al.*, 2016)

1.1 Metode Difusi

Metode difusi terbagi menjadi tiga yaitu metode difusi-cakram agar, metode gradien antimikroba (Etest), dan metode-metode difusi lainnya.

1. Metode Difusi-cakram Agar

Dalam prosedur terkenal ini, pelat agar diinokulasi dengan inokulum standar dari mikroorganisme uji. Lalu, kertas cakram (berdiameter sekitar 6 mm) berisi senyawa uji pada konsentrasi yang diinginkan, ditempatkan pada permukaan agar-agar. Cawan petri diinkubasi dalam kondisi yang sesuai. Umumnya, agen antimikroba berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji dan kemudian diameter zona pertumbuhan penghambatan diukur.

2. Metode gradien Antimikroba

Metode gradien antimikroba menggabungkan prinsip metode pengenceran dengan metode difusi untuk menentukan nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*). Ini didasarkan pada kemungkinan menciptakan gradien konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam

media *agar plate*. Metode ini digunakan untuk penentuan MIC antibiotik, antijamur dan antimikobakteri.

3. Metode-metode difusi yang lain

Metode difusi lebih lanjut digunakan pada laboratorium penelitian mikrobiologi untuk menyaring ekstrak, fraksi atau zat murni untuk mengetahui potensi antimikroba atau untuk menyelidiki antagonisme antara mikroorganisme. Di antara metode ini, yang paling umum ialah metode difusi well agar, difusi plug agar, dan garis-silang.

1.2 Metode Dilusi

Metode pengenceran adalah yang paling tepat untuk menentukan nilai MIC, karena metode ini memungkinkan untuk memperkirakan konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam agar (pengenceran agar) atau media kaldu (pengenceran makro atau pengenceran mikro). Metode pengenceran kaldu atau agar dapat digunakan untuk mengukur secara kuantitatif aktivitas antimikroba in vitro terhadap bakteri dan jamur. Nilai MIC yang tercatat kemudian didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari agen antimikroba yang diuji yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang diuji, dan biasanya diekspresikan dalam mg/mL atau mg/L.

E. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah teknik pemisahan yang melibatkan beberapa langkah. Pertama, larutan yang terbuat dari sampel diaplikasikan

ke pelat berlapis. Pelarut pembawa larutan sampel menguap dan mengendapkan sampel di tempat atau zona kecil di asal pelat. Pelat kemudian ditempatkan dalam bejana tertutup yang berisi sejumlah kecil campuran pelarut yang sesuai. Saat campuran pelarut bergerak ke atas pelat dengan aksi kapiler, komponen dari sampel bergerak naik pada laju yang berbeda karena interaksinya dengan lapisan pada pelat (fase diam) dan sistem pelarut yang bergerak (fase gerak). Proses ini disebut pengembangan pelat. Pelat dikembangkan untuk mencapai titik atau pita yang terpisah. Pelat kemudian dikeluarkan dari sistem pelarut, dan komponen sampel divisualisasikan. Ini biasanya melibatkan mereaksikan komponen dengan reagen yang menghasilkan bintik-bintik yang terlihat atau berpendar ketika diamati di bawah sinar normal atau ultraviolet. Pola bintik yang terlihat pada sampel pengikat ini disebut kromatogram (Striegel and Hill, 1996).

Kromatografi lapis tipis umumnya dianggap sebagai metode yang sederhana, cepat, dan murah untuk pemisahan, identifikasi tentatif, dan penilaian semikuantitatif visual dari berbagai macam zat. Kromatografi lapis tipis memiliki banyak keunggulan dibandingkan kromatografi kertas, yang terbatas pada penggunaan selulosa sebagai fase diam. KLT menggunakan berbagai lapisan sorben yang menawarkan resolusi, kecepatan, dan sensitivitas yang superior. Tujuan utama Kromatografi lapis tipis adalah untuk memisahkan atau menyelesaikan komponen campuran. Seperti yang diterapkan pada analisis media pengikat, sampel

