

**USAHA ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ANTIBIOTIKA
DARI AGAR - AGAR HALUS (*Eucheuma spinosum* Ag)
YANG MENGANDUNG MIKROBA**

Oleh

ABDULLAH

8403100



PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS HASANUDDIN	
Tgl. terima	13 - 04 - 95
Asal dari	-
Banyaknya	1 Ex p
Harga	H.
No. Inventaris	951705108
No. Klas	

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

1990

S K R I P S I

OLEH

ABDULLAH

8403100



FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

1990



USAHA ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ANTIBIOTIKA
DARI AGAR-AGAR HALUS (Eucheuma spinosum Ag)
YANG MENGANDUNG MIKROBA

OLEH

ABDULLAH

8403100

Skripsi untuk melengkapi tugas dan
memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar sarjana

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN

1990

USAHA ISOLASI DAN IDENTIFIKASI ANTIBIOTIKA
DARI AGAR-AGAR HALUS (Eucheuma spinosum Ag)
YANG MENGANDUNG MIKROBA

Disetujui Oleh
Pembimbing Utama



(Dr. Tadjuddin Naid, M.Sc)

Pembimbing Pertama



(Dra. Jeanny Wunas, MS)

Pembimbing Kedua



(Drs. Hasyim Bariun)

Pada tanggal :

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWA karena berkat dan rahmatnya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.


Atas segala bimbingan, petunjuk maupun saran serta fasilitas yang kami dapatkan selama ini, kami menyampaikan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. Bapak Dr. Tadjuddin Naid, M.Sc sebagai pembimbing utama.
2. Ibu Dra. Jenny Wunas sebagai pembimbing pertama.
3. Bapak Drs. Hasyim Bariun sebagai pembimbing kedua.

Yang telah membantu kami sejak dari penelitian hingga selesainya penyusunan skripsi ini.

Tak lupa kami ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Dr. Zainuddin Hafsah, M.Sc, Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
2. Bapak Dr. Abd. Rauf Patong, M.Sc, Pembantu Dekan I Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
3. Ibu Dra. Susanti Said, Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
4. Bapak Drs. Moh. Hasbi sebagai penasehat akademik.
5. Ibu Dra. Roswita Abbas, Kepala Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

- 
6. Bapak Drs. M. Natsir Djide, MS yang telah banyak memberikan saran-saran yang sangat berharga.
 7. Bapak-bapak dosen, Ibu-ibu dosen serta rekan-rekan mahasiswa yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu.

Teristimewa buat mama tercinta serta keluarga yang selama ini selalu mendoakan dan memberi dorongan moril serta bantuan materil yang sangat berharga hingga kami dapat mengikuti pendidikan hingga selesainya skripsi ini, kami ucapkan banyak terima kasih.

Ujung Pandang, April 1990

Penyusun

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai isolasi dan identifikasi antibiotika dari agar-agar halus (Eucheuma spinosum Ag) yang mengandung mikroba dengan menggunakan metoda fermentasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat koloni sel yang memberikan daerah hambatan di sekitarnya.

Hasil pengamatan dengan pemantauan setiap 12 jam menunjukkan adanya kenaikan daya hambat terhadap bakteri uji setelah 120 jam, setelah 148 jam memperlihatkan daya hambat yang menurun dengan menggunakan metoda difusi. Sedangkan perubahan pH selama fermentasi terlihat adanya penurunan pH 7,5 hingga 3,0.

Pemisahan komponen kimia dari ekstrak n-butanol secara kromatografi lapis tipis dengan cairan pengelusi CHCl_3 : MeOH (5 : 15) menunjukkan 3 noda dengan penampak noda H_2SO_4 10 % dan sinar ultra violet. Sedangkan pemisahan komponen kimia dari ekstrak kloroform secara kromatografi lapis tipis dengan cairan pengelusi CHCl_3 : MeOH : air (3 : 2 : 1) menunjukkan 2 noda dengan penampak noda H_2SO_4 10 % dan 1 noda dengan penampak noda lampu ultra violet.

Dari hasil pengamatan menunjukkan bahwa komponen pertama dengan Rf 0,85 dari ekstrak n-butanol dan komponen pertama dengan Rf 0,76 dari ekstrak kloroform memberikan daya hambat terhadap bakteri uji sedangkan komponen lainnya tidak.

Hasil identifikasi komponen aktif dari ekstrak n-butanol secara spektroskopi infra merah menunjukkan adanya gugus -OH pada bilangan gelombang 3450 cm^{-1} , gugus CH_3 pada bilangan gelombang 2900 cm^{-1} , gugus -COOH pada bilangan gelombang 1735 cm^{-1} dan gugus C-C pada bilangan gelombang 1600 cm^{-1} . Sedangkan komponen kimia aktif dari ekstrak kloroform secara spektroskopi infra merah menunjukkan adanya gugus -OH pada bilangan gelombang 3400 cm^{-1} , gugus CH_3 pada bilangan gelombang 2900 cm^{-1} , gugus -COOH pada bilangan gelombang 1730 cm^{-1} dan gugus C=C pada bilangan gelombang 1600 cm^{-1} .

ABSTRACT

The isolation and identification antibiotic from sango-sango microorganism (Eucheuma spinosum Ag) with fermentatio method. Has been done the examination indicated a colony product clear area about it.

With a 12 hours to indicated villicle antibiotic action to test battery 120 hours and after 148 hours to indicated reduced antibiotic action with diffusion method. Whereas the change always fermentation is pH 7,5 to pH 3,0

The n-butanol extract to thin layer chromatography with CHCl_3 -MeOH (5:15) to indicated 3 spot with 10 % of H_2SO_4 and ultra violet as stain looked. Whereas isolated component of chloroform extract to thin layer chromatography with CHCl_3 -MeOH- H_2O (3:2:1) to indicated 2 spot with 10 % of H_2SO_4 and 1 spot with ultra violet.

The first component from n-butanol extract, Rf 0,85 and the first coponent from chloroform extract, Rf 0,76 gived antibiotic action to test battery. The else component anchter not.

Identification of the active component from n-butanol extract with infra red spectroscopy to indicated -OH at 3450 cm^{-1} , CH_3 at 2900 cm^{-1} , -COOH at 1735 cm^{-1} , and C-C at 1600 cm^{-1} . Whereas active component from chloroform extract with infra red spectroscopy to indicated -OH at 3400 cm^{-1} , CH_3 at 2900 cm^{-1} , -COOH at 1730 cm^{-1} , and C-C at 1600 cm^{-1} .

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. POLA PENELITIAN	3
BAB III. TINJAUAN PUSTAKA	4
III.1 Uraian Tanaman.....	4
3.1.1 Klasifikasi tanaman	4
3.1.2 Nama daerah	4
3.1.3 Morfologi tanaman	4
3.1.4 Kegunaan	5
3.1.5 Kandungan rumput laut	6
III.2 Antibiotika	
III.3 Pengujian Secara Mikrobiologis	7
3.3.1 Metoda difusi	7
3.3.2 Metoda pengenceran	8
III.4 Bakteri Uji yang Digunakan	9
3.4.1 Staphylococcus aureus	11
3.4.2 Escherichia coli	10

BAB IV. PENELITIAN DAN HASIL PENELITIAN	11
IV.1 Alat dan Bahan yang digunakan	11
4.1.1 Alat- alat	11
4.1.2 Bahan-bahan	11
IV.2 Penyediaan dan Sterilisasi alat dan bahan yang digunakan	13
4.2.1 Sterilisasi alat-alat	13
4.2.2 Pembuatan medium	14
IV.3 Cara Kerja	17
4.3.1 Pengambilan contoh	17
4.3.2 Pengolahan contoh	17
4.3.3 Isolasi dan pembiakan mikroba rumput laut pada media agar	17
4.3.4 Seleksi biakan	18
4.3.5 Fermentasi biakan murni	18
4.3.6 Pemeriksaan aktifitas antibioti- ka dengan metoda difusi	18
4.3.7 Isolasi dan identifikasi	19
BAB V. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	22
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	26
VI.1 Kesimpulan	26
VI.2 Saran-saran	26

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hasil kromatografi lapis tipis ekstrak n-butanol	29
2. Hasil kromatografi lapis tipis ekstrak klo- roform	30
3. Hasil pengamatan isolat mikroba dari agar-agar	31
4. Hasil pengamatan daya hambat isolat terhadap kontaminan	32
5. Hasil pengamatan aktivitas antibiotika terhadap bakteri uji dengan pengocokan 148 jam.....	33
6. Hasil pengamatan aktivitas antibiotika komponen aktif terhadap bakteri uji	34
7. Hasil pengamatan aktivitas antibiotika komponen aktif terhadap bakteri uji	35
8. Bagan isolat komponen kimia	36
9. Grafik hubungan antara lamanya fermentasi de- ngan diameter hambatan terhadap bakteri uji....	37

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
I. Hasil pengamatan perubahan pH dan aktifitas antibiotika	26
II. Hasil pengamatan aktifitas antibiotika dari ekstrak	27
III. Hasil pengamatan aktifitas antibiotika dari komponen-komponen kimia dari ekstrak	28



BAB I

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negeri yang sangat dikagumi akan keadaan alamnya, disamping kekayaan alam yang digali dan dimanfaatkan secara langsung, masih banyak kekayaan alam yang harus diolah sehingga dapat dimanfaatkan lebih luas dan multi guna.

Salah satu kekayaan alam yang terdapat di Indonesia adalah tumbuh-tumbuhan yang mempunyai banyak manfaat misalnya sebagai bahan makanan, pakaian, obat-obatan bahkan dapat menjadi komoditi ekspor non migas.

Tumbuhan budidaya yang banyak dibudidayakan oleh masyarakat Indonesia utamanya masyarakat daerah pantai adalah rumput laut. Tumbuhan ini banyak digunakan sebagai bahan makanan, kosmetik, pakaian dan lain-lain.

Penelitian kandungan kimia tumbuhan ini telah banyak dilakukan oleh peneliti-peneliti terdahulu, misalnya karbohidrat, kadar air, protein, dan lain sebagainya (1).

Dari segi mikrobiologis juga telah diteliti mengenai mikroorganisma yang terdapat dalam sel rumput laut tersebut. Begitu pula yang ada hubungannya dengan antibiotika telah dilakukan sebelumnya. Namun belum dijelaskan secara terinci mengenai antibiotika dari rumput laut tersebut (2,3).

Dari hal tersebut di atas maka perlu diteliti kemungkinan terdapatnya antibiotika dari agar-agar halus yang

mengandung mikroba dengan menggunakan metoda fermentasi, kemudian diuji daya hambatnya terhadap bakteri uji dengan menggunakan metoda difusi.

Isolasi dan identifikasi komponen kimia yang terdapat pada kultur cair dari hasil fermentasi dipisahkan dengan menggunakan cairan pengestraksi yang tidak bercampur dengan air, kromatografi lapis tipis, serta analisa spektroskopi infra merah.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi ilmiah, meliputi data kimia serta aktivitas antibiotika dari agar-agar halus (Eucheuma spinosum Ag), demi untuk pengembangan produksi bahan baku antibiotika dalam negeri.

BAB II
POLA PENELITIAN

II.1 Pengambilan contoh dan pengolahan contoh

Contoh diambil secara acak di tempat budidaya rumput laut.

II.2 Isolasi dan pembiakan mikroba rumput laut

Suspensi mikroba ditanam dalam media agar.

II.3 Seleksi biakan

Koloni yang tumbuh diseleksi, kemudian dimurnikan.

II.4 Fermentasi biakan murni

Biakan murni difermentasikan dalam medium cair.

II.5 Pemeriksaan aktifitas antibiotik dengan metode difusi

Kaldu fermentasi dimasukkan dalam pencadangan yang sudah diletakkan pada medium mikroba uji.

II.6 Isolasi dan identifikasi

II.6.1 Ekstraksi kaldu fermentasi dengan n-butanol dan kloroform.

II.6.2 Pemisahan komponen kimia dengan metoda kromatografi lapis tipis.

II.6.3 Pengujian kemurnian.

II.6.4 Identifikasi zat murni hasil isolasi.

BAB III
TINJAUAN PUSTAKA

III.1 Uraian Tanaman

III.1.1 Klasifikasi tanaman (4)

Divisi	: Thallophyta
Sub divisi	: Algae
Kelas	: Rhodophyceae
Sub kelas	: Alorideae
Bangsa	: Nemastodeales
Suku	: Rhodohyllydaceae
Jenis	: <u>Eucheuma spinosum</u>

III.1.2 Nama daerah (1,4)

Bugis	: Sango-sango
Jawa	: Kades, ganggang, rambu kasang
Bali	: Bulung
Lombok	: Lelaso
Maluku	: Arien
Kep.Seribu	: Agar-agar hahe

III.1.3 Morfologi tanaman (1,2,5)

Rumput laut termasuk golongan algae yaitu kelompok tumbuhan berklorofil yang terdiri dari satu sel atau banyak sel, bentuk koloni, hidupnya bersifat bentik pada tempat-tempat yang perairannya dangkal dan dasar

perairannya berpasir, berlumpur, atau pasir berlumpur, talusnya berbentuk agak pipih dan bercabang-cabang, kadang-kadang pola percabangannya teratur. Jumlah setiap percabangannya adalah dua (*dichotomae*) atau tiga (*trichomae*), dan bentuk dari setiap ujung percabangannya ada yang runcing dan ada yang tumpul.

Permukaan kulitnya agak kasar, karena mempunyai gerigi dan bantil-bantil besar. Warna talusnya berkisar dari kuning kecoklatan hingga merah keunguan.

III.1.4 Kegunaan (1,2,5,)

Selama ini, rumput laut dimanfaatkan untuk makanan manusia, baik dimakan secara langsung sebagai sayur atau lalab, maupun diproses terlebih dahulu menjadi agar-agar. Akan tetapi dengan semakin berkembangnya kemajuan ilmu pengetahuan, pemanfaatan rumput laut bagi kepentingan umat manusia tidak lagi terbatas hanya sebagai bahan makanan saja, tetapi juga digunakan sebagai bahan baku pada industri obat-obatan, tekstil, minuman, kosmetik, pasta gigi, dan lain sebagainya. Dengan demikian prospek rumput laut sebagai komoditi perdagangan akan semakin cerah, baik untuk memenuhi pasar dalam negeri maupun kebutuhan ekspor keluar negeri.

III.1.5 Kandungan rumput laut (1,2,5)

Menurut para ahli perikanan rumput laut banyak mengandung karbohidrat, protein, vitamin dan mineral, selain itu dari segi mikrobiologi juga mempunyai arti penting karena di dalam membran sel dari rumput laut tersebut dapat mengandung bakteri.

III.2 Antibiotika (6,7)

Antibiotika yang pertama kali ditemukan adalah penicilin dari Penicillium notatum oleh Alexander Fleming pada tahun 1929, tetapi dalam hal ini belum berarti sebagai pengobatan praktis, sebelum Florey dan kawan-kawan di Oxford pada tahun 1940 melaksanakan penerapan antibiotika dalam terapi.

Istilah antibiotika sendiri diturunkan oleh Woksman dari perkataan antibiose. Antibiose mula-mula digunakan oleh Vaulling pada tahun 1889 (secara harfiah = melawan kehidupan). Dalam konsep biologis diartikan suatu organisme yang dapat menghancurkan yang lainnya untuk kelanjutan hidupnya sendiri. Dari kata dasar inilah berkembang istilah antibiotika.

Menurut Woksman antibiotika adalah bahan yang digunakan oleh mikroorganisma yang mempunyai kemampuan menginhibisi pertumbuhan atau membasmi mikroorganisma lain. Sedangkan menurut Benidict dan Langlyke, antibiotika adalah suatu senyawa kimia yang diturunkan atau diproduksi oleh organisme hidup yang dalam

konsentrasi kecil mempunyai kemampuan untuk menginhibisi proses kehidupan mikroorganisme. Oleh karena itu mengingat definisi yang diuraikan oleh Benidict dan Langlyke maka suatu senyawa dikatakan antibiotika apabila :

- a. Merupakan produk metabolisme
- b. Merupakan produk sintetik yang dihasilkan sebagai analog struktur suatu antibiotika yang terdapat di alam.
- c. Efektif dalam konsentrasi kecil
- d. Mengantagonis pertumbuhan species mikroorganisma satu atau lebih.

III.3 Pengujian secara mikrobiologis (8,9,10)

Pemeriksaan secara mikrobiologis dari bahan-bahan khemoterapeutik seperti antibiotika, antiseptika dan desenfektansia dapat dilakukan dengan cara penentuan kemampuan daya hambat (antimikroba) terhadap jenis mikroba uji.

Pada umumnya cara-cara pengujian aktifitas antibiotika dapat dilakukan dengan metoda difusi atau dengan metoda pengenceran.

III.3.1 Metoda difusi (diffusion method)

Pada metoda ini kemampuan zat antimikroba ditentukan berdasarkan daerah hambatan yang terjadi. Pada dasarnya pengujian senyawa antimikroba dapat dilakukan dengan :

a. Cara difusi pelat selinder

Cara ini didasarkan atas pengukuran daerah hambatan yang dibentuk oleh larutan contoh terhadap pertumbuhan dari mikroorganisma.

b. Cara difusi dengan pelat mangkok

Prinsip dan cara kerja dari cara ini sama dengan cara pelat selinder. Perbedaannya adalah disini menggunakan alat berupa "Cup plate" yaitu lubang atau semacam mangkok yang dibuat langsung pada media agarnya.

c. Cara difusi dengan kertas saring

Cara ini menggunakan kertas saring yang dibuat dengan bentuk serta ukuran tertentu, biasanya berbentuk bulat dengan diameter 0,7 - 1,00 cm. Kertas saring tersebut dicelup ke dalam larutan contoh, kemudian diletakkan di atas media agar yang telah diinokulasikan dengan mikroba uji. Pengamatan dilakukan setelah masa inkubasi dengan melihat daerah hambatan yang terjadi.

III.3.2. Metoda pengenceran (dilution method)

Pada metoda ini digunakan sejumlah bahan antimikroba dengan tingkat kadar yang berbeda-beda sesuai yang ditetapkan.

Pengenceran secara seri dalam kaldu (serial dilution method in broth). Dengan cara ini menggunakan sejumlah urutan tabung yang diisi



medium kaldu cair dengan sejumlah bahan anti mikroba dalam kadar yang berbeda-beda kemudian diinokulasikan mikroba uji. Potensi antimikroba dapat diketahui dengan melihat kekeruhan yang terjadi akibat pertumbuhan mikroba uji. Kekeruhan akan berbeda-beda pula sesuai dengan kadar antimikroba, serta dapat diukur dengan menggunakan fotoelektrik kolorimeter. Kemudian dibandingkan dengan kekeruhan yang terjadi pada zat antimikroba pembanding yang mendapat perlakuan sama.

III.4 Bakteri uji yang digunakan

III.4.1 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif, berberbentuk bulat dengan diameter 0,8-0,9 μ , terdapat bergerombol seperti buah anggur, ada juga letaknya berserakan, tidak bergerak, tidak tahan asam, di atas perbenihan padat dapat berupa koloni bulat dengan diameter 1-2 mm, sedikit cembung, amorf dan tidak transparan. Biasanya terdapat di permukaan kulit, saluran pernapasan bagian atas, jalan air kencing dari kandung kemih, mulut, hidung, jaringan kulit bagian dalam bisul bernanah, infeksi luka, radang paru-paru dan selaput lendir lainnya. Dapat tumbuh pada suhu 10-45 °C atau 12-45 °C. Suhu optimum 37 °C. pH optimum antara 7,4-7,6.

III.4.2 Escherichia coli

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif dengan flagel peritrik atau tidak bergerak, hidup fakultatif anaerob, dapat meragikan laktosa dan menghasilkan gas, ditemukan dalam saluran pencernaan manusia, hewan vertebrata air, tanah dan bahan organik. Suhu optimum 37 °C.