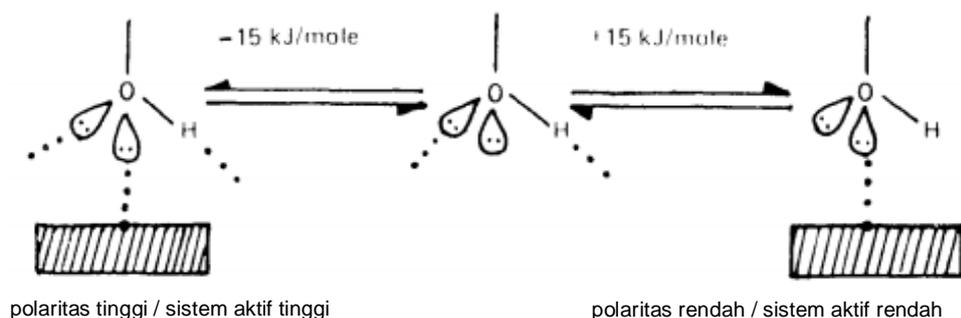
adalah campuran blok atau senyawa kimia. Kromatogram sampel dapat dikarakterisasi berdasarkan jumlah dan lokasi bintik atau zona. Dengan membandingkan kromatogram sampel dengan kromatogram dari bahan referensi yang diketahui, sampel dapat diidentifikasi. Pemisahan kimiawi dengan KLT dihasilkan dari interaksi molekul dengan fase diam dan fase gerak. Sistem pelarut berkembang atau fase gerak adalah media transportasi untuk komponen sampel yang akan dipisahkan saat mereka bermigrasi melalui fase diam oleh gaya kapiler. Saat sistem pelarut bergerak ke atas melalui pelat, komponen dipengaruhi oleh dua gaya yang berlawanan, gaya penggerak fase gerak dan aksi resistif atau perlambatan dari sorben. Gaya penggerak cenderung menyebabkan komponen bergerak ke arah aliran fase gerak, dan gaya resistif menghalangi gerakan ini dengan menarik komponen keluar dari aliran fase gerak dan menahannya pada fase diam dengan adsorpsi. Jadi, setiap molekul mengikuti jalur "*stop-and-go*" melalui lapisan sorben. Di akhir pengembangan, setiap titik komponen telah menempuh jarak tertentu. Komponen yang tertarik lebih kuat ke lapisan sorben akan menempuh jarak yang lebih pendek, sedangkan komponen yang lebih larut dalam fase gerak akan menempuh jarak yang lebih jauh dari asalnya. Bintik-bintik menjadi lebih besar ukurannya karena fluktuasi pergerakan molekul individu (Striegel and Hill, 1996)

Pada lempeng tipis (20x20 cm, 10x20 cm, 5x20 cm, tebal 0,2 mm) cuplikan biasanya ditotolkan sebagai bercak bulat atau garis, 1,5-2 cm dari

tepi bawah, bercak sebaiknya berukuran sama dan mempunyai diameter 3-6 mm. Penotolan dapat dilakukan dengan mikropipet dengan “microsyringe”, biasanya diperlukan 1-20 μL . Volume lebih dari itu dapat ditotolkan bertahap dalam bagian-bagian kecil dengan pengeringan di antara penotoloan itu (Saifuddin, 2010). Migrasi komponen dalam kromatogram dapat dikarakterisasi dengan parameter dasar yang disebut nilai R_f . Ini dihitung sebagai rasio jarak yang digerakkan oleh zat terlarut (komponen), dengan jarak yang digerakkan oleh fasa gerak (Striegel and Hill, 1996).

F. High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)

HPTLC adalah teknik lapisan tipis yang masih mengalami peningkatan dan mengalami popularitas. HPTLC melibatkan aksi gabungan dari beberapa variabel, termasuk:

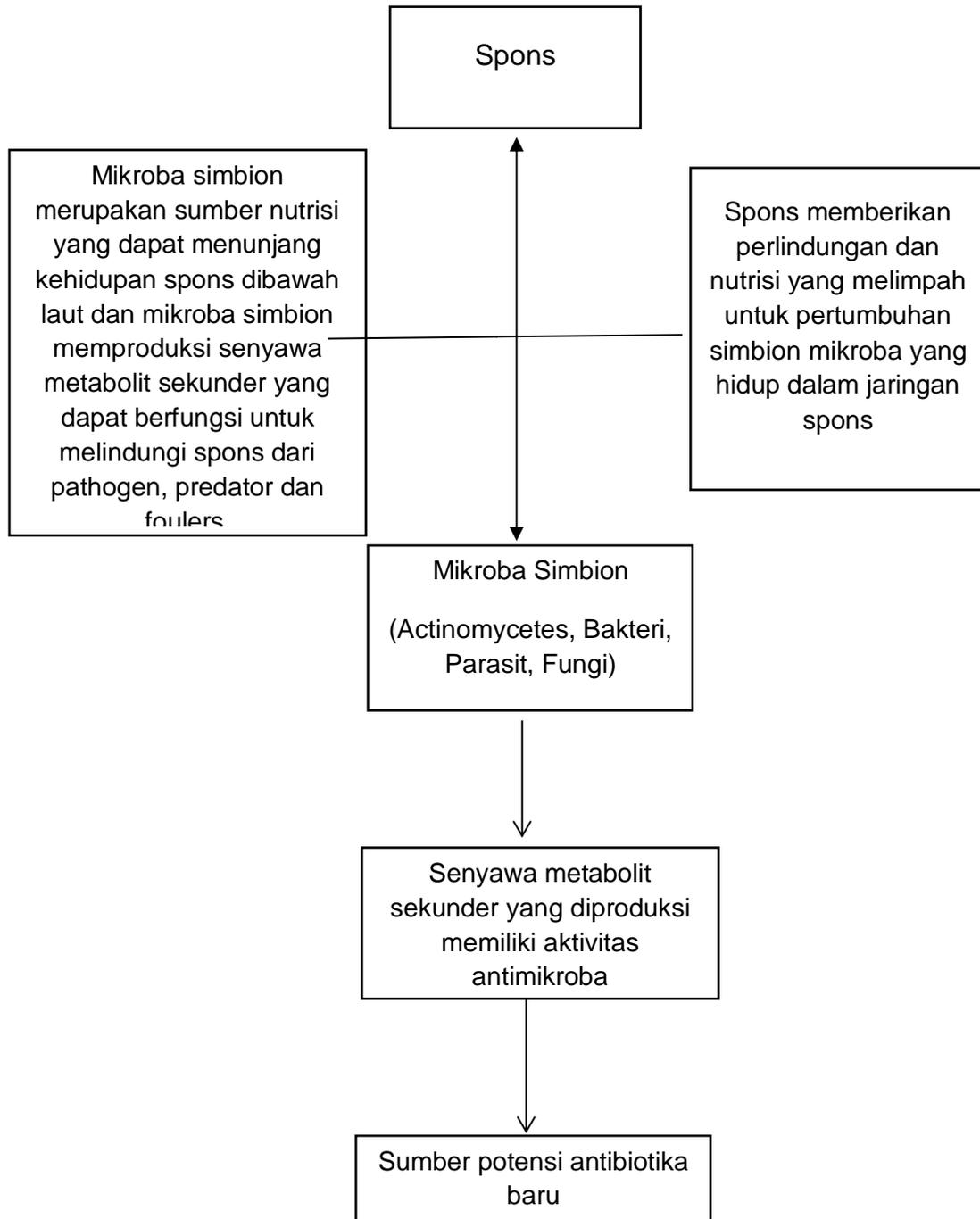


Gambar 2. Posisi gugus OH dalam sistem kromatografi berbeda sehubungan dengan aktivitas sorben dan polaritas fase gerak (Sherma and Fried, 1996).

Bahan pelapis fase diam yang digunakan memiliki daya pemisah yang lebih baik dari bahan pemisah HPLC karena permukaan lapisan tipis yang

seragam secara menyeluruh. Hal ini dapat dicapai dengan menggunakan bahan penyerap partikulat halus dalam mode adsorpsi, atau pembawa SiO_2 tak berpori yang sangat halus dan bulat dengan fasa kimia terikat dalam mode partisi. Padatan mikropartikel ini juga menunjukkan distribusi yang sempit dari dimensi partikel (semua partikel berukuran hampir sama), yang memungkinkan kepadatan pengemasan lapisan HPTLC yang jauh lebih besar dibandingkan dengan yang normal. Dengan demikian, seseorang dapat dengan mudah memahami bahwa peningkatan kinerja HPTLC terutama disebabkan oleh penurunan jumlah diameter partikel (*diameter of particle*) dan fungsi jarak (*distance function*) bila dibandingkan dengan kromatografi lapis tipis biasa. Dengan kata lain, HPTLC memanfaatkan penurunan kuantitas atom hydrogen (Sherma and Fried, 1996).

G. Kerangka Teori



H. Kerangka Konsep