BAB IV

PENELITIAN DAN HASIL PENELITIAN

IV.1 Alat dan Bahan yang digunakan

IV.1.1 Alat-alat

1. Alat pengocok
2. Bejana KLT
3. Batang pengaduk
4. Cawan petri (Pyrex)
5. Erlenmeyer (Pyrex)
6. Gelas piala (Pyrex)
7. Gelas obyek
8. Gelas penutup
9. Gelas ukur (Pyrex)
10. Inkubator (Memmert)
11. Jarum ose
12. Jarum suntik
13. Kapas
14. Kertas saring
15. Kertas perkamen
16. Lampu spiritus
17. Lampu UV
18. Lemari pengering (Memmert)
19. Lemari pendingin
20. Mikroskop
21. Otoklaf (Mic-wic)

- 22. Penangas air
- 23. Pencadang
- 24. Tabung reaksi
- 25. Timbangan analitik (Sartorius)

IV.1.2 Bahan-bahan

- 1. Asam klorida p.a (E.Merck)
- 2. Etanol p.a (E.Merck)
- 3. Air suling
- 4. Bakteri uji
- 5. Beef ekstrak (Difto)
- 6. Contoh rumput laut
- 7. Eter p.a (E.Merck)
- 8. Glukosa p.a (E.Merck)
- 9. Indikator universal
- 10. Isobutanol p.a (E.Merck)
- 11. Kloroform p.a (E.Merck)
- 12. Medium Potato Dextrose Agar (Difto)
- 13. Medium Plate Count Agar (Difto)
- 14. Medium Glukosa Nutrien Agar (Difto)
- 15. Maltosa p.a (E.Merck)
- 16. Metanol p.a (E.Merck)
- 17. Natrium klorida p.a (E.Merck)
- 18. Natrium hidroksida p.a (E.Merck)
- 19. n-butanol p.a (E.Merck)
- 20. Silika gel GF dan G 60
- 21. Tepung kedelai
- 22. Yeast akstrak (Difto)

IV.2 Penyediaan dan Sterilisasi alat dan bahan yang digunakan (11,12,13)

IV.2.1 Sterilisasi Alat-alat

Semua alat-alat yang digunakan dibersihkan terlebih dahulu, khususnya alat-alat yang terbuat dari kaca seperti tabung reaksi, cawan petri, pipet volum, erlenmeyer, pencadang, botol, gelas piala dan gelas ukur dipanaskan dengan Na_3PO_4 1 % hingga mendidih selama 5 menit. Kemudian dicuci dengan air hingga bersih selanjutnya direndam dalam larutan HCl 1 % selama 24 jam, kemudian dicuci kembali dengan air, selanjutnya dibilas dengan air suling dan dikeringkan dengan oven atau dengan sinar matahari langsung.

Tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer dan botol segi empat disumbat dengan kapas kemudian dibungkus dengan kertas perkamen dan diikat dengan benang. Pipet volum, cawan petri, gelas piala, dan pencadang dibungkus dengan kertas perkamen. Kemudian disterilkan dengan oven pada suhu 180°C selama 2 jam.

Bahan yang terbuat dari logam disterilkan dengan api langsung (api spiritus) sampai pijar.

IV.2.2 Pembuatan Medium

1. Plate Count Agar (PCA)

Bahan-bahan

Pepton	5,00 gram
Ekstrak ragi	0,25 gram
Dekstrose	1,00 gram
Agar	15,00 gram
Air suling	10001,00 ml
pH 7,0 ± 0,2	

Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam air suling kemudian dipanaskan sampai mendidih hingga semua bahan larut. Kemudian pH-nya diperiksa. Air yang hilang selama pemanasan diganti dengan menambah air suling sampai volume 1000 ml. Disaring dengan kapas yang bersih. Disterikan dalam otoklaf pada suhu 120 °C selama 15 menit dengan tekanan ± 2 atm.

2. Potato Dextrose Agar (PDA)

Bahan-bahan

Potato infusia from	200,00 gram
Dextrose	20,00 gram
Agar	15,00 gram
Air suling	1000,00 ml
pH 5,6 ± 0,1	

Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam air suling kemudian dipanaskan sampai mendidih hingga semua bahan larut. Kemudian pH-nya diperiksa. Air yang

hilang selama pemanasan diganti dengan menambah air suling sampai volume 1000 ml. Disaring dengan kapas yang bersih. Disterilakan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan ± 2 atm.

3. Maltose-yeast ekstrak Broth (My-Broth)

Bahan-bahan :

Maltosa	10 gram
Yeast ekstrak	4 gram
Air suling	1000 gram
pH 7,0 \pm 0,2	

Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam air suling kemudian dipanaskan sampai mendidih hingga semua bahan larut. Kemudian pH-nya diperiksa. Air yang hilang selama pemanasan diganti dengan menambah air suling sampai volume 1000 ml. Disaring dengan kapas bersih. Disterilakan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan ± 2 atm.

4. Medium Produksi

Bahan-bahan :

Glukosa	20,00 gram
Pati larut	10,00 gram
Tepung kedelai	25,00 gram
Beef ekstrak	1,00 gram
Yeast ekstrak	1,00 gram
NaCl	2,00 gram
Air suling	1000,00 ml
pH 7,4 \pm 0,2	

Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam air suling kemudian dipanaskan sampai mendidih hingga semua bahan larut, kecuali glukosa. Kemudian pH-nya diperiksa. Air yang hilang selama pemanasan diganti dengan menambah air suling sampai volume 1000 ml. Disaring dengan kapas bersih.

Disterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan ± 2 atm. Sedangkan glukosa disterilkan dengan menggenangi eter, dan dibiarkan sampai kering pada suhu kamar. Kemudian keduanya dicampur secara aseptik.

5. Glukosa Nutrien Agar

Bahan-bahan :

Glukosa	10 gram
Meat ekstrak	5 gram
Pepton	10 gram
NaCl	2,5 gram
Agar	15 gram
Air suling	1000 ml
pH $7,0 \pm 0,2$	

Bahan-bahan tersebut dilarutkan dalam air suling kemudian dipanaskan sampai mendidih hingga semua bahan larut, kecuali glukosa. Kemudian pH-nya diperiksa. Air yang hilang selama pemanasan diganti dengan menambah air suling hingga volume 1000 ml. Disaring dengan kapas bersih. Disterilkan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 15

menit dengan tekana ± 2 atm. Sedangkan glukosa disterilkan dengan menggenangi eter. Dibiarkan pada suhu kamar sampai kering. Kemudian keduanya dicampur secara aseptik.

IV.3 Cara Kerja (14, 16)

IV.3.1 Pengambilan Contoh

Rumput laut jenis Euclima spinosum dipanen dari laut di Jeneponto secara acak kemudian dibersihkan dari kotoran yang ada. Selanjutnya ditempatkan pada kantong plastik yang sebelumnya telah disterilkan.

IV.3.2 Pengolahan Contoh

Rumput laut yang telah dipanen selanjutnya dipotong-potong atau dihancurkan dengan mikser hingga halus.

IV.3.3 Isolasi dan Pembiakan mikroba rumput laut pada media agar.

Rumput laut yang telah dihaluskan selanjutnya dibuat suspensi dalam air suling steril dengan pengenceran 1 : 100 sampai 1 : 10.000. Kemudian dari setiap suspensi diambil 1 ml secara aseptik dicampur dengan 20-ml medium Plate Count Agar (PCA) dan medium Potato Dekstro Agar (PDA) kemudian dituang ke dalam cawan petri. Selanjutnya diinkubasikan selama 2 - 4 hari.



IV.3.4 Seleksi Biakan

Selama waktu inkubasi, diamati perubahan yang terjadi. Selanjutnya koloni yang tumbuh terutama yang memberikan daerah bening disekitarnya diisolasi pada medium yang sama berulang-ulang untuk mendapatkan biakan murni. Untuk mengetahui biakan tersebut murni maka diambil ke empat sisinya dilihat di bawah mikroskop bentuk morfologinya. Bila ke empat sisinya sama bentuk morfologinya berarti koloni tersebut sudah murni. Biakan murni tersebut dipindahkan ke agar miring untuk stok.

IV.3.5 Fermentasi Biakan murni

Koloni biakan murni dari stok diambil satu ose dan diinokulasikan ke dalam 100 ml medium perbenihan cair maltose-yeast ekstrak broth (My-Broth), kemudian diinkubasikan pada alat pengocok dengan intensitas goyangan 170 rpm, pada suhu kamar selama 24 jam. Kemudian diambil masing-masing 3 ml ke dalam 10 buah erlemeyer yang berisi 100 ml medium produksi. Dinkubasikan pada alat pengocok dengan intensitas goyangan 170 rpm, pada suhu kamar selama 148 jam

IV.3.6 Pemeriksaan aktifitas antibiotika dengan metoda difusi.

Medium produksi yang sudah difermentasikan kemudian dipisahkan dari selnya dengan

penyaringan. Filtrat yang diperoleh selanjutnya dicek pH-nya, dan diuji aktifitas antibiotikanya terhadap bakteri uji yang digunakan.

Medium Glukosa Nutrien Agar (GNA) dipanaskan di atas penangas air sampai seluruhnya mencair, dibiarkan sampai dingin dengan suhu 40-45 °C. Kemudian dibuat inokulasi bakteri uji dengan persentase suspensi bakteri uji 1 %. Inokulasi dituangkan ke dalam cawan petri dan dihomogenkan, selanjutnya dibiarkan sampai membeku. Pencadangan diletakkan secara aseptik di atas permukaan lempeng yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Filtrat dari hasil fermentasi diambil 0,15 ml, kemudian dimasukkan dalam pencadangan. Kemudian diinkubasikan selama 24 jam. Aktifitas antibiotika dapat dilihat dengan adanya daerah hambatan disekelilingnya.

IV.3.7 Isolasi dan Identifikasi (15,17,18,19,20)

1. Ekstraksi kaldu fermentasi

Sel dan filtrat hasil fermentasi dipisahkan dengan bantuan penyaringan. Filtrat diekstraksi dengan n-butanol dan kloroform pada pH 3, ekstraksi dilakukan berulang-ulang sampai ekstrak tidak berwarna.

Ekstrak n-butanol dan kloroform diuapkan di atas penangas air pada suhu 100 °C, yang

sebelumnya telah diuji aktifitasnya terhadap bakteri uji dari masing-masing ekstrak.

2. Pemisahan komponen kimia

Ekstrak kental yang diperoleh ditotolkan pada lempeng kromatografi lapis tipis dengan silika gel GF, ukuran 15 x 10 cm, selanjutnya dielusi pada cairan pengelusi CHCl_3 : MeOH (5 : 15) untuk ekstrak n-butanol dan cairan pengelusi CHCl_3 : MeOH : air (3 : 2 : 1) untuk ekstrak kloroform.

Komponen kimia yang muncul masing-masing dikeruk dan dilarutkan kembali pada cairan pengelusi masing-masing. Dari masing-masing komponen tersebut diuji daya hambatnya terhadap bakteri uji. Pada pengujian ini juga dilakukan dengan cara bioautografi terhadap bakteri uji. Yaitu dari hasil kromatografi lapis tipis ekstrak n-butanol dan kloroform diletakkan pada medium agar yang telah diinokulasikan dengan Escherchia coli pada medium agar yang satu Staphylococcus aereus pada medium agar lainnya, lalu diinkubasikan selama 2 hari.

3. Pengujian kemurnian

Kromatografi lapis tipis dua dimensi dari komponen aktif dari ekstrak n-butanol, kemudian ditotolkan pada lempeng kromatografi

lapis tipis, lalu dielusi dengan cairan pengelusi :

a. CHCl_3 : MeOH (5 : 15) pada arah I

b. CHCl_3 : MeOH (5 : 10) pada arah II

Komponen aktif dari ekstrak kromatografi, ditotolkan pada lempeng kromatografi lapis tipis dan dielusi dengan cairan pengelusi :

a. CHCl_3 : MeOH : air (3 : 2 : 1) pada arah I

b. CHCl_3 : MeOH (3 : 2) pada arah II

Masing-masing menggunakan penampak noda lampu UV dan H_2SO_4 10 %.

4. Identifikasi antibiotika

Komponen kimia murni yang memberi daya hambat terhadap bakteri uji dari masing-masing ekstrak setelah diinkubasikan selama 2 hari selanjutnya diidentifikasi dengan spektroskopi infra merah, dan hasilnya dapat dilihat pada gambar.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

V.1. HASIL PENELITIAN

Diperoleh koloni sel yang memberi daerah bening atau zona bening disekitarnya. Biakan murni dari koloni sel tersebut, yaitu adanya kesamaan bentuk morfologi dari keempat sisinya dibawah mikroskop, selanjutnya digunakan sebagai persediaan (Stok).

Fermentasi pada alat pengocok (shaker) selama 48 jam dengan intensitas goyangan 170 rpm pada suhu kamar menghasilkan daya hambat terhadap bakteri uji. Daya hambat terbesar diperoleh setelah pengocokan selama 120 jam, seperti terlihat pada tabel I.

PH filtrat yang cocok untuk diekstraksi dengan cairan pengestraksi n-butanol dan kloroform adalah pada pH 3, seperti terlihat pada tabel II.

Kromatografi lapis tipis (KLT) dari ekstrak n-butanol diperoleh 3 noda dengan cairan pengelusi CHCl_3 -MeOH (5:15) dengan penampak noda asam sulfat 10 % dan sinar UV. Sedangkan ekstrak kloroform dengan cairan pengelusi CHCl_3 -MeOH- H_2O (3:2:1) diperoleh 2 noda untuk penampak noda asam sulfat 10 % dan 1 noda untuk penampak noda sinar UV. Hasil pengamatan ternyata bahwa noda dengan Rf 0,85 dari ekstrak n-butanol dan Rf 0,76 dari ekstrak kloroform memberi daya hambat terhadap bakteri uji. Seperti terlihat pada tabel III.

Dengan spektroskopi infra merah menunjukkan adanya gugus -OH pada bilangan gelombang 3450 cm^{-1} , gugus CH_3 pada bilangan gelombang 2900 cm^{-1} , gugus -COOH pada bilangan gelombang 1735 cm^{-1} , dan gugus C=C pada bilangan gelombang 1600 cm^{-1} . Sedangkan komponen aktif dari ekstrak kloroform dengan spektroskopi infra merah menunjukkan adanya gugus -OH pada bilangan gelombang 3400 cm^{-1} , gugus CH_3 pada bilangan gelombang 2900 cm^{-1} , gugus -COOH pada bilangan gelombang 1730 cm^{-1} , dan gugus C=C pada bilangan gelombang 1600 cm^{-1} .

V.2 PEMBAHASAN

Diperoleh koloni sel yang memberi daerah bening disekitarnya, hal ini terjadi karena kemampuan mikroorganisma tersebut untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisma lainnya.

Dari biakan murni diambil 1 ose ke dalam medium perbenihan My broth dan dikocok selama 24 jam dihasilkan agak keruh putih dari medium tersebut. Ini menandakan adanya perkembangbiakan dari mikroorganisma tersebut.

Setelah pengocokan selama 48 jam dalam medium produksi terlihat adanya daya hambat yang diberikan terhadap bakteri uji, yang menandakan bahwa mikroorganisma tersebut menghasilkan zat kimia yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisma lainnya.

Isolasi antibiotika dengan menggunakan cairan pengekstraksi yang tidak bercampur dengan air yaitu

n-butanol dan kloroform. Cairan filtrat diatur pH-nya dengan penambahan asam sulfat dan natrium hidroksida yaitu pH 3, pH 7 dan pH 9, dengan tujuan untuk mengamati pada pH berapa antibiotika tersebut dapat terekstraksi dengan baik. Dan dihasilkan bahwa pada pH 3 memberikan daya hambat terhadap bakteri uji, sedangkan kelompok pH yang lainnya tidak memberikan daya hambat. Hal ini menandakan bahwa pada pH 3 antibiotika tersebut dapat lebih larut pada cairan pengestraksi dibanding pada cairan filtratnya. Adapun pH hasil ekstraksi (ekstrak n-butanol dan kloroform) adalah pH 7. Ini terdapat perbedaan yang tajam dari cairan filtrat dengan ekstrak karena pada cairan filtrat ion H^+ . Sedangkan dalam cairan ekstrak pH-nya netral karena tidak terjadi ionisasi ion H^+ sebab terdapat larutan pelarut organik.

Dengan kromatografi lapis tipis diperoleh komposisi cairan pengelusi yang optimum yaitu $CHCl_3$ -MeOH (5:15) untuk ekstrak n-butanol dan $CHCl_3$ -MeOH- H_2O (3:2:1) untuk ekstrak kloroform. Ini disebabkan bahwa jenis pelarut organik dengan komposisi tersebut memungkinkan terjadi variasi kelarutan terhadap komponen kimia yang terkandung dalam ekstrak. Sehingga terjadi perbedaan afinitas terhadap cairan pengelusi dan absorben yang digunakan dari masing-masing komponen.

Dengan spektroskopi infra merah didapatkan bahwa komponen aktif tersebut terdapat gugus $-OH$, CH_3 ,

COOH, dan C=C. Ini disebabkan bahwa gugus-gugus fungsi tersebut menyerap spektrum infra merah dan daerah panjang gelombang yang berbeda-beda untuk masing-masing gugus fungsi. Sehingga memberikan pick-pick yang berbeda pada rekorder.

Tabel I. Hasil Pengamatan Perubahan pH dan Aktifitas Antibiotika.

Lama fermentasi (jam)	pH	Diameter hambatan (mm)	
		E. Coli	S. aureus
12	7	-	-
24	6,5	-	-
36	6,7	-	-
48	6,0	11,00	10,00
60	5,5	12,00	10,00
72	5,0	14,00	12,00
84	5,0	14,00	12,00
96	4,7	16,00	13,00
108	4,5	18,00	14,00
120	4,0	20,00	15,00
132	3,5	10,00	14,00
148	3,0	17,00	14,00

Tabel II. Hasil Pengamatan Aktifitas Antibiotika dari Ekstrak

Ekstrak	Diameter hambatan (mm)					
	pH 3		pH 7		pH 9	
	1	2	1	2	1	2
n-butanol	17	26	-	-	-	-
Kloroform	22	26	-	-	-	-

Keterangan :

1 : Staphylococcus aureus

2 : Escherichia coli

Tabel III. Hasil Pengamatan Aktifitas Antibiotika dari Komponen-komponen kimia dari ekstrak.

Ekst-rak	CP	Noda	Rf	Diameter hambatan (mm)		Warna	
				1	2	HS	UV
nb	A	1	0,36	-	-	hijau	ungu
		2	0,65	-	-	ungu	ungu
		3	0,85	21	19	ungu	ungu
CF	B	1	0,35	-	19	hijau	
		2	0,76	21	18	ungu	ungu

Keterangan :

nb : n-butanol

CF : khloroform

A : CHCl_3 : MeOH (5 : 15)

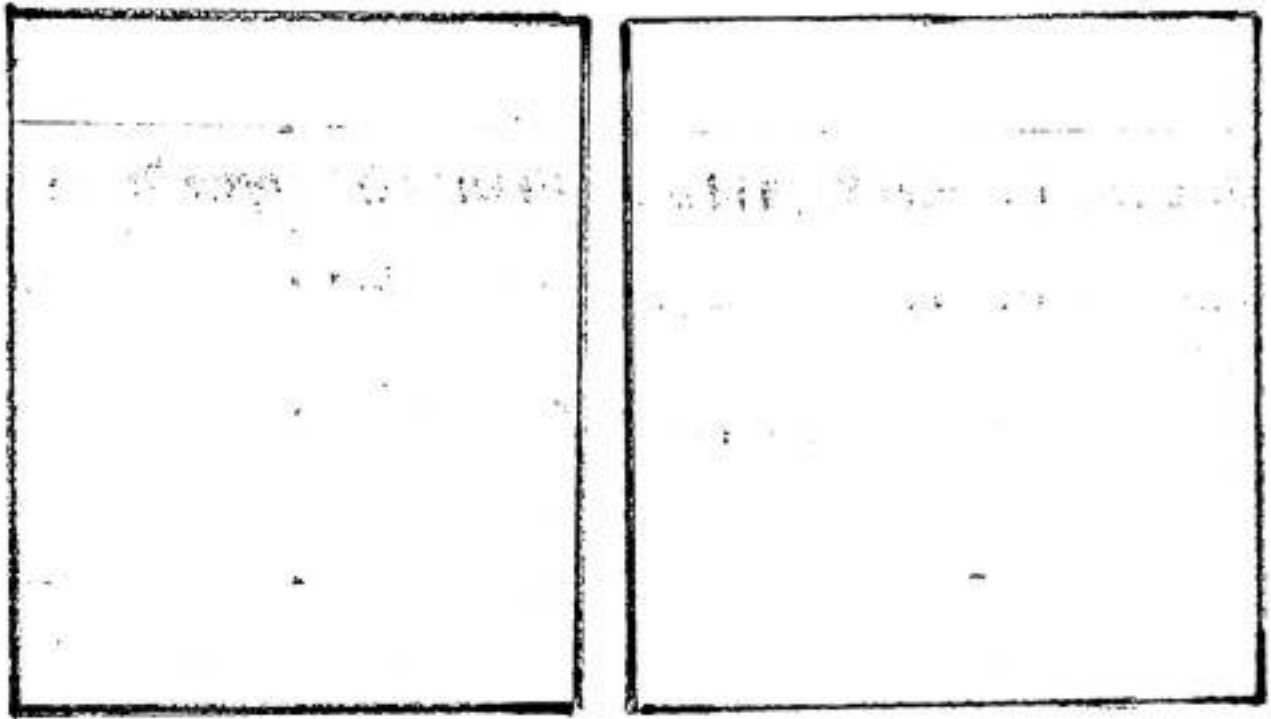
B : CHCl_3 : MeOH : air (3 : 2 : 1)

HS : penampak noda H_2SO_4 10 %

UV : penampak noda lampu ultra violet

1 : Staphylococcus aureus

2 : Escherichia coli



A

B

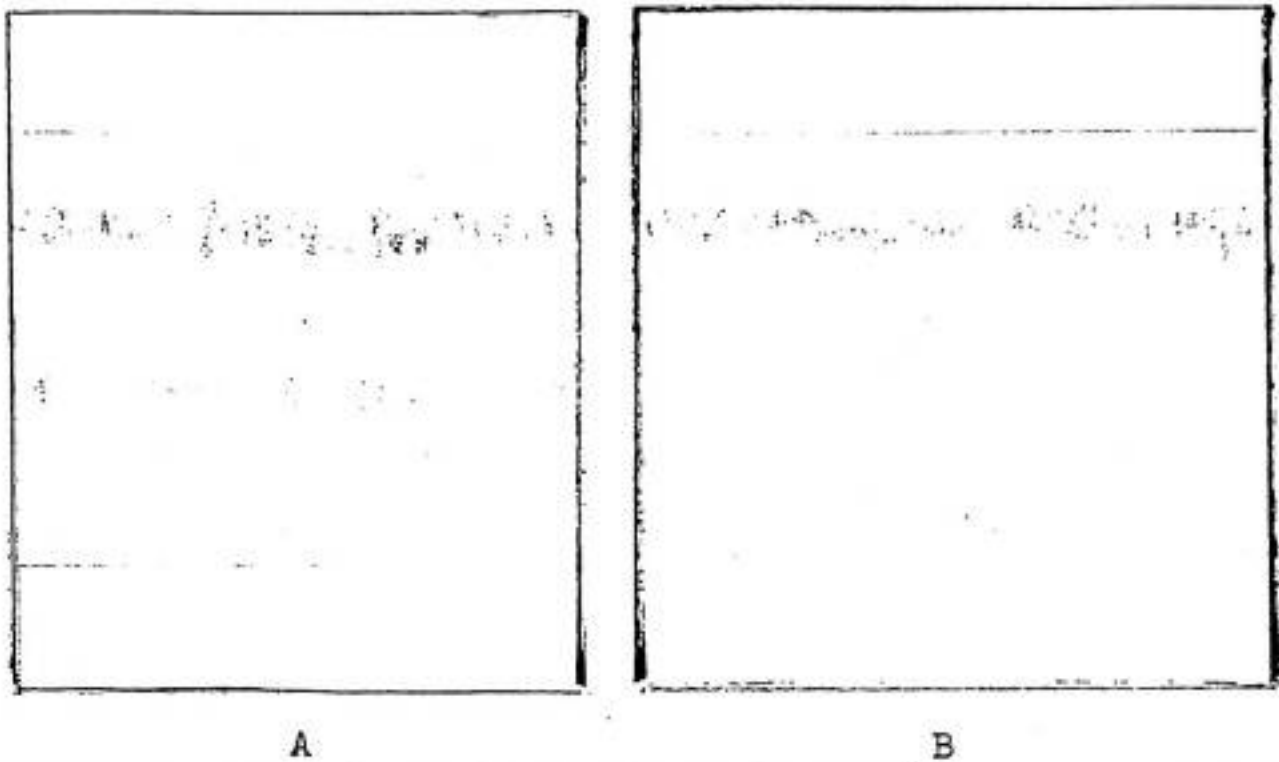
Gambar 1. Hasil kromatografi lapis tipis dari ekstrak n-butanol.

Keterangan :

Penampak noda A : larutan H_2SO_4 10 %

Penampak noda B : lampu Ultra Violet

Cairan Pengelusi: $CHCl_3$: MeOH (5 : 15)



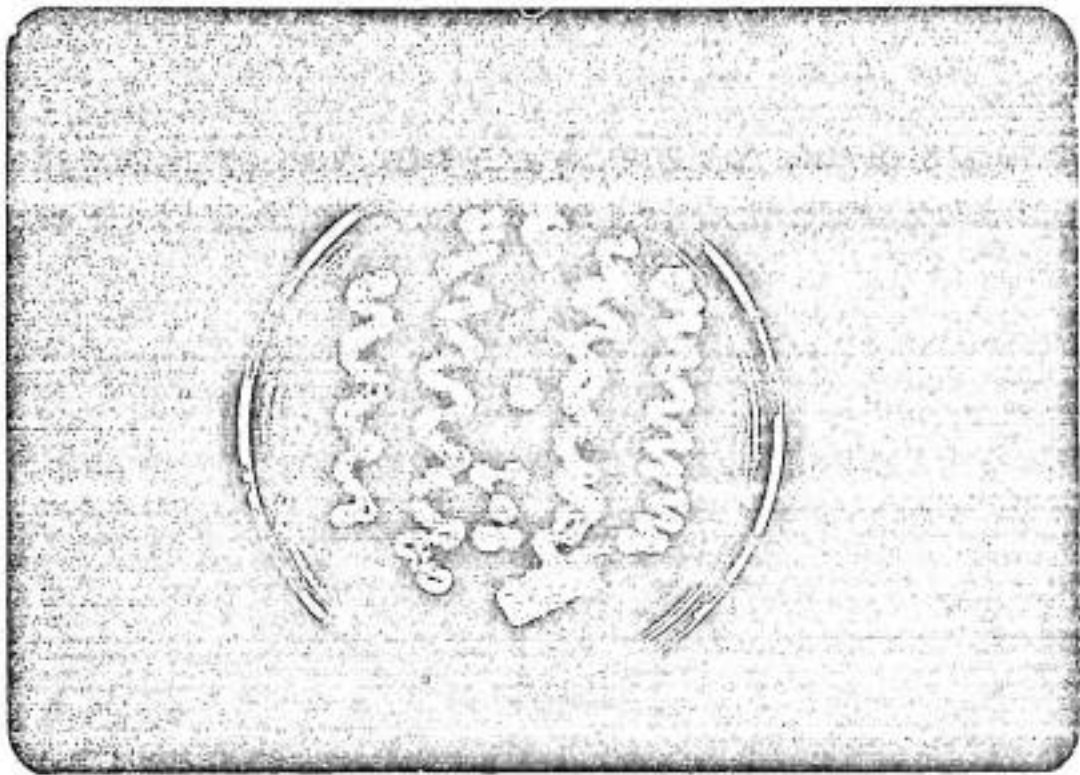
Gambar 2. Hasil kromatografi lapis tipis dari ekstrak kloroform.

Keterangan :

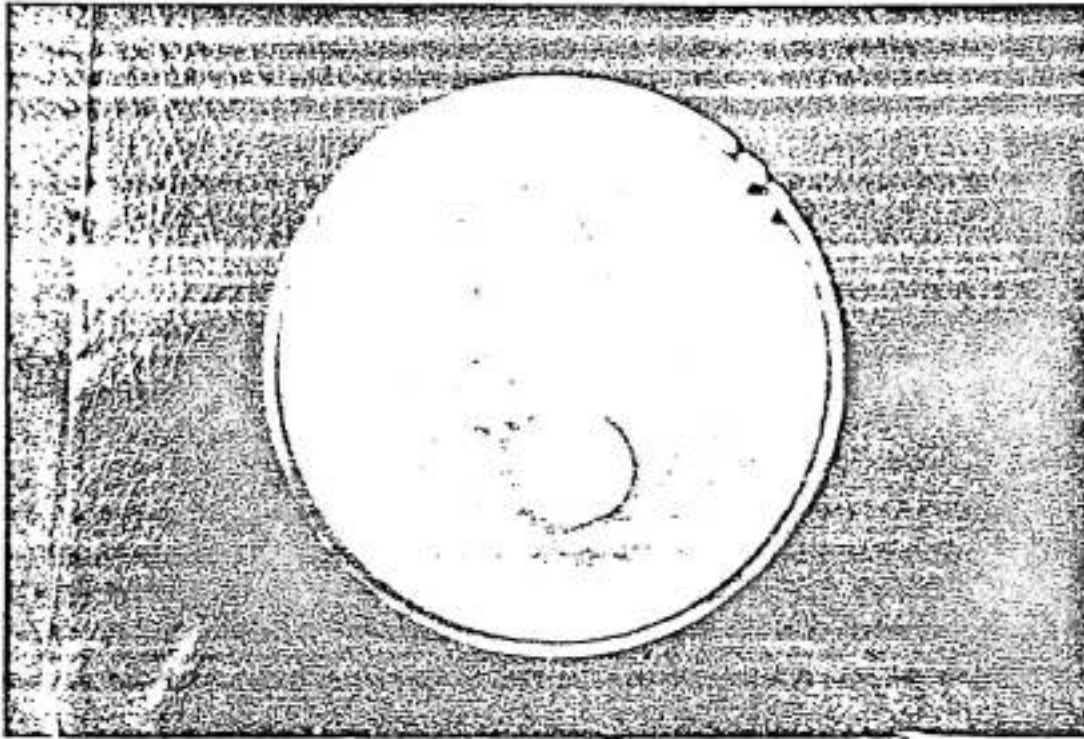
Penampak noda A : larutan H_2SO_4 10 %

Penampak noda B : lampu Ultra Violet

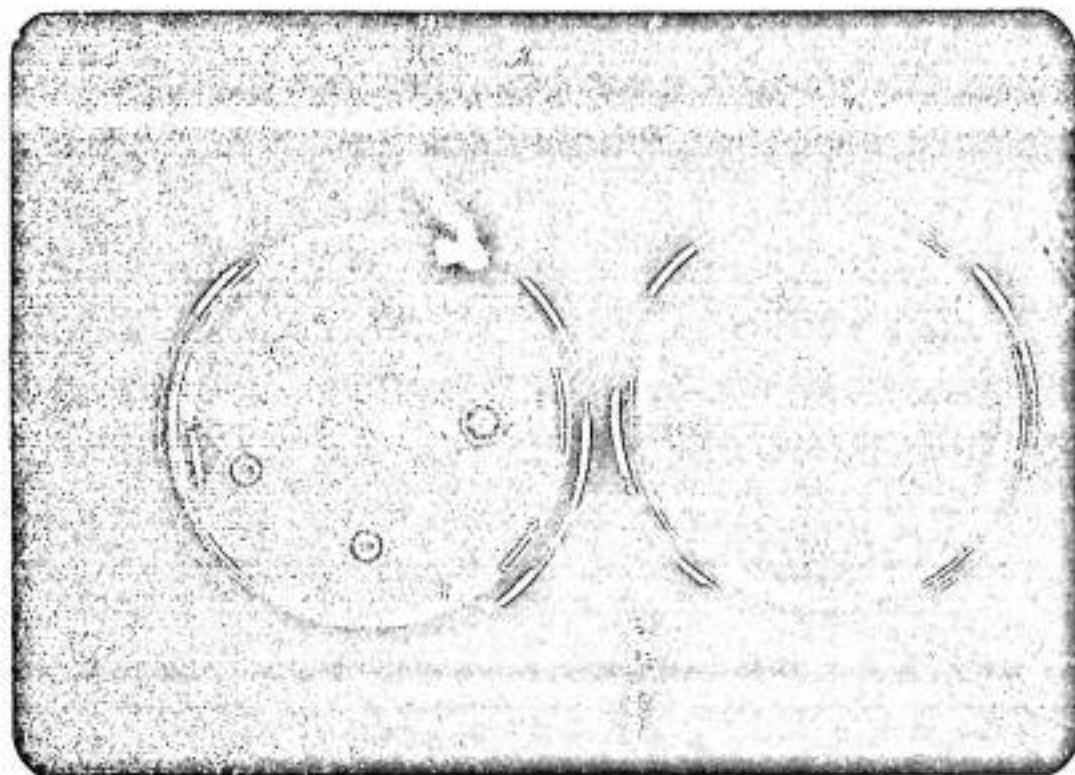
Cairan Pengelusi: $CHCl_3$: MeOH : air
(3 : 2 : 1)



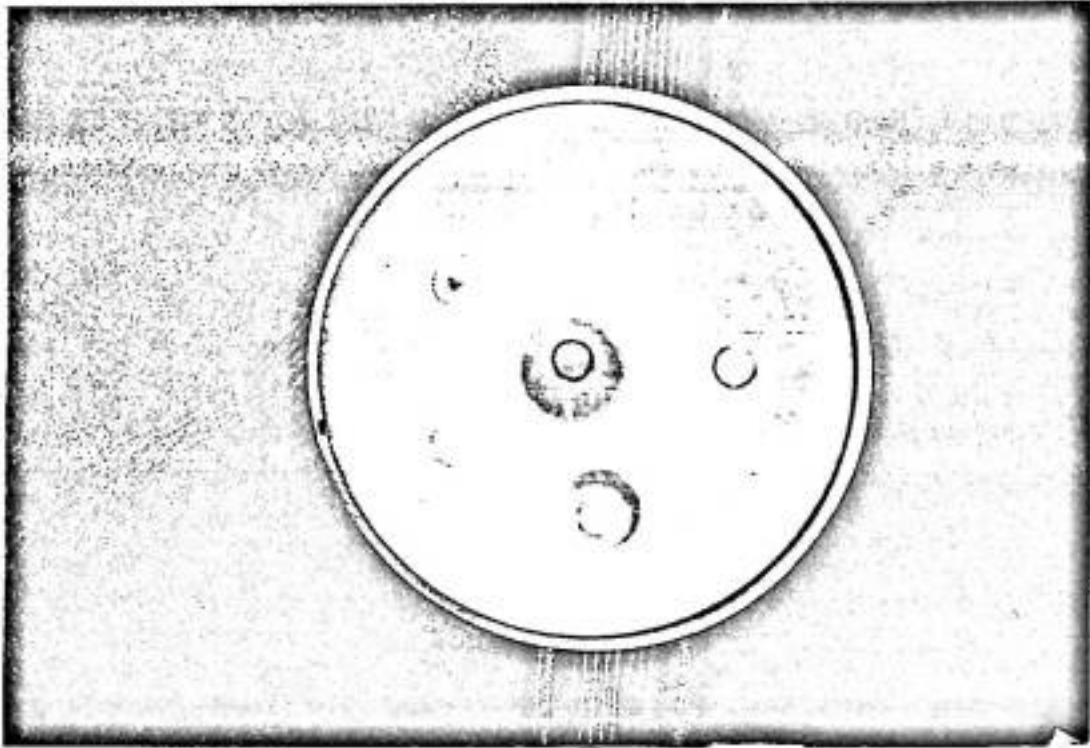
Gambar 3 Hasil pengamatan isolat mikroba dari agar-agar halus.



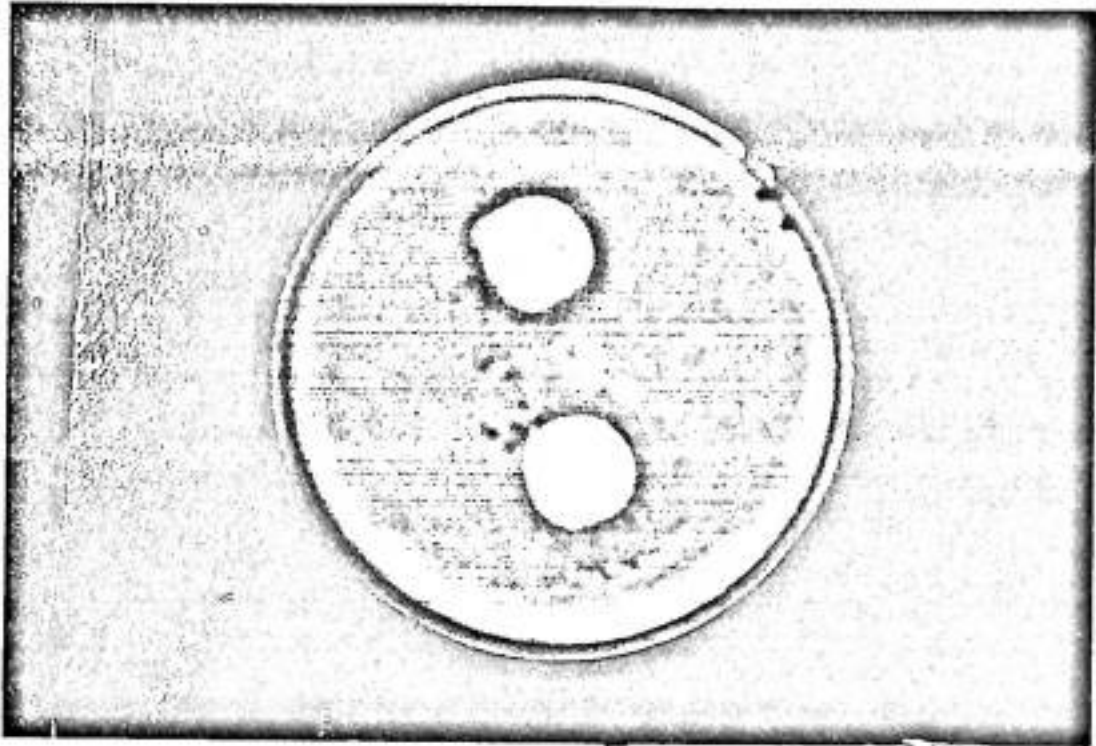
Gambar 4. Hasil pengamatan daya hambat atau daerah bening isolat terhadap kontaminan



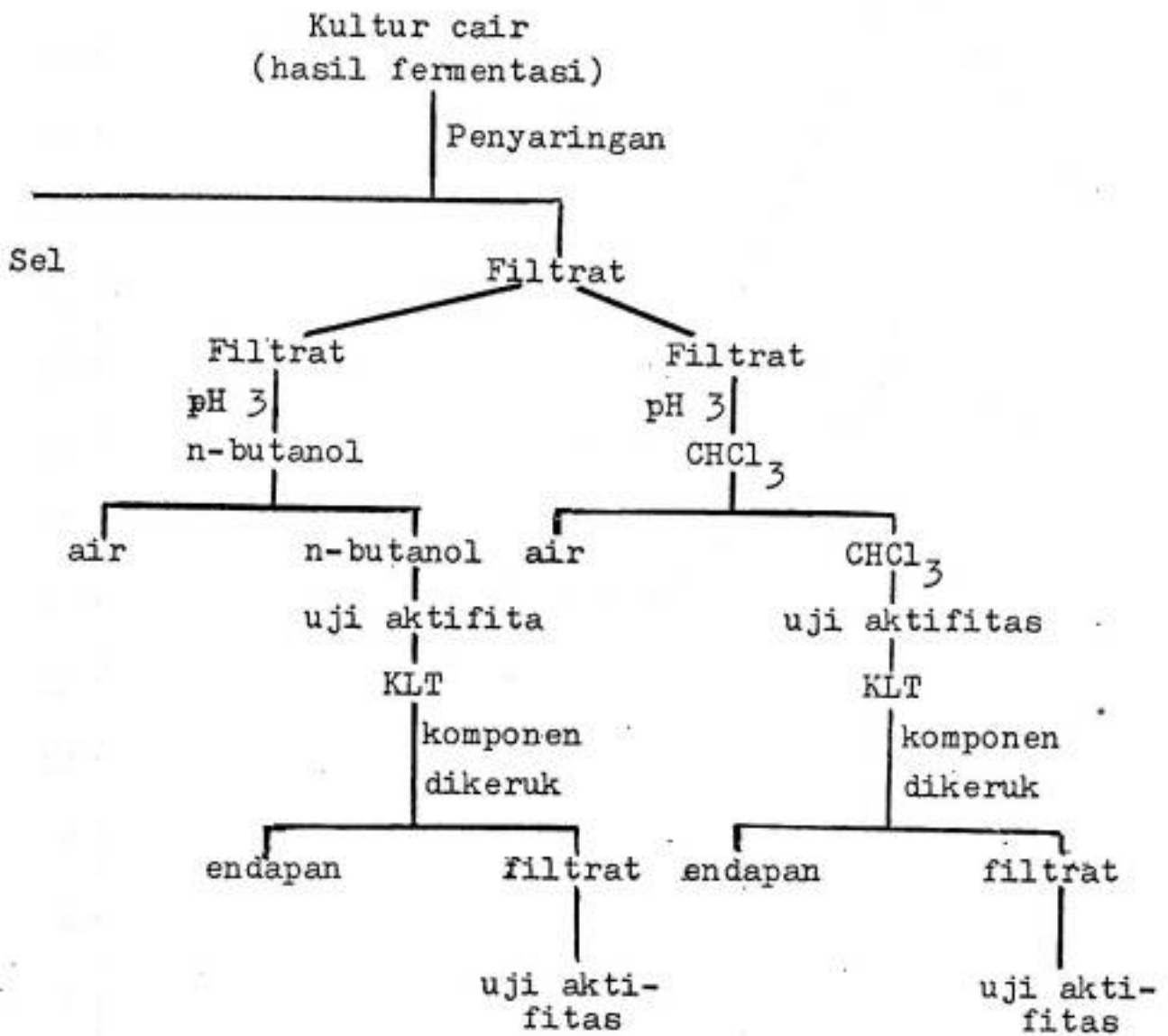
Gambar 5 hasil pengamatan aktivitas antibiotik terhadap bakteri uji dengan pengocokan 48 jam.



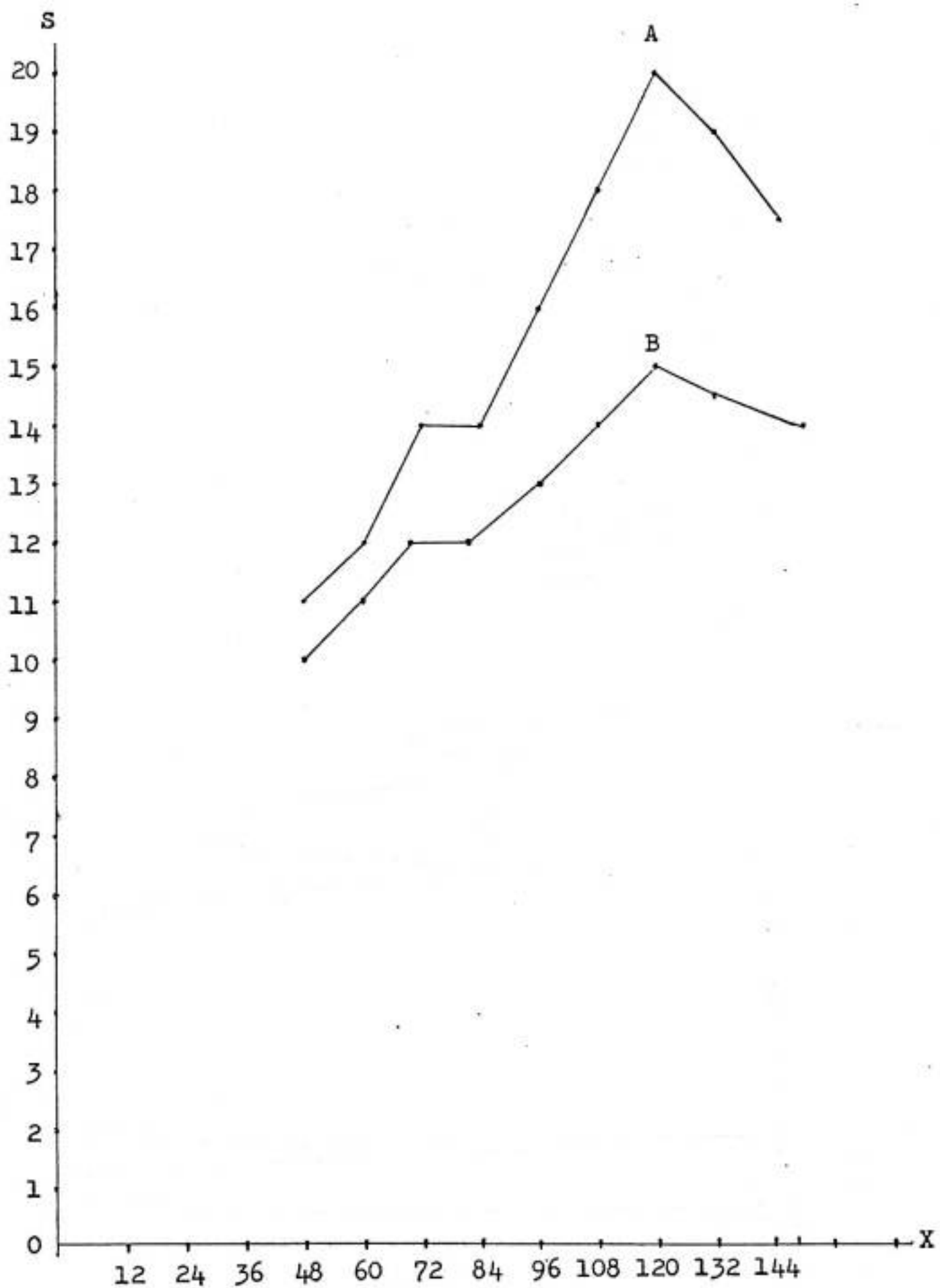
Gambar 6. Hasil pengamatan aktivitas antibiotika terhadap bakteri uji dengan pengocokan 148 jam.



Gambar 7. Hasil pengamatan aktivitas antibiotika komponen aktif terhadap bakteri uji.

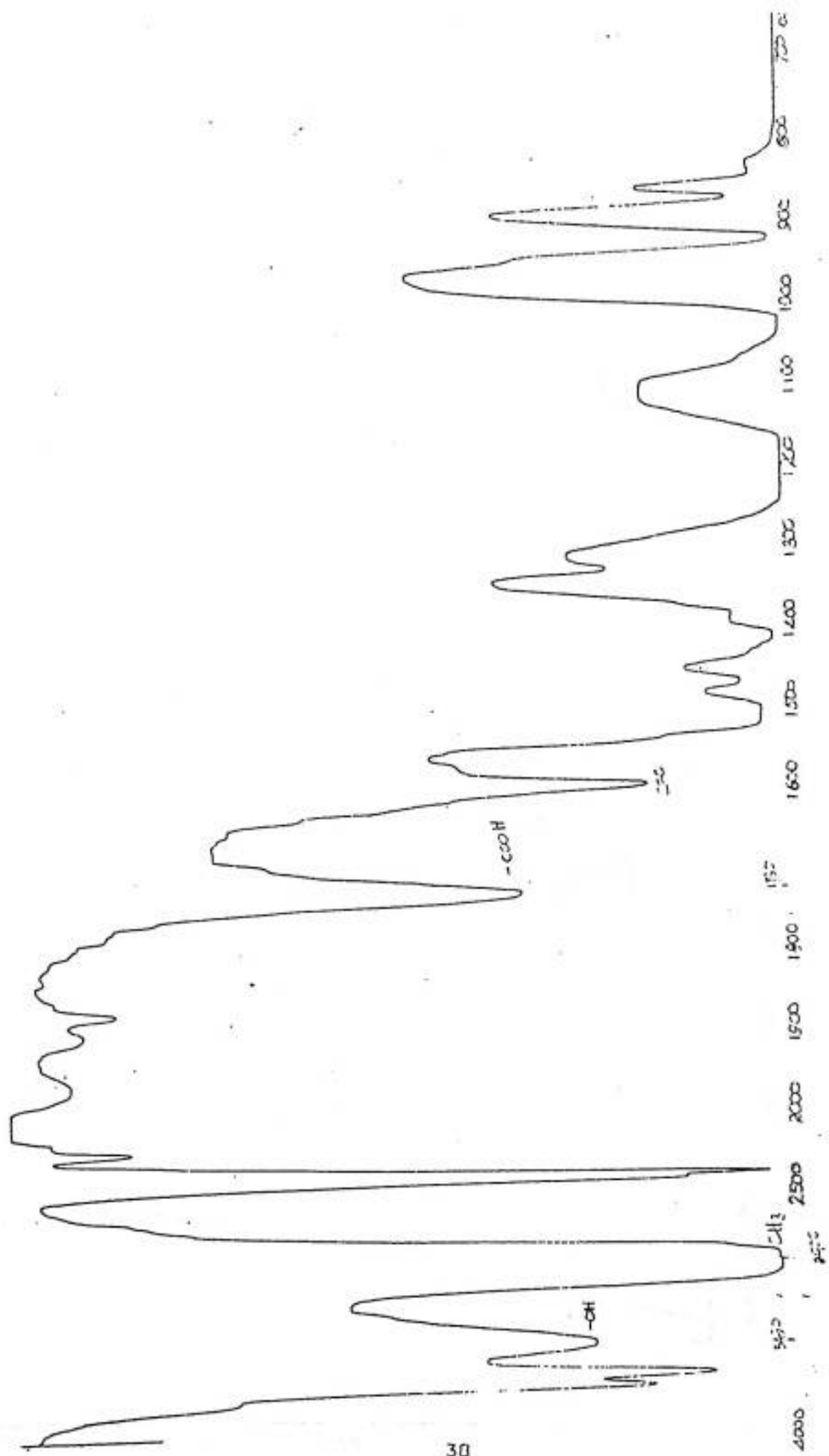


Gambar 8. Bagan Isolasi

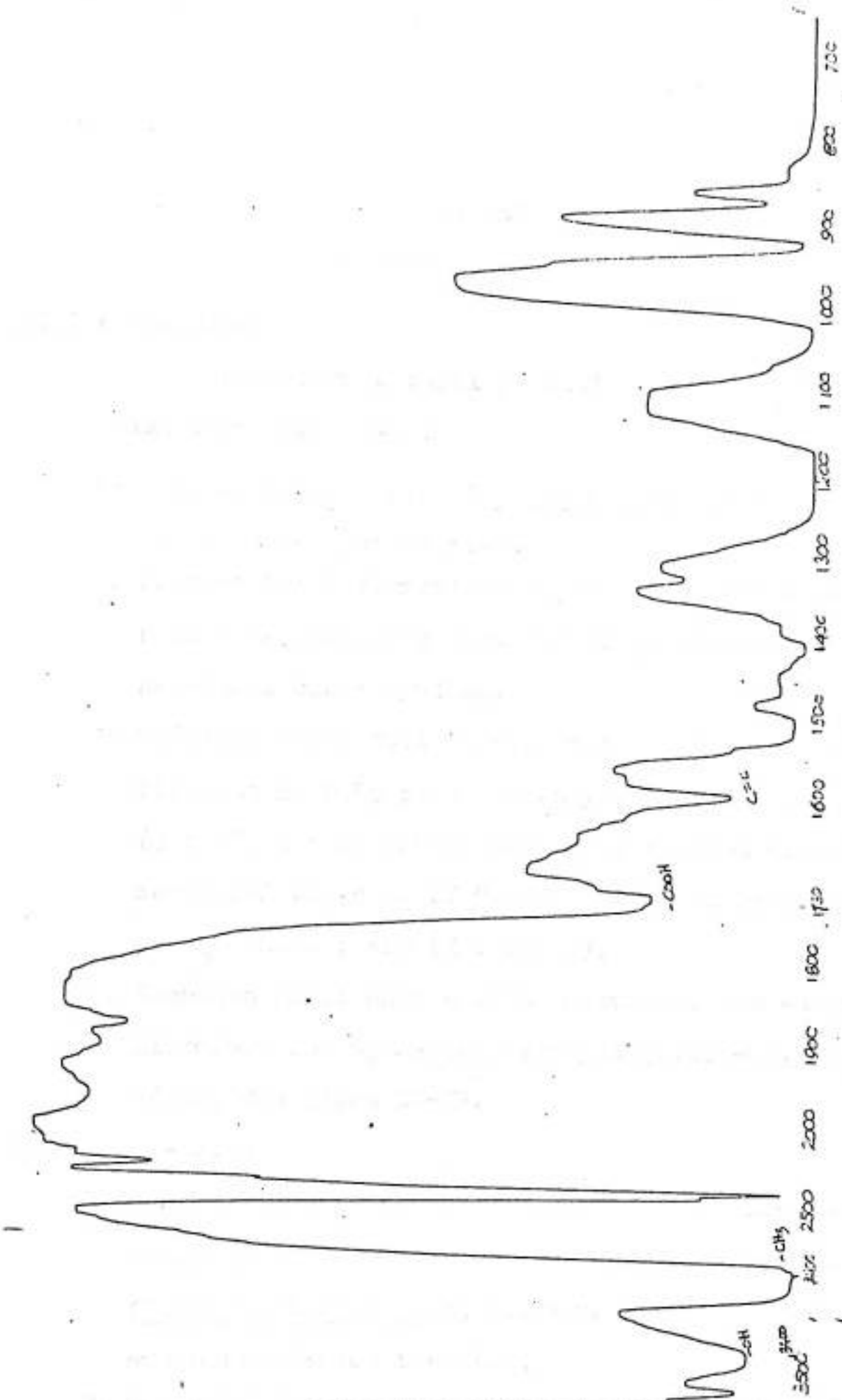


Gambar 9. Grafik Hubungan antara lamanya fermentasi dengan diameter hambatan terhadap bakteri uji

Keterangan : X = Lamanya fermentasi (jam)
 S = Diameter hambatan (mm)
 A = Bakteri uji Escherichia coli
 B = Bakteri uji Staphylococcus aureus



Ekstrak n-butanol



Ekstrak Kloroform

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

VI.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan ternyata bahwa :

1. Dari agar-agar halus (Eucheuma spinosum Ag) dapat menghasilkan antibiotika.
2. Filtrat hasil fermentasi dapat terekstraksi dengan baik pada pH 3 dari cairan pengestraksi n-butanol dan kloroform.
3. Komponen aktif dari ekstrak n-butanol mempunyai bilangan Rf 0,85 pada cairan pengelusi $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (5 : 15) dan komponen aktif dari ekstrak kloroform mempunyai bilangan Rf 0,76 pada cairan pengelusi $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{air}$ (3 : 2 : 1).
4. Komponen aktif dari ekstrak n-butanol dan ekstrak kloroform masing-masing terdapat gugus -OH, CH_3 , -COOH, dan gugus HC-CH.

IV.2 Saran-saran

1. Perlu dilakukan identifikasi terhadap mikroba yang menghasilkan antibiotika dari agar-agar halus (Eucheuma spinosum Ag) sehingga dapat diketahui jenis dari mikroba tersebut.
2. Perlu dilakukan kromatografi kolom dari ekstrak yang diperoleh untuk mendapatkan penimbangan

komponen aktif lebih besar sehingga dapat dilakukan analisa spektroskopi ^1H NMR, ^{13}C NMR. Mass spektroskopi, penentuan titik lebur demi kesempurnaan data dari komponen aktif.

DAFTAR PUSTAKA

1. Afrianto, E., Evi Liliawati., (1989), "Budi Daya Rumput Laut dan Cara Pengolahannya", penerbit Bharatara, Jakarta, 1-16, 20, 21.
2. Ville-Dethier., (1965), "Biological principles and processed", 369-370.
3. Kuntoro, S., (1985), "Mikroba dan hari depan manusia", penerbit Yayasan padamu negeri, Jakarta, 82, 83.
4. Tjitro Soepomo, G., (1981), "Taksonomi Tumbuhan", penerbit Bharatara Karya Aksara, Jakarta, 27-29, 82-87.
5. -----., (1986), "Majallah BPPT", penerbit Badan dan Penerapan Teknologi, Jakarta, no XIV, 1-3.
6. Rimate, A.F., (1984), "Antibiotika dan Anti Infeksi", Diktat Kimia Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Ujung Pandang, 1, 2, 3, 4, 5.
7. Naid, T., at al., (1984), "Studies on New Antibiotic Substances 1024-A and B", Hiroshima University, Japan, 1-10.
8. Bonang, G., Engar S. Koeswadono., (1982), "Mikrobiologi Kedokteran", Penerbit PT.Gramedia, Jakarta, 6, 9, 17, 18, 21.
9. Hasoetmo, R.S., (1989), "Mikrobiologi Dasar dalam Praktek", Penerbit PT.Gramedia, Jakarta, 101, 105, 134, 157.
10. Pelczar., Chan., (1977), "Laboratory Exercise in Microbiology", 4th edition, New York, 371-378.

11. Salle, A.J., (1961), "Fundamental principle of Bacteriology", 5th edition, Mc Graw-Hill Book Company, New York, Toronto, 66-99, 106-157, 532-627.
12. Dwidjosaputro, D., (1980), "Dasar-dasar Mikrobiologi", Penerbit Djambatan, Malang, 41-68, 158.
13. Yani, A., (1985), "Pemeriksaan secara Mikrobiologis Susu encer Tetrapak yang beredar di Kotamadya Ujung Pandang", Skripsi sarjana Farmasi, Universitas Hasanuddin, Ujung Pandang.
14. Bonang, G. " Mikrobiologi untuk profesi kesehatan "ed 16 Penerbit EGC Jakarta 1986, 104, 105.,
15. Sukandar Elin Yuliana , (1987), "Isolasi antibiotika antifungi dari Streptomyces indoneciensis ATCC 35859", Desertasi doktor dari Institut Teknologi Bandung, 43-47, 63-66.
16. Naid, T., et al., (1987), "Carbazomycin C, D, E, and F, Minor Components of Carbazomycin complex", Nournal antibiotic, 157-164.
17. Stahl, E., (1969), "Thin layer Chromatography", Laboratory and Book, Secon edition, Springe Verlag Berlin Heidelberg, New York, 687-710.
18. David Abbot and R.S. Andrew., (1965), "Chromatography", Longmans Green and Co LTD.
19. Herman, J. Roth., (1988), "Analisa Farmasi", Gajahmada University Prees, Yogyakarta, 385, 390.

20. Wattimena, J. J. Siregar, Charles J.P Siregar., (1986),
"Beberapa aspek pokok pengujian mutu perbekalan Farmasi", Penerbit Pusat Pemeriksaan Obat dan Makanan
Direktur Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Japan International Cooperation Agency (JICA), 215-217,229.